



HAL
open science

Expression immunohistochimique de la protéine STING dans les cancers colo-rectaux avec un système MMR déficient ou fonctionnel

Guillaume Scellier

► **To cite this version:**

Guillaume Scellier. Expression immunohistochimique de la protéine STING dans les cancers colo-rectaux avec un système MMR déficient ou fonctionnel. Médecine humaine et pathologie. 2023. dumas-04108495

HAL Id: dumas-04108495

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04108495v1>

Submitted on 27 May 2023

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.



UFR DE SANTE ROUEN NORMANDIE

ANNEE 2023

N°

THESE POUR LE DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

par

Guillaume SCELLIER

né le 18 février 1995 à Montivilliers

Présentée et soutenue publiquement le 31 mars 2023

**EXPRESSION IMMUNOHISTOCHIMIQUE DE LA PROTEINE STING
DANS LES CANCERS COLO-RECTAUX
AVEC UN SYSTEME MMR DEFICIENT OU FONCTIONNEL**

*STING IMMUNOEXPRESSION AMONG COLO-RECTAL CANCER
WITH AND WITHOUT MICROSATELLITE INSTABILITY*

PRESIDENT DU JURY :

Monsieur le Professeur Jean-Christophe SABOURIN

DIRECTEUR DE THESE :

Monsieur le Professeur Jean-Christophe SABOURIN

MEMBRES DU JURY :

Monsieur le Professeur Pierre MICHEL
Monsieur le Professeur Frédéric DI FIORE
Monsieur le Docteur Michaël BUBENHEIM
Monsieur le Docteur Nicolas PITON

ANNEE UNIVERSITAIRE 2022 - 2023

U.F.R. SANTÉ DE ROUEN

DOYEN : **Professeur Benoît VEBER**

ASSESEURS : **Professeur Loïc FAVENNEC**
Professeur Agnès LIARD
Professeur Guillaume SAVOYE

I - MEDECINE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mr Frédéric ANSELME	HCN	Cardiologie
Mme Gisèle APTER	Havre	Pédopsychiatrie
Mme Isabelle AUQUIT AUCKBUR	HCN	Chirurgie plastique
Mr Jean-Marc BASTE	HCN	Chirurgie Thoracique
Mr Fabrice BAUER	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya BEKRI	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Ygal BENHAMOU	HCN	Médecine interne
Mr Jacques BENICHOU	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Emmanuel BESNIER	HCN	Anesthésiologie - Réanimation
Mr Olivier BOYER	UFR	Immunologie
Mme Valérie BRIDOUX HUYBRECHTS	HCN	Chirurgie Digestive
Mme Sophie CANDON	HCN	Immunologie
Mr François CARON	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe CHASSAGNE	HCN	Médecine interne (gériatrie)

Mr Florian CLATOT	CB	Cancérologie – Radiothérapie
Mr Moïse COEFFIER	HCN	Nutrition
Mr Vincent COMPERE	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Jean-Nicolas CORNU	HCN	Urologie
Mr Antoine CUVELIER	HB	Pneumologie
Mr Jean-Nicolas DACHER	HCN	Radiologie et imagerie médicale
Mr Stéfán DARMONI	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre DECHELOTTE	HCN	Nutrition
Mr Stéphane DERREY	HCN	Neurochirurgie
Mr Frédéric DI FIORE	CHB	Cancérologie
Mr Fabien DOGUET (<i>disponibilité</i>)	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mr Jean DOUCET	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard DUBRAY	CHB	Radiothérapie
Mr Frank DUJARDIN	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologique
Mr Fabrice DUPARC	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric DURAND	HCN	Cardiologie
Mme Hélène ELTCHANINOFF	HCN	Cardiologie
Mr Manuel ETIENNE	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Jean François GEHANNO	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel GERARDIN	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille GERARDIN	HCN	Pédopsychiatrie
M. Guillaume GOURCEROL	HCN	Physiologie
Mr Dominique GUERROT	HCN	Néphrologie
Mme Julie GUEUDRY	HCN	Ophtalmologie
Mr Olivier GUILLIN	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Florian GUISIER	HCN	Pneumologie
Mr Claude HOUDAYER	HCN	Génétique
Mr Fabrice JARDIN	CHB	Hématologie
Mr Luc-Marie JOLY	HCN	Médecine d'urgence

Mr Pascal JOLY	HCN	Dermato – Vénérologie
Mme Bouchra LAMIA	Havre	Pneumologie
Mr Vincent LAUDENBACH	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Hervé LEFEBVRE	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry LEQUERRE	HCN	Rhumatologie
Mme Anne-Marie LEROI	HCN	Physiologie
Mr Hervé LEVESQUE	HCN	Médecine interne
Mme Agnès LIARD-ZMUDA	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves LITZLER	HCN	Chirurgie cardiaque
M. David MALTETE	HCN	Neurologie
Mr Christophe MARGUET	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle MARIE	HCN	Médecine interne
Mr Jean-Paul MARIE	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Stéphane MARRET	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique MERLE (<i>disponibilité</i>)	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre MICHEL	HCN	Hépto-gastro-entérologie
M. Benoit MISSET (<i>détachement</i>)	HCN	Réanimation Médicale
Mr Marc MURAINÉ	HCN	Ophtalmologie
Mr Gaël NICOLAS	UFR	Génétique
Mr Christian PFISTER	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe PLANTIER	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier PLISSONNIER	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Gaëtan PREVOST	HCN	Endocrinologie
Mr Jean-Christophe RICHARD (<i>détachement</i>)	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Vincent RICHARD	UFR	Pharmacologie
Mme Nathalie RIVES	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Horace ROMAN (<i>détachement</i>)	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe SABOURIN	HCN	Anatomie – Pathologie
Mr Mathieu SALAUN	HCN	Pneumologie
Mr Guillaume SAVOYE	HCN	Hépto-gastro-entérologie
Mme Céline SAVOYE-COLLET	HCN	Imagerie médicale

Mme Pascale SCHNEIDER	HCN	Pédiatrie
Mr Lilian SCHWARZ	HCN	Chirurgie Viscérale et Digestive
Mr Michel SCOTTE	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne TAMION	HCN	Réanimation médicale
Mr Luc THIBERVILLE	HCN	Pneumologie
Mr Sébastien	CB	Radiothérapie
M. Gilles TOURNEL	HCN	Médecine Légale
Mr Olivier TROST	HCN	Anatomie -Chirurgie Maxillo-Faciale
Mr Jean-Jacques TUECH	HCN	Chirurgie digestive
Mr Benoît VEBER chirurgicale	HCN	Anesthésiologie - Réanimation
Mr Pierre VERA	CHB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric VERIN	Les Herbiers	Médecine Physique et de Réadaptation
Mr Eric VERSPYCK	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier VITTECOQ	HCN	Rhumatologie
Mr David WALLON	HCN	Neurologie
Mme Marie-Laure WELTER	HCN	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme Najate ACHAMRAH	HCN	Nutrition
Mme Elodie ALESSANDRI-GRADT	HCN	Virologie
Mr Kévin ALEXANDRE	HCN	Maladies Infectieuses et Tropicales
Mme Noëlle BARBIER-FREBOURG	HCN	Bactériologie – Virologie
Mme Carole BRASSE LAGNEL	HCN	Biochimie
Mr Gérard BUCHONNET	HCN	Hématologie

Mme Mireille CASTANET	HCN	Pédiatrie
Mr Damien COSTA	HCN	Parasitologie
Mr Pierre DECAZES	CB	Médecine Nucléaire
Mr Maxime FONTANILLES	GHH	Oncologie Médicale
M. Vianney GILARD	HCN	Neurochirurgie
Mr Serge JACQUOT	UFR	Immunologie
Mr Joël LADNER	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste LATOUCHE	UFR	Biologie cellulaire
M. Florent MARGUET	HCN	Histologie
Mme Chloé MELCHIOR	HCN	Hépto-gastro-entérologie
M. Sébastien MIRANDA	HCN	Médecine Vasculaire
Mr Thomas MOUREZ (<i>détachement</i>)	HCN	Virologie
Mme Muriel QUILLARD	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mme Laëtitia ROLLIN	HCN	Médecine du Travail
Mme Pascale SAUGIER-VEBER	HCN	Génétique
M. Abdellah TEBANI	HCN	Biochimie et Biologie Moléculaire
Mme Anne-Claire TOBENAS-DUJARDIN	HCN	Anatomie
Mr Julien WILS	HCN	Pharmacologie

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mme Noémie MARIE	UFR	Communication
Mr Thierry WABLE	UFR	Communication
Mme Mélanie AUVRAY-HAMEL	UFR	Anglais
Mme Cécile POTTIER-LE GUELLEC	UFR	Anglais

II - PHARMACIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Mr Jérémy BELLIEN (PU-PH)	Pharmacologie
Mr Thierry BESSON	Chimie Thérapeutique
Mr Jean COSTENTIN (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Abdelhakim EL OMRI	Pharmacognosie
Mr François ESTOUR	Chimie Organique
Mr Loïc FAVENNEC (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre GOULLE (Professeur émérite)	Toxicologie
Mme Christelle MONTEIL	Toxicologie
Mme Martine PESTEL-CARON (PU-PH)	Microbiologie
Mr Rémi VARIN (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie VAUGEUIS	Pharmacologie
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

Mme Margueritta AL ZALLOUHA	Toxicologie
Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
Mr Frédéric BOUNOURE	Pharmacie Galénique
Mr Thomas CASTANHEIRO MATIAS	Chimie Organique
Mr Abdeslam CHAGRAOUI	Physiologie
Mme Camille CHARBONNIER (LE CLEZIO) (MCU-PH)	Statistiques
Mme Elizabeth CHOSSON	Botanique
Mme Marie Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Cécile CORBIERE	Biochimie
Mme Sandrine DAHYOT	Bactériologie
Mme Nathalie DOURMAP	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUC	Pharmacologie

Mr Gilles GARGALA (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Nejla EL GHARBI-HAMZA	Chimie analytique
Mr Chervin HASSEL	Virologie
Mme Maryline LECOINTRE	Physiologie
Mme Hong LU	Biologie
Mme Marine MALLETER	Biologie Cellulaire
M. Jérémie MARTINET (MCU-PH)	Immunologie
M. Romy RAZAKANDRAINIBÉ	Parasitologie
Mme Tiphaine ROGEZ-FLORENT	Chimie analytique
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Malika SKIBA	Pharmacie galénique

PROFESSEURS ASSOCIES

Mme Cécile GUERARD-DETUNCQ	Pharmacie officinale
Mme Caroline BERTOUX	Pharmacie officinale
M. Damien SALAUZE	Pharmacie industrielle

PAU-PH

M. Mikaël DAOUPHARS	Pharmacie
M. Pierre BOHN	Radiopharmacie

PROFESSEUR CERTIFIE

Mme Mathilde GUERIN	Anglais
----------------------------	---------

ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES

M. Eric BARAT	Pharmacie
M. Guillaume FEUGRAY	Biochimie Générale
M. Henri GONDÉ	Pharmacie
M. Paul BILLOIR	Hématologie
M. Romain LEGUILLON	Pharmacie
M. Thomas DUFLOT	Pharmacologie
Mme Alice MOISAN	Virologie

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

Mme Chaïma EZZINE	Pharmacologie
M. Abdelmounaim MOUHAJIR	Informatique Bio-informatique
M. Olivier PERRUCHON	Pharmacognosie
M. Maxime GRAND	Bactériologie

<h3>LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES</h3>

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry BESSON	Chimie thérapeutique
Mr Abdeslam CHAGRAOUI	Physiologie
Mme Elisabeth CHOSSON	Botanique
Mme Marie-Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation et économie de la santé
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Abdelhakim EL OMRI	Pharmacognosie
Mr François ESTOUR	Chimie organique
Mr Loïc FAVENNEC	Parasitologie
Mme Christelle MONTEIL	Toxicologie
Mme Martine PESTEL-CARON	Microbiologie
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mr Rémi VARIN	Pharmacie clinique
M. Jean-Marie VAUGEOIS	Pharmacologie
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

III – MEDECINE GENERALE

PROFESSEUR MEDECINE GENERALE

Mr Matthieu **SCHUERS** (PU-MG)

UFR Médecine générale

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTE

Mr Pascal **BOULET**

UFR Médecine générale

Mr Emmanuel **HAZARD**

UFR Médecine Générale

Mr Emmanuel **LEFEBVRE**

UFR Médecine Générale

Mme Elisabeth **MAUVIARD**

UFR Médecine générale

Mme Lucille **PELLERIN**

UFR Médecine Générale

Mme Yveline **SEVRIN**

UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTES

Mr Julien **BOUDIER**

UFR Médecine Générale

Mme Laëtitia **BOURDON**

UFR Médecine Générale

Mme Elsa **FAGOT-GRIFFIN**

UFR Médecine Générale

Mme Ségolène **GUILLEMETTE**

UFR Médecine Générale

Mr Frédéric **RENOU**

UFR Médecine Générale

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

PROFESSEURS

Mr Paul MULDER (phar)	Sciences du Médicament
Mme Su RUAN (med)	Génie Informatique

MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil ADRIOUCH (med)	Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)
Mr Jonathan BRETON (med)	Nutrition
Mme Gaëlle BOUGEARD-DENOYELLE (med)	Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)
Mme Carine CLEREN (med)	Neurosciences (Néovasc)
M. Sylvain FRAINEAU (med)	Physiologie (Inserm U 1096)
Mme Pascaline GAILDRAT (med)	Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)
Mme Rachel LETELLIER (med)	Physiologie
Mr Antoine OUVRARD-PASCAUD (med)	Physiologie (Unité Inserm 1076)
Mr Frédéric PASQUET	Sciences du langage, orthophonie
Mme Anne-Sophie PEZZINO	Orthophonie
Mme Christine RONDANINO (med)	Physiologie de la reproduction
Mr Youssan Var TAN	Immunologie
Mme Isabelle TOURNIER (med)	Biochimie (UMR 1079)

DIRECTEUR ADMINISTRATIF : M. Jean-Sébastien VALET

HCN - Hôpital Charles Nicolle

CB - Centre Henri Becquerel

CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation

HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME

CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray

SJ – Saint Julien Rouen

Par délibération en date du 3 mars 1967, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

TABLE DES MATIERES

Introduction	23
1. Epidémiologie du cancer colo-rectal	23
1.1 Incidence, mortalité	23
1.2 Facteurs de risque	23
2. Aspects histologiques et moléculaires du cancer colo-rectal	24
2.1 Classification OMS 2019	24
2.2 Bases moléculaires	27
2.3 Sous-types moléculaires	27
2.4 Micro-environnement immunitaire	28
3. Cancer colo-rectal et déficience du système MMR	28
3.1 Le système de réparation des mésappariements de l'ADN (système MMR)	28
3.2 Déficience du système MMR	29
3.2.1 Epidémiologie et causes	29
3.2.2 Incidence et pronostic	29
3.3 Méthodes d'étude	30
3.3.1 Immunohistochimie	30
3.3.2 Biologie moléculaire (PCR)	31
3.3.3 Concordance entre les deux méthodes	33
3.4 Terminologies	33
3.5 Enjeux de la détermination (et méthodes d'évaluation) du statut MMR tumoral dans le CCR	33
3.6 Particularités clinico-pathologiques des CCR dMMR	33
4. L'immunothérapie dans le cancer colo-rectal	35
4.1 Principe	35
4.2 Résultats des premiers essais cliniques	36
4.3 Biomarqueurs de réponse	36
5. La voie cellulaire cGAS – STING	37
5.1 Physiopathologie	37
5.2 STING et cancer colo-rectal	38
5.3 STING est activé dans CCR dMMR	38
5.4 STING, un potentiel biomarqueur de réponse à l'immunothérapie ?	39
5.5 ... et dans les autres cancers ?	40
5.6 Perspectives thérapeutiques	40
Objectif de l'étude	41

Matériel et Méthodes	42
1. Type d'étude	42
2. Population étudiée	42
2.1 Critères d'inclusion	42
2.2 Critères d'exclusion	42
2.3 Stratification	42
2.4 Mode de constitution de la cohorte	42
3. Recueil des données	43
3.1 Données cliniques	43
3.2 Données histologiques	43
3.3 Données de biologie moléculaire	43
3.3.1 Statut <i>BRAF</i>	43
3.3.2 Syndrome de Lynch	43
3.4 Détermination du statut MMR tumoral	44
3.4.1 Immunohistochimie des protéines MMR	44
3.4.2 Biologie moléculaire (PCR – test d'instabilité microsatellitaire)	45
3.5 Détection du statut mutationnel du gène <i>BRAF</i>	45
3.6 Immunohistochimie STING	46
3.6.1 Technique	46
3.6.2 Lecture et évaluation	46
4. Analyses statistiques	48
4.1 Taille de la cohorte	48
4.2 Tests statistiques	48
Accord du comité éthique local	48
Résultats	49
1. Caractéristiques de la population étudiée	49
2. Résultat de l'étude	52

Discussion	53
1. Points forts	53
1.1 Perspectives de l'immunomarquage STING	53
1.1.1 STING et CCR dMMR	53
1.1.2 STING et CCR pMMR	53
1.1.3 Sur échantillons biopsiques	56
1.1.4 Avantages de l'immunohistochimie	58
1.2 Comparaison à la littérature	59
1.3 Contrôle des biais	60
1.3.1 Biais de sélection	60
1.3.2 Biais d'information	60
2. Limites	61
3. Perspectives	61
Annexes	62
<i>Annexe 1. Classification pTNM des carcinomes colo-rectaux</i> (8 ^{ème} édition – UICC 2017)	62
<i>Annexe 2. Stade tumoral des carcinomes colo-rectaux</i> (8 ^{ème} édition - UICC 2017)	62
<i>Annexe 3. Classification OMS 2019</i> (5 ^{ème} édition) des tumeurs épithéliales (non neuro- endocrines) malignes du colon et du rectum	63
Bibliographie	64

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	acide désoxyribo-nucléique
<i>APC</i>	<i>adenomatous polyposis coli</i>
<i>BRAF</i>	proto-oncogène B-Raf / <i>v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B</i>
CCR	cancer colo-rectal
CIMP	<i>CpG Island Methylator Phenotype</i>
CIN	instabilité chromosomique
CMS	sous-classe moléculaire
CTLA4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule
FDA	Food and Drug Administration
GLOBOCAN	Global Cancer Observatory
HES	Hemalun Eosine Safran
ICI	inhibiteurs des points de contrôle immunitaire
IHC	immunohistochimie
<i>KRAS</i>	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene</i>
MLH1	mutL homologue 1
MMR	<i>mismatch repair</i> (réparation des mésappariements)
MSH2	mutS homologue 2
MSH6	mutS homologue 6
MSI	instabilité microsatellitaire
MSS	stabilité microsatellitaire
NOS	<i>not otherwise specified</i> (sans autre spécification)
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAF	polypose adénomateuse familiale
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PD1	<i>program death 1</i>
PDL1	<i>program death ligand – 1</i>
PMS2	post-meiotic segregation increased 2
P53	protéine 53
<i>POL D1</i>	DNA polymerase delta 1
<i>POL E</i>	DNA polymerase epsilon
RECIST	<i>response evaluation criteria in solid tumours</i>
<i>SMAD4</i>	<i>mothers against decapentaplegic homolog 4</i>
STING	STimulator of INterferon Genes
TILs	lymphocytes infiltrant la tumeur
WHO	World Health Organization

INTRODUCTION

1. EPIDEMIOLOGIE DU CANCER COLO-RECTAL

1.1 Incidence, mortalité

En 2018, le cancer colo-rectal représentait, à l'échelle mondiale, le troisième cancer en termes d'incidence (environ 1.800 000 cas) et le deuxième cancer en termes de mortalité (environ 860.000 décès) selon les chiffres publiés par l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (GLOBOCAN) (1). Sur les 30 dernières années, l'incidence et le nombre de décès par cancer colo-rectal ont doublé dans la plupart des pays (2).

En France, d'après les projections réalisées pour l'année 2018, il s'agit également du troisième cancer en termes d'incidence (environ 43.000 nouveaux cas) et du deuxième cancer en termes de mortalité (environ 17.000 décès) (3).

1.2 Facteurs de risque

Les facteurs de risque de cancer colo-rectal se répartissent en deux catégories :

- liés au **mode de vie** (modifiables), qui incluent principalement : la consommation de tabac et d'alcool, l'obésité, le manque d'activité physique, une alimentation pauvre en lait, en calcium et en fibres mais riche en viande rouge (2, 3). A titre d'exemple, en France, en 2015, l'alcool était jugé responsable d'environ 21% des cancers colo-rectaux chez les plus de 30 ans (3) ;

- et les **syndromes de prédisposition génétique** (acquis, non modifiables), qui concernent 2 à 5% des cancers colo-rectaux. Les deux plus fréquents sont : le syndrome de Lynch (*cf infra*, chapitre 3.2.1, page 29) et la polypose adénomateuse familiale (ou PAF, de transmission autosomique dominante, liée à une mutation germinale du gène suppresseur de tumeur *APC : adenomatous polyposis coli*) (4).

2. ASPECTS HISTOLOGIQUES ET MOLECULAIRES DU CANCER COLO-RECTAL

2.1 Classification OMS 2019

La cinquième classification de l'Organisation Mondiale de la Santé des tumeurs digestives a été publiée en 2019 (5). Les adénocarcinomes représentent plus de 90% des cancers colo-rectaux (*Annexe 1*).

La majorité des adénocarcinomes colo-rectaux correspond à des **adénocarcinomes sans autre spécification** (*not otherwise specified* en anglais ou **NOS**, anciennement dénommé « lieberkhünien »), dont le grade tumoral est établi comme suit :

- **bas grade** (regroupe les anciennes catégories « bien différencié » et « moyennement différencié ») si plus de 50% de la tumeur est composée de structures glandulaires (*Figure 1a*) ;
- **haut grade** (correspond à l'ancienne catégorie « peu différencié ») si moins de 50% de la tumeur est composée de structures glandulaires (*Figure 1b*).

Plusieurs sous-types histologiques sont individualisés, dont deux méritent une attention particulière dans le cadre de ce travail :

- les **adénocarcinomes mucineux**

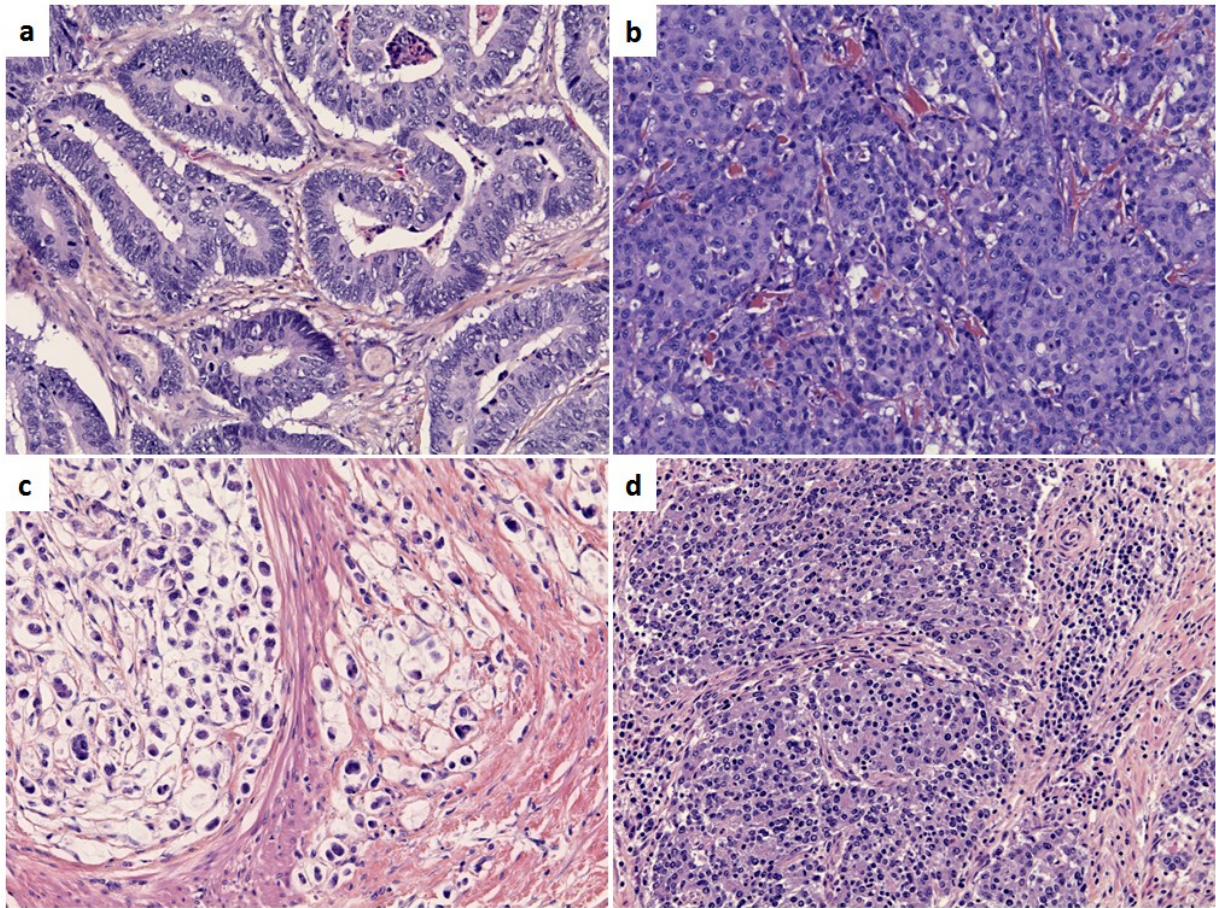
Il s'agit du sous-type le plus fréquent, dont le diagnostic ne peut être établi que si plus de 50% de la tumeur est composée de flaques de mucine extra-cellulaire contenant des cellules tumorales (isolées ou en amas) (*Figure 1c*). Si les aspects concernent moins de 50% de la tumeur, la dénomination « adénocarcinome avec composante mucineuse » sera employée. Ce sous-type n'a pas d'incidence pronostique.

- les **carcinomes médullaires**

Morphologiquement, la tumeur est constituée d'amas de cellules tumorales aux noyaux vésiculeux, avec un nucléole proéminent, et aux cytoplasmes éosinophiles abondants (*Figure 2b*), auxquels s'ajoute un abondant infiltrat inflammatoire, essentiellement fait de lymphocytes et de polynucléaires neutrophiles (*Figures 1d et 2a*).

En immunohistochimie, la tumeur présente souvent un phénotype « aberrant », se caractérisant par une perte d'expression de la cytokératine 20 (CK20) et du CDX2 (*Figures 2c et 2d*) dont la positivité (CK20+/CDX2+) est classiquement associée à une différenciation intestinale. Ce sous-type est associé à un meilleur pronostic.

Des corrélations morpho-moléculaires en fonction des différents types histologiques ont été établies (5, 6). Ainsi, les adénocarcinomes NOS de haut grade, les adénocarcinomes mucineux et les carcinomes médullaires sont plus fréquemment associés à une déficience du système de réparation des mésappariements de l'ADN (*cf infra*, chapitre 3.6, page 33).



Photographies issues du Service de Pathologie du CHU de Rouen – Guillaume Scellier

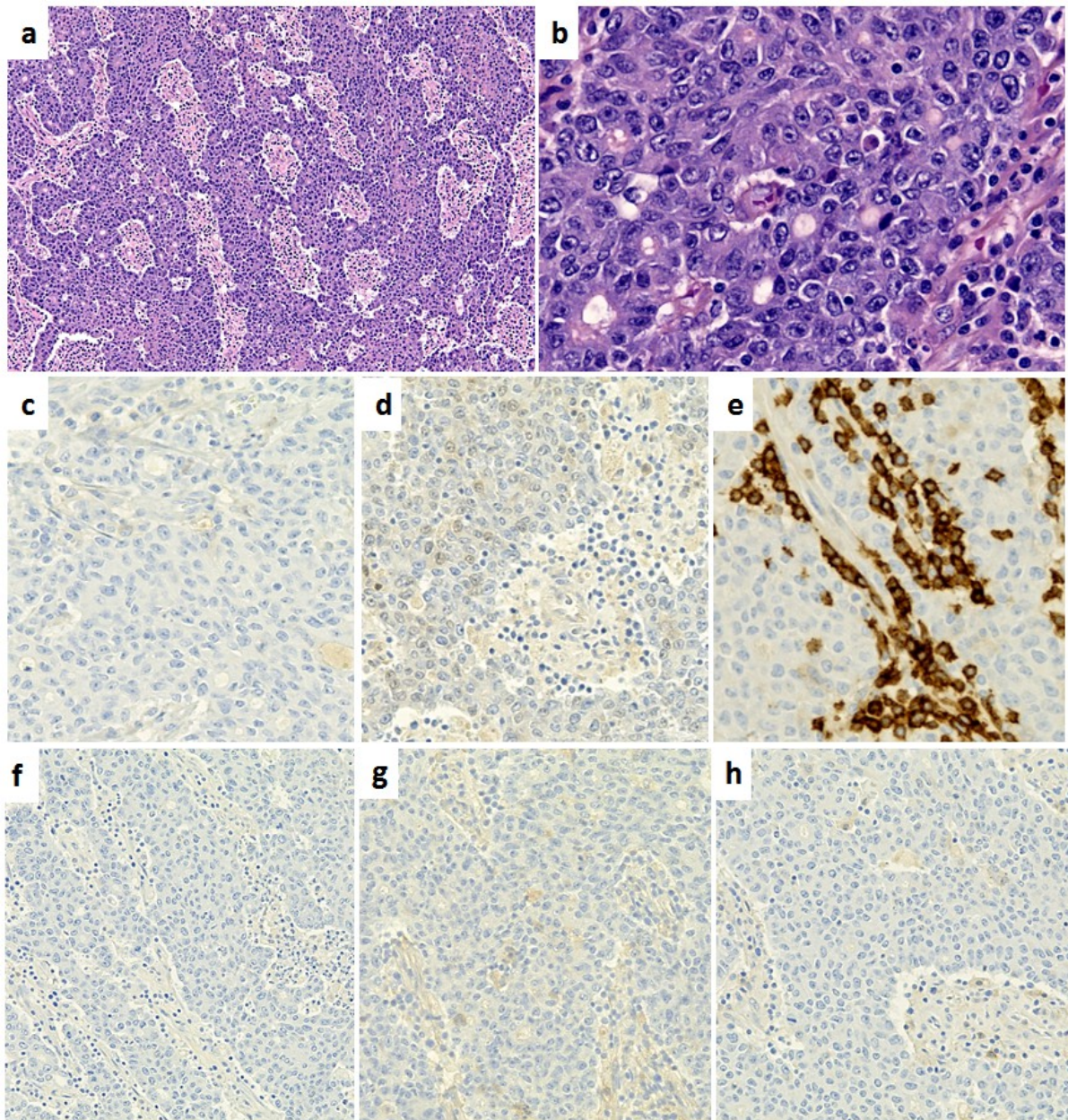
Figure 1 illustrant les aspects morphologiques des adénocarcinomes colo-rectaux selon la classification OMS 2019 (5^{ème} édition).

a. adénocarcinome (NOS) de bas grade (> 50% de la tumeur est composée de structures glandulaires), coupe colorée à l'Hemalun Eosine Safran (HES) (grossissement x200),

b. adénocarcinome (NOS) de haut grade (< 50% de la tumeur est composée de structures glandulaires), coupe colorée à l'HES (grossissement x200),

c. adénocarcinome mucineux (infiltrant la musculuse), coupe colorée à l'HES (grossissement x200),

d. carcinome médullaire, coupe colorée à l'HES (grossissement x200). Noter la présence de très nombreux lymphocytes intra-tumoraux, caractéristiques de ce type histologique, qui constituent l'un des éléments permettant le diagnostic différentiel avec un adénocarcinome NOS de haut grade.



Photographies issues du Service de Pathologie du CHU de Rouen – Guillaume Scellier

Figure 2 illustrant les aspects morphologiques (a, b) et immunohistochimiques (c-f) particuliers du carcinome médullaire.

a et b. Coupes colorées à l'HES (grossissements x100 (a) et x400 (b)) montrant les caractéristiques architecturales (a) et cytologiques (b) particulières de ce sous-type : les cellules tumorales possèdent un cytoplasme éosinophile abondant et un noyau à la chromatine vésiculeuse, avec un nucléole proéminent.

c et d. Pertes d'expression immunohistochimique de la **cytokératine 20** (c) et de **CDX2** (d). Noter le marquage d'intensité très faible (à l'état de traces) de quelques noyaux (d) : ce marquage est considéré négatif.

e. **Immunomarquage CD3** illustrant la richesse en lymphocytes T intra-tumoraux.

f – h. Absence d'expression immunohistochimique des marqueurs neuro-endocrines (permettant le diagnostic différentiel avec un carcinome neuro-endocrine) : **chromogranine A** (f), **synaptophysine** (g) et **CD56** (h).

2.2 Bases moléculaires

La carcinogénèse colo-rectale résulte de la séquence adénome – dysplasie – carcinome infiltrant, dont chaque étape est médiée par l'acquisition successive d'altérations moléculaires (Figure 3).

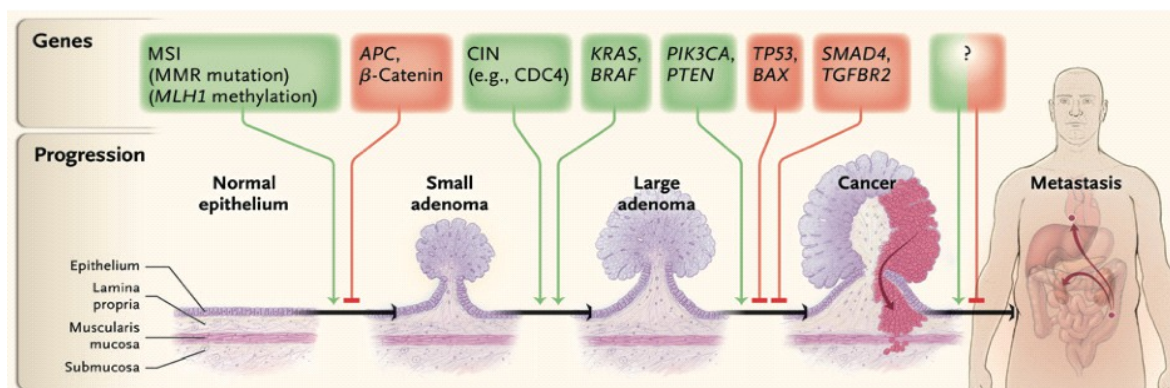


Figure 3 (issue de (7)) illustrant la **séquence adénome – cancer infiltrant**, médiée par l'acquisition successive d'altérations moléculaires.

Trois grands mécanismes d'instabilité génomique conduisant à la carcinogénèse colo-rectale sont décrits :

- *l'instabilité chromosomique (CIN)*, le plus fréquent, correspond à des modifications de structure ou du nombre des chromosomes au niveau des cellules tumorales, entraînant la perte d'un allèle sauvage d'un gène suppresseur de tumeur (ex. *APC*, *P53*, *SMAD4*) ;
- *l'inactivation de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN*, et en particulier des mésappariements de bases, aussi appelé système MMR (*MisMatch Repair*), conduisant à l'instabilité microsatellitaire (MSI). Ce point est abordé au chapitre 3 (page 28) ;
- *épigénétique*, lié à des troubles de la méthylation de l'ADN conduisant au silençage épigénétique dans les îlots CpG (CIMP : CpG Island Methylator Phenotype).

Ces mécanismes ne sont pas mutuellement exclusifs et peuvent être intriqués au sein d'une tumeur. Ainsi le gène *MLH1* (impliqué dans la réparation de l'ADN) peut être inactivé par hyperméthylation de son promoteur (mécanisme épigénétique) (7).

2.3 Sous-types moléculaires

Un consensus international sur les sous-types moléculaires (CMS) de cancers colo-rectaux a été publié en 2015.

Les cancers colo-rectaux avec instabilité microsatellitaire (CCR MSI) appartiennent dans 76% des cas au sous-type moléculaire 1 (CMS 1 - MSI immun). Ils correspondent à des tumeurs de haut grade, hypermutées, exprimant fortement les gènes favorisant un infiltrat immunitaire diffus (lymphocytes T cytotoxiques, NK ou *natural killer*, Th1 et T *follicular helper*), souvent localisées au niveau du colon ascendant, chez des femmes et avec mutations du gène *BRAF*.

Dans une moindre mesure (16% d'entre eux), les CCR MSI sont également identifiés au sein du sous-type moléculaire 3 (CMS 3 - métabolique), enrichie en mutations du gène *KRAS* (8).

2.4 Micro-environnement immunitaire

Les lymphocytes associés aux tumeurs (TILs) font partie intégrante du micro-environnement immunitaire de la tumeur. Ils sont identifiés (à l'aide de profils d'expression métagéniques) dans la majorité (jusqu'à 96%) des cancers colo-rectaux, mais leur incidence pronostique dépend de leur nature. Les lymphocytes T CD8+, CD4+, les lymphocytes NK et les cellules dendritiques activées (immunostimulateurs) sont associés à un bon pronostic tandis que les lymphocytes T régulateurs, Th17, les mastocytes et les cellules suppressives dérivées de la lignée myéloïde (immunosuppresseurs) sont associés à un mauvais pronostic (9).

Dans les cancers du colon de stades I – III, l'infiltrat inflammatoire lymphocytaire T (CD3+ et cytotoxique CD8+) au sein de la tumeur et au niveau du front d'invasion (calculé à l'aide d'un score immunologique appelé *Immunoscore*) est associé de façon indépendante au risque de récurrence, à la survie sans maladie (en anglais « *disease free survival* » ou DFS) et à la mortalité toute cause. Sa valeur prédictive sur la survie dépasse celle du TNM (10).

3. CANCER COLO-RECTAL ET DEFICIENCE DU SYSTEME MMR

3.1 Le système de réparation des mésappariements de l'ADN (système MMR)

Le système de réparation des mésappariements de l'ADN (ou MMR : *MisMatch Repair*) est impliqué dans la reconnaissance et la réparation des insertions, délétions et mésappariements de l'ADN qui peuvent survenir lors de la réplication de l'ADN au cours de la division cellulaire.

Il est constitué de quatre protéines, qui sont codées par quatre gènes : *MLH1* (mutL homologue 1), *MSH2* (mutS homologue 2), *MSH6* (mutS homologue 6) et *PMS2* (post-meiotic segregation increased 2). Ces protéines fonctionnent par couple (ou hétérodimères) : MLH1/PMS2 et MSH2/MSH6 (*Figure 4*, 11-13).

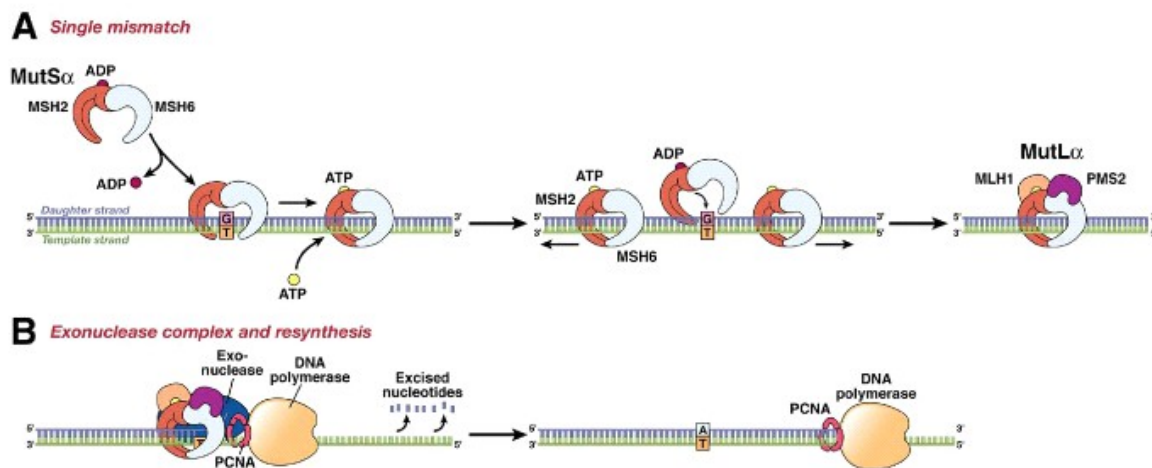


Figure 4 (issue de (13)) illustrant la *réparation des mésappariements de l'ADN par le système MMR*. Le système MMR fonctionne par hétérodimères *MLH1/PMS2* et *MSH2/MSH6*.

3.2 Déficience du système MMR

3.2.1 Epidémiologie et causes

Environ 15% des cancers colo-rectaux possèdent un système MMR déficient :

- 12% sont d'origine **somatique**, résultant d'une hyperméthylation (acquise) du promoteur du gène *MLH1* (le plus souvent induite par une mutation du gène *BRAF*) ;

- 3% sont d'origine **constitutionnelle** : le plus souvent, il s'agit d'une mutation germinale mono-allélique (de transmission autosomique dominante) de l'un des quatre gènes du système MMR, correspondant alors au **syndrome de Lynch** (ou à ses variants, en fonction du spectre clinique : syndrome de Muir-Torres en cas d'association à des tumeurs des glandes des annexes cutanées, et syndrome de Turcot, en cas d'association à des tumeurs du système nerveux central). C'est alors l'inactivation du 2nd allèle (par un événement somatique) qui conduira à la déficience du système MMR.

Il est à noter que de rares cas sont liés à des délétions germinales du gène *EpCAM*, conduisant à une inactivation épigénétique du gène *MSH2* (11, 14).

Le syndrome de Lynch est associé à une importante augmentation du risque de cancer colo-rectal au cours de la vie des patients qui en sont atteints, estimé (en fonction de la mutation pathogène et des facteurs de risque liés au mode de vie) entre 30 et 70%. Le spectre des autres tumeurs inclut, de façon non exhaustive : les cancers de l'endomètre, de l'ovaire, de l'estomac, de l'intestin grêle, du pancréas et des voies urinaires excrétrices.

Très rarement, il peut s'agir de mutations germinales bi-alléliques de l'un des 4 gènes des protéines MMR, correspondant au syndrome CMMRD (déficience constitutionnelle du système MMR). (11)

3.2.2 Incidence et pronostic

L'incidence d'un système MMR tumoral déficient (dMMR) dans le cancer colo-rectal varie en fonction du stade. Alors qu'il concerne environ 20% des CCR de stades I-II, seuls 12% et 4-5% des CCR de stades III et IV (respectivement) sont dMMR. Par ailleurs, au stade métastatique, les CCR dMMR sont de plus mauvais pronostic que les CCR pMMR (15).

3.3 Méthodes d'étude

Deux méthodes d'études sont actuellement recommandées par les sociétés savantes françaises (12) et européennes (16) : l'immunohistochimie et la biologie moléculaire.

3.3.1 Immunohistochimie (IHC)

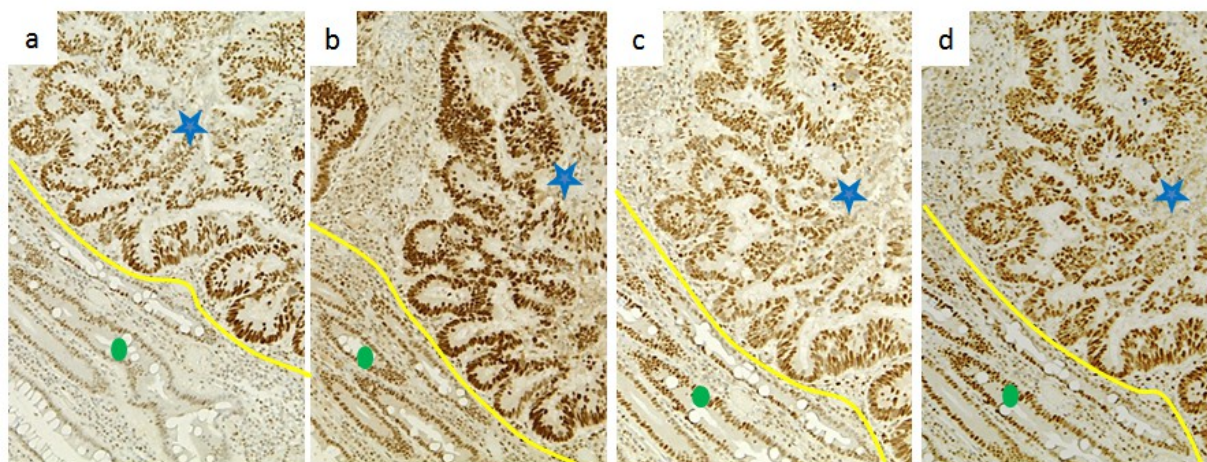
Il s'agit de la méthode réalisée en première intention. Il est recommandé (11, 12) d'étudier les quatre protéines du système MMR : MLH1, PMS2, MSH2 et MSH6 (*Figures 5 et 6*).

Les avantages de cette méthode sont nombreux :

- rapidité de la technique ;
- facilité d'interprétation ;
- possibilité de réalisation sur des prélèvements de petite taille et/ou comportant peu de cellules tumorales ;
- possibilité d'une analyse spatiale de l'expression protéique au sein de la tumeur (en cas d'hétérogénéité intra-tumorale) et d'une analyse qualitative des résultats (protéine(s) non exprimée(s)). (*Figure 6*)

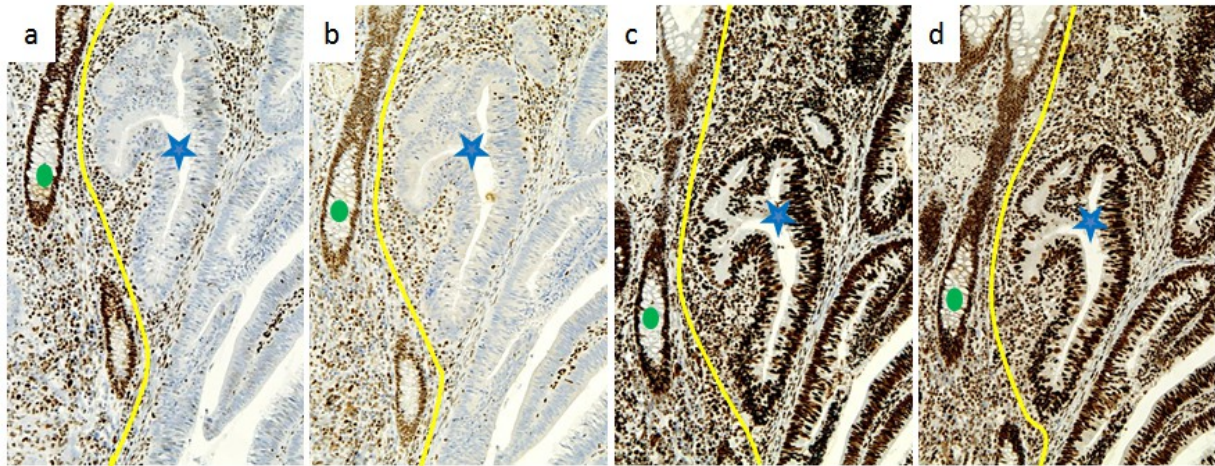
Les limites de cette méthode sont, lors de l'interprétation des résultats :

- les faux négatifs, fréquemment liés à une sous-fixation du prélèvement ;
- et, plus rarement, les faux positifs, liés à des protéines intactes sur le plan de la réaction antigénique, mais catalytiquement inactives du fait de mutations faux-sens (11).



Photographies issues du Service de Pathologie du CHU de Rouen – Guillaume Scellier

Figure 5 illustrant un **adénocarcinome (NOS) infiltrant de bas grade** (étoile bleue) de statut **pMMR en immunohistochimie (pMMR-IHC)** (grossissement x200), se traduisant par la conservation du marquage nucléaire au niveau des cellules tumorales avec les anticorps anti-MLH1 (a), anti-PMS2 (b), anti MSH2 (c) et anti-MSH6 (d). Le front d'invasion de la tumeur par rapport à la muqueuse colique normale adjacente (point vert) est délimité par la ligne jaune. Noter le témoin interne positif (signal nucléaire) au niveau de la muqueuse normale adjacente, ainsi qu'au niveau de l'infiltrat inflammatoire au sein du stroma tumoral.



Photographies issues du Service de Pathologie du CHU de Rouen – Guillaume Scellier

Figure 6 illustrant un adénocarcinome (NOS) infiltrant de bas grade (étoile bleue) de statut dMMR en immunohistochimie (dMMR-IHC) (grossissement x200), se traduisant une perte d'expression du signal nucléaire au niveau des cellules tumorales par les anticorps anti-MLH1 (a) et anti-PMS2 (b), tandis que le signal nucléaire au niveau des cellules tumorales avec les anticorps anti-MSH2 (c) et anti-MSH6 (d) est conservé. Le front d'invasion de la tumeur par rapport à la muqueuse colique normale adjacente (point vert) est délimité par la ligne jaune. Noter le témoin interne positif (signal nucléaire) au niveau de la muqueuse normale adjacente.

3.3.2 Biologie moléculaire (PCR)

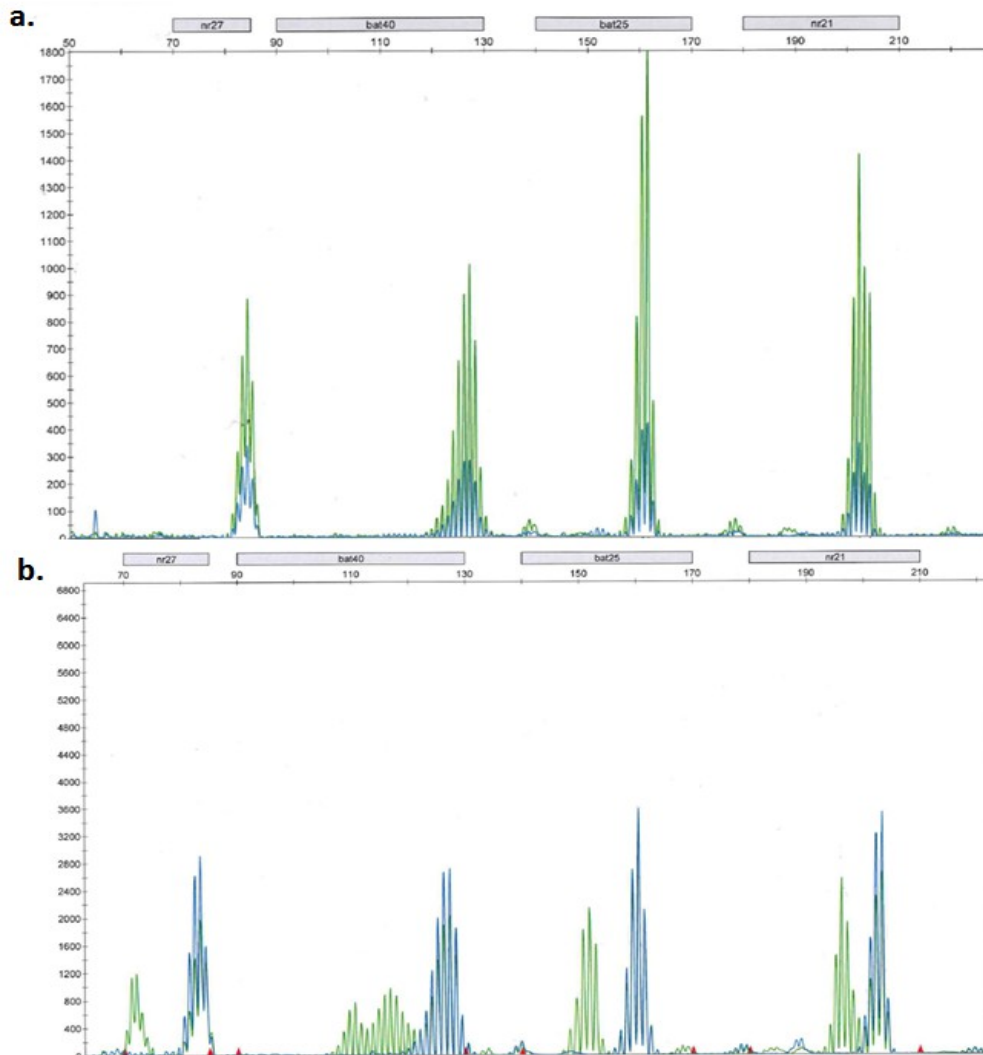
La biologie moléculaire par PCR (*polymerase chain reaction*) est réservée, dans le cadre du cancer colo-rectal, aux cas suivants : difficultés d'interprétation et/ou discordance de l'étude immunohistochimique, perte d'expression immunohistochimique d'une sous-unité d'un hétérodimère (par exemple uniquement MLH1) (11, 12).

Les techniques de biologie moléculaire s'appuient sur l'analyse de la longueur (en paires de bases) des microsatellites (anciennement appelé « test RER » pour *Replication ERrors*). Les microsatellites sont des séquences répétitives d'ADN, de 1 à 6 bases (ou courtes répétitions en tandem), distribuées au sein du génome dans les régions codantes et non codantes. Pour un même individu, les microsatellites sont de même longueur (nombre de bases), mais les longueurs varient entre différents individus. Etant donnée leur nature répétitive, ils constituent une zone privilégiée d'erreurs au moment de la réplication de l'ADN, se traduisant alors sur le plan phénotypique par des altérations de leur longueur en cas d'anomalies du système de réparation des mésappariements (MMR) : cela correspond à l'instabilité microsatellitaire (MSI). Cette condition, traduisant l'absence de réparation des mésappariements de l'ADN, est ainsi associée à une hypermutabilité au sein de la tumeur (ou charge mutationnelle élevée).

Le principe de la recherche d'une instabilité microsatellitaire est de comparer les profils d'amplification dans des régions d'intérêt (en l'occurrence, microsatellites) entre du tissu tumoral (TT) et du tissu non tumoral (ou tissu normal : TN). La comparaison porte sur la longueur des fragments amplifiés par PCR après migration sur séquenceur automatique d'ADN.

En l'absence d'instabilité microsatellitaire au niveau du tissu tumoral, les profils d'amplification entre le tissu tumoral (en bleu, par convention) et le tissu normal (en vert, par convention) sont tout à fait superposables (*Figure 7a*). A l'inverse, une instabilité microsatellitaire se traduit par des pics surnuméraires au niveau du profil d'amplification du tissu tumoral (*Figure 7b*).

Il est recommandé, à l'heure actuelle, d'utiliser le panel NCI-Pentaplex (BAT-25, BAT-26, NR21, NR22 ou NR27/Mono-27, NR24), avec un seuil d'au moins 2 marqueurs instables sur 5, à partir d'échantillons comportant au moins 20% de cellules tumorales (risque de faux négatif sinon) (12).



Photographies issues du Service de Génétique Somatique des Tumeurs du CHU de Rouen – Guillaume Scellier

Figure 7 illustrant les **résultats de deux tests (a et b) d'instabilité microsatellitaire**.

La **figure 7a** (au-dessus) montre une superposition des profils d'amplification matérialisés par les courbes bleues (tissu tumoral) et vertes (tissu normal) au niveau des régions d'intérêt (NR27, BAT40, BAT25 et NR21), correspondant à une **stabilité microsatellitaire (MSS)**.

A l'inverse, la **figure 7b** (en-dessous) met en évidence la présence de pics surnuméraires au niveau des profils d'amplification du tissu tumoral dans les régions d'intérêt (courbe bleue) par comparaison au tissu normal du patient (courbe verte). Cela traduit une **instabilité microsatellitaire (MSI)**.

3.3.3 Concordance entre les deux méthodes

Le taux de concordance entre la méthode immunohistochimique et la biologie moléculaire varie de 90% (15) à 99% (17) selon les études.

3.4 Terminologies

Une **tumeur dMMR** correspond à un statut MMR tumoral déficient, qui ne pourra être affirmé qu'après réalisation des deux techniques (immunohistochimie et biologie moléculaire). En effet, si seulement l'une des deux techniques est réalisée, les résultats du statut MMR tumoral devront être précisés de la façon suivante : tumeur **dMMR-IHC** (étude immunohistochimique seule) ou tumeur **MSI** (étude biologie moléculaire par PCR seule).

De la même façon, la terminologie suivante est appliquée pour les tumeurs avec un système MMR fonctionnel («proficient» en anglais), correspondant aux **tumeurs pMMR**, combinaison d'un résultat **pMMR-IHC** (étude immunohistochimique) et **MSS** (étude de biologie moléculaire) (12).

Il est par ailleurs recommandé d'abandonner les termes « MSI-high » et « MSI-low », les tumeurs « MSI-low » devant être intégrées aux tumeurs MSS (11).

3.5 Enjeux de la détermination du statut MMR tumoral dans le CCR

Actuellement, les enjeux de la détermination du statut MMR tumoral dans le CCR sont multiples mais peuvent se résumer en deux grands cadres :

- **diagnostique** (ou oncogénétique), afin d'identifier les patients potentiellement porteurs d'un syndrome de Lynch. Dans cette situation, le dépistage par test IHC (de tous les cancers colo-rectaux) avec confirmation par PCR en cas de résultat anormal est préconisé. L'algorithme ci-dessous (*Figure 8*, page 33) résume la conduite à tenir ;

- **théranostique** : prescription de chimiothérapie adjuvante dans les CCR de stade II (indiquée si tumeur pMMR, non indiquée si tumeur dMMR), et d'immunothérapie dans les CCR métastatiques (stade IV) (12, 15). Les recommandations américaines et françaises sont en désaccord sur la méthode à utiliser dans ce cadre : tandis que le Collège Américain des Pathologistes (18) considère que l'un des deux tests (IHC ou PCR) suffit, les recommandations françaises (12) préconisent d'effectuer les deux tests.

3.6 Particularités clinico-pathologiques des CCR dMMR

Les CCR dMMR possèdent des caractéristiques clinico-pathologiques distinctes par comparaison aux CCR pMMR. Les caractéristiques pathologiques associées au statut dMMR sont : la localisation au niveau du colon droit, le sous-type mucineux, une quantité augmentée de lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs) et la présence d'une réaction inflammatoire de type Crohn-like (19).

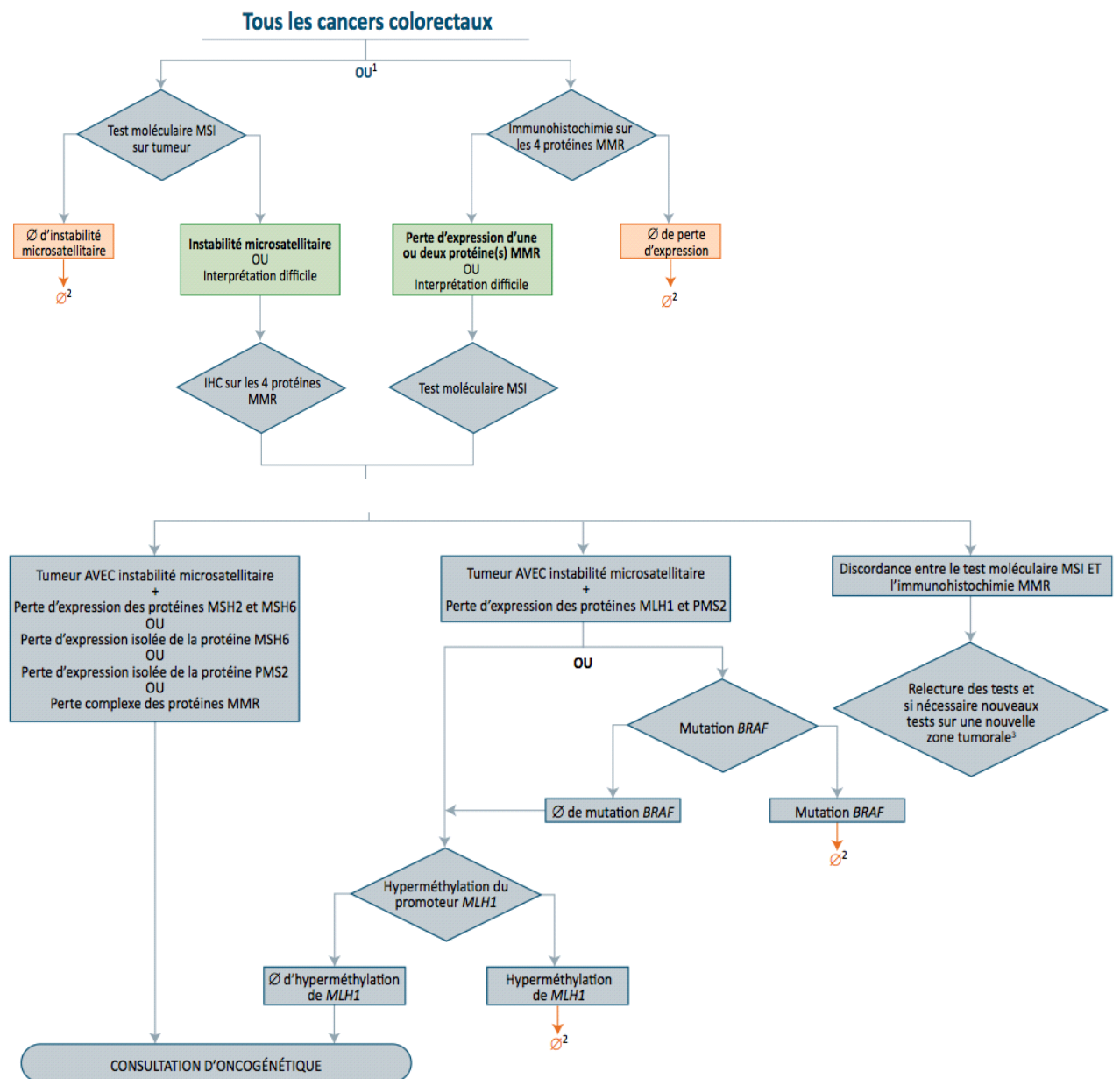


Figure 8 : Algorithme de détermination du statut MMR tumoral dans le cancer colo-rectal selon les recommandations de l'INCa publiées en novembre 2021 (issu de 12)

4. L'IMMUNOTHERAPIE DANS LE CANCER COLO-RECTAL

4.1 Principe

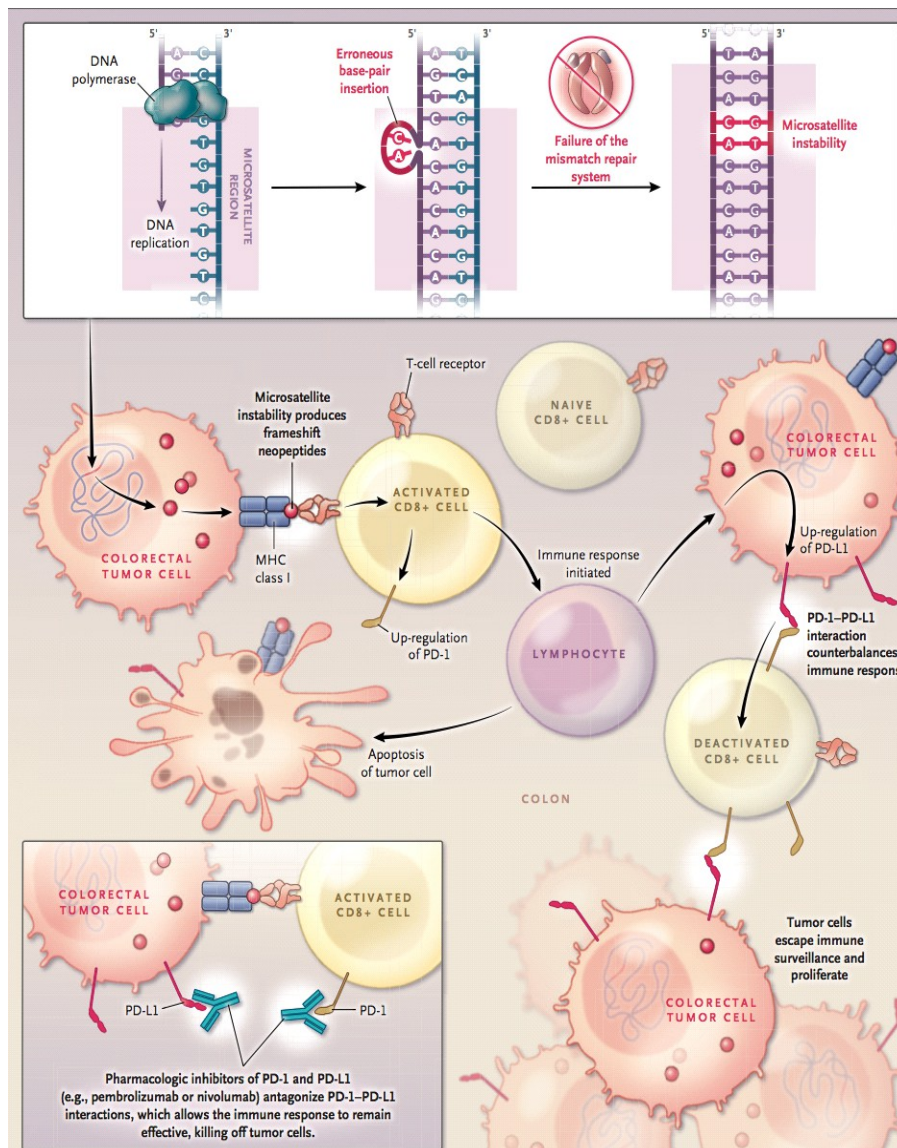


Figure 9 (issue de 14) illustrant les principes physiopathologiques de la prescription des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire dans les cancers colo-rectaux avec déficience du système MMR.

La déficience du système MMR (*en haut*) entraîne la synthèse (aberrante, par décalage du cadre de lecture) de néo-peptides agissant comme antigènes, qui induisent une stimulation de l'immunité anti-tumorale médiée par les lymphocytes T CD8+ (cytotoxiques). L'immunité anti-tumorale est contrebalancée par des mécanismes d'échappement au système immunitaire par les cellules tumorales via l'interaction PD1-PDL1 (*au centre*). Ceci est à la base de l'immunothérapie par inhibiteurs des « checkpoints » (ou points de contrôle) immunitaires (anti-PD1 et anti-PDL1) (*en bas à gauche*) (14).

4.2 Résultats des premiers essais cliniques

Ces bases physiopathologiques ont conduit au premier essai, publié en 2015. Il s'agissait d'un essai de phase II, mené sur 32 patients, qui a montré l'efficacité du pembrolizumab (anticorps monoclonal anti-PD1) dans le CCR dMMR (versus pMMR) au stade métastatique chez des patients réfractaires à au moins deux lignes de traitement par chimiothérapie (20). Ces résultats ont été confirmés par un deuxième essai de phase II (CheckMate 142) conduit sur 74 patients et publié en 2017 (21).

Ces données ont permis, le 23 mai 2017, à la Food and Drug Administration (FDA) d'approuver l'immunothérapie par ICI (pembrolizumab, Keytruda®) dans les tumeurs solides métastatiques (ou non résecables) dMMR, après échec des autres thérapeutiques ou en l'absence d'alternative (22).

Un autre essai de phase II a validé (en termes d'efficacité et de tolérance) la combinaison de deux ICI, le nivolumab (anti-PD1) et l'ipilimumab (anti-CTLA4) chez des patients atteints d'un cancer colo-rectal métastatique dMMR, préalablement traités (ou non) par chimiothérapie (23).

L'essai de phase III *Keynote* 177, réalisé sur 307 patients atteints d'un cancer colo-rectal en phase métastatique dMMR n'ayant pas reçu de traitement préalable, a montré la supériorité (sur le critère survie sans progression) de l'immunothérapie par pembrolizumab (en monothérapie) en première ligne versus chimiothérapie classique (24). Une réponse (partielle ou complète) (selon les critères RECIST 1.1) était observée chez 44% des patients traités par immunothérapie. Néanmoins, **30%** des patients présentaient une **résistance primaire au pembrolizumab en monothérapie**, contre seulement 12% pour la chimiothérapie «classique» (24). Cet essai a permis l'obtention de l'AMM et du remboursement du pembrolizumab (Keytruda®) dans cette indication (CCR dMMR non résecables) en France le 21 janvier 2021 (25).

4.3 Biomarqueurs prédictifs de réponse

En 2023, les biomarqueurs existants manquent, pris isolément, de robustesse :

- l'origine (somatique ou constitutionnelle) du statut dMMR n'était pas associée à une différence de réponse à l'immunothérapie par ICI dans l'essai CheckMate 142 (21, 23) ;
- l'expression de **PDL1** (au niveau des cellules immunitaires) n'était pas non plus associée à la réponse à l'immunothérapie dans ce même essai (21, 23) ;
- l'augmentation du nombre de **TILs** était rétrospectivement associée à une meilleure réponse à l'immunothérapie (26) ;
- une **charge mutationnelle élevée**, bien qu'intéressante dans certains types de cancers (tête et cou, pulmonaire non à petites cellules et mélanome), est surpassée dans le cancer colo-rectal par le statut dMMR tumoral et POLE muté (27). Le Collège Américain des Pathologistes a d'ailleurs recommandé, en 2022, de ne pas utiliser ce biomarqueur dans le CCR (18) ;
- le statut tumoral des gènes *KRAS* et *BRAF* n'était pas associé à la réponse à l'immunothérapie dans l'essai CheckMate 142 (23, 24) ;
- la composition du **microbiote** semble également être associée à la réponse à l'immunothérapie dans le cancer colo-rectal (28) comme cela a déjà été montré dans d'autres types de cancers (mélanome, cancer bronchique non à petites cellules et cancer du rein).

L'étude de nouveaux biomarqueurs apparaît ainsi nécessaire.

5. LA VOIE CELLULAIRE cGAS – STING

5.1 Physiopathologie

La protéine STING (STimulator of INterferon Genes), codée par le gène *TMEM173*, a été découverte en 2008 (29). Elle appartient à la voie cGAS-STING, qui en réponse à la détection d'ADN double brin au sein du cytoplasme, qu'il soit d'origine exogène (micro-organismes) ou endogène, induit une réponse inflammatoire médiée par les interférons de type I. Cette voie joue un rôle important dans l'immunité anti-tumorale, y compris après administration d'immunothérapies (30, 31). Localisée au niveau du réticulum endoplasmique, la protéine STING est activée soit par détection d'ADN double brin au niveau du cytoplasme, soit par la protéine cGAS (cyclic GMP AMP synthase) qui est un capteur d'ADN cytosolique dont le second messager est cGAMP. STING forme ensuite un complexe avec la protéine TBK1 (TANK binding kinase 1), qui va ensuite activer par phosphorylation IRF3 et le facteur de transcription NfκB (Figure 10). Cela aboutit à l'expression de gènes impliqués dans réponse inflammatoire médiée par les interférons de type I (31).

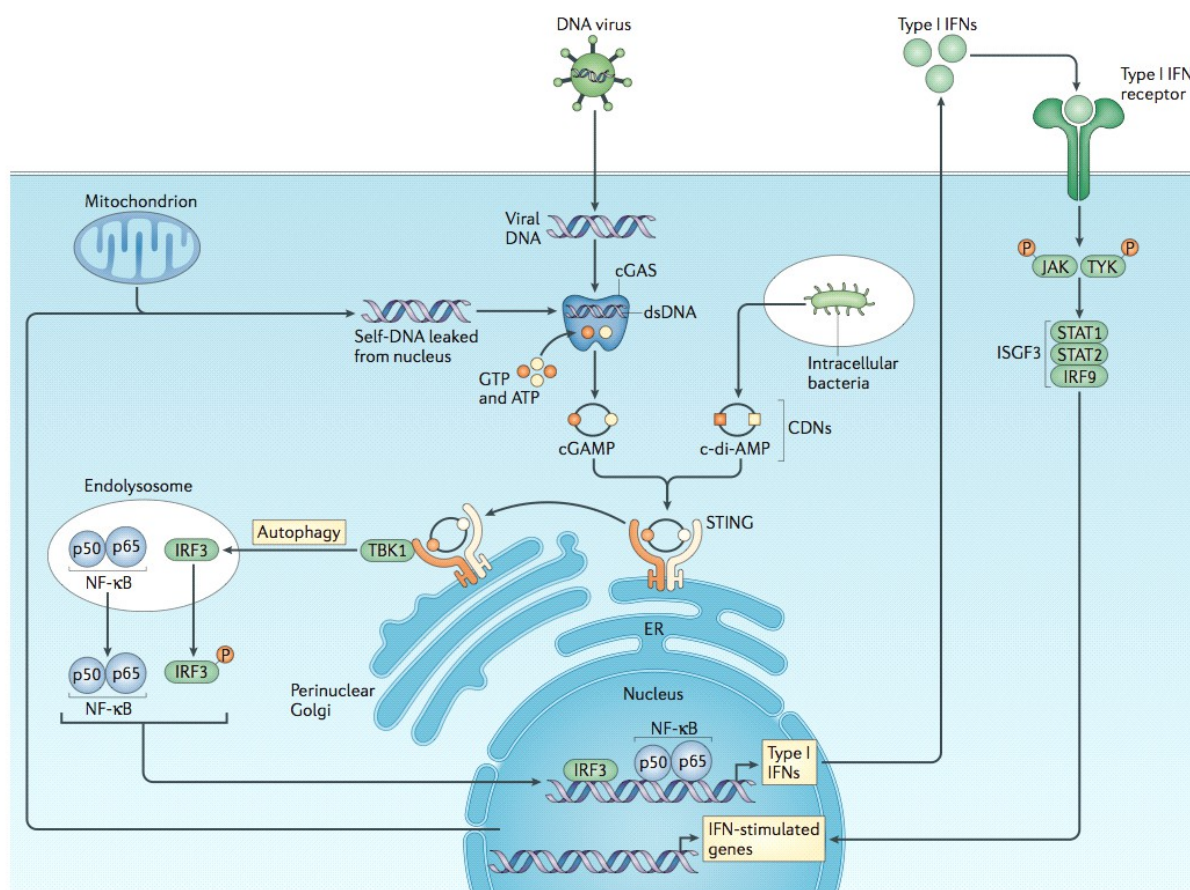


Figure 10 issue de (31), illustrant l'activation de la protéine *STING* au niveau cellulaire.

5.2 STING et cancer colo-rectal

Une dérégulation de STING (par hyperméthylation du promoteur) a été initialement décrite, en 2016, à partir des lignées cellulaires d'adénocarcinomes colo-rectaux, participant ainsi à la tumorigénèse par évvasion immunitaire (32).

Lors de l'élaboration de notre travail, seules deux études avaient porté sur l'expression immunohistochimique de STING dans le cancer colo-rectal :

- la première (*Zhong et al.*), publiée en 2018, a corrélé l'expression immunohistochimique de STING avec les caractéristiques clinico-pathologiques au sein d'une cohorte de 87 tumeurs colo-rectales. L'expression de STING (Proteintech Company (China)) était évaluée de façon qualitative (binaire) : présent/absent (seuil non précisé). La protéine STING était exprimée dans 9,2% des cancers colo-rectaux. L'expression de STING était corrélée (en analyse univariée) à deux facteurs : le sexe féminin et l'âge inférieur à 60 ans. En revanche, elle n'était pas corrélée au stade TNM, ni au pronostic. **Dans cette étude, le statut MMR tumoral n'était pas disponible** (33) ;

- la seconde (*Hong et al.*), publiée en 2019, a également corrélé l'expression immunohistochimique de la protéine STING (clone DIV5L, lapin) au niveau des cellules tumorales de 225 CCR avec les caractéristiques anatomopathologiques et pronostiques. L'analyse était effectuée par un logiciel d'images, permettant de définir deux groupes (à partir de la valeur médiane de l'expression de STING) : expression forte versus faible. Seuls 19 des 225 patients présentaient un statut MSI («high»), soit moins de 10% de la cohorte. **Il n'y avait pas de différence significative d'expression de la protéine STING au niveau des cellules tumorales entre les cancers colo-rectaux MSI et MSS en analyse univariée (p = 0.62)**. Néanmoins, cette étude n'était pas réalisée dans le but d'étudier l'expression de STING en fonction de ce statut. Le point qui nous intéresse est la mise en évidence des caractéristiques clinico-pathologiques qui influent l'expression de STING. Le groupe de tumeurs avec une plus forte expression de STING était associé à : une moindre fréquence de métastases ganglionnaires (pN) et d'embolies tumorales veino-lymphatiques, un stade tumoral moins avancé et une augmentation du nombre de lymphocytes T CD8+ intra-tumoraux (ou TILs). Contrairement à l'étude mentionnée précédemment, les caractéristiques suivantes n'étaient pas corrélées à l'expression de STING : l'âge, le sexe, la localisation tumorale, l'histologie, la différenciation tumorale (34).

Les résultats de ces deux études sont contradictoires (33, 34), et seule l'une d'entre elles mentionnait le statut MMR tumoral, sans qu'une corrélation statistique ne soit mise en évidence en analyse univariée (34).

5.3 STING est activé dans le CCR dMMR

En 2021, il a été montré que la voie cGAS-STING était activée dans des lignées cellulaires tumorales dMMR (par inactivation du gène *MLH1*), et le mécanisme d'activation a été élucidé : l'absence de régulation de l'exonucléase 1 conduit à une hyperexcision de l'ADN et à une augmentation de l'ADN simple brin. Il en résulte des cassures de l'ADN, aboutissant à une instabilité chromosomique et à un relargage de l'ADN au sein du cytosol (35).

Un score pronostique lié à STING (profil d'expression de l'ARNm) a été développé à partir de 431 échantillons de cancers colo-rectaux. L'expression de STING était significativement augmentée dans le sous-type moléculaire 1 (enrichi en CCR avec déficience du système MMR), et diminuée dans les sous-types moléculaires 2, 3 et 4 (36).

5.4 STING, un potentiel biomarqueur de réponse à l'immunothérapie ?

Chez des modèles murins atteints de mélanomes, la croissance tumorale était plus rapide et la survie moindre chez les souris déficientes en cGAS/STING (versus cGAS/STING sauvage) traitées par immunothérapie anti-PD-L1. Dans cette étude, les niveaux d'expression de PD-L1 au niveau des cellules immunes (dendritiques) et tumorales étaient similaires dans les 3 groupes, et indépendants de la réponse au traitement (37).

Une autre étude, réalisée chez des modèles murins atteints de carcinomes mammaires et de mélanomes avec un système tumoral dMMR (par inactivation du gène *MLH1*) a montré que les cellules tumorales (et non les cellules de l'hôte) présentant une voie cGAS/STING déficiente avaient une croissance plus rapide. En revanche, il n'existait pas de différence significative chez des modèles murins avec un système tumoral fonctionnel (pMMR, sans inactivation du gène *MLH1*) STING sauvage versus STING inactivé. De plus, à partir d'échantillons de tumeurs MSI (modèles murins et 24 carcinomes endométrioïdes de l'endomètre), une voie STING déficiente conférait une résistance à l'immunothérapie, tandis qu'il n'existait pas de différence significative parmi les tumeurs MSS (n=44) (38).

Ainsi, la réponse à l'immunothérapie dans le cancer colo-rectal dMMR a fait l'objet d'un nouveau paradigme, reposant sur la nécessité pour la cellule tumorale d'avoir une voie cGAS-STING fonctionnelle (*Figure 11*) (38, 39).

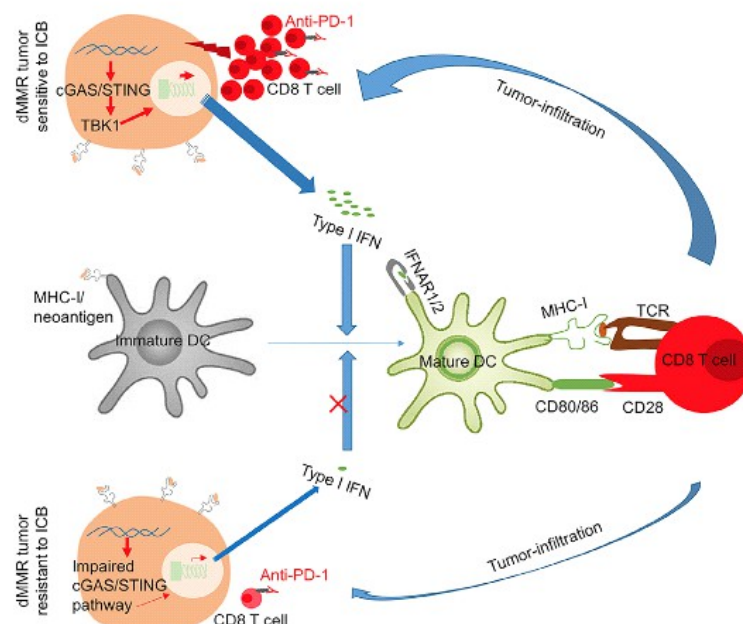


Figure 11 issue de (38) résumant le nouveau paradigme concernant la réponse à l'immunothérapie chez des tumeurs dMMR.

5.5 ... et dans d'autres cancers ?

L'expression immunohistochimique de la protéine STING a également été étudiée dans d'autres types de cancers : le cancer pulmonaire non à petites cellules (40, 41), le cancer gastrique (42), le cancer du sein (43-45), le cancer de l'ovaire (46), le mycosis fongoïde (47), le cancer de la cavité buccale et de l'oropharynx (48, 49), etc.

Dans le cancer pulmonaire non à petites cellules, l'expression de STING (évaluée à l'aide d'un H-score) au niveau des cellules tumorales est positivement corrélée (en analyse univariée) à un meilleur pronostic, au type histologique (expression plus fréquente dans les sous-types non épidermoïdes versus épidermoïdes), au statut mutationnel (*KRAS* et *EGFR* mutés) et au stade tumoral (stades précoces) (40). De façon intéressante, l'expression de STING est réprimée dans les cancers pulmonaires co-mutés *LKBI* (codant la protéine STK11) et *KRAS*, dont la réponse à l'immunothérapie est mauvaise (41).

Dans les cancers gastriques, l'expression immunohistochimique de STING diminue avec le stade tumoral et est un facteur pronostique indépendant sur la survie globale (42).

Dans le cancer du sein, l'expression immunohistochimique de STING au niveau des cellules tumorales est également associée au pronostic (parmi les cancers du sein exprimant les récepteurs aux œstrogènes) (43). De plus, parmi les cancers du sein triple-négatifs avec une surexpression de *MYC*, qui sont associés à une mauvaise réponse à l'immunothérapie, il a également été montré une répression de STING (par mécanisme épigénétique) (44).

Dans les cancers du sein (45) et de l'ovaire (46) avec mutations des gènes *BRCA1/2*, l'activité des inhibiteurs de PARP est dépendante de la voie cellulaire cGAS-STING.

L'expression immunohistochimique de STING est également un facteur pronostique indépendant dans les mycosis fongoïdes (47).

Dans les cancers de la cavité orale et de l'oropharynx (carcinomes épidermoïdes), l'expression de STING en immunohistochimie au niveau de la tumeur est un facteur pronostique indépendant, en particulier dans le sous-groupe avec infection active à HPV16 (souche oncogène) (48, 49).

En résumé, le rôle pronostique (40, 42, 43, 47-49) et théranostique (41, 44-46) de STING est également identifié parmi d'autres cancers. De plus, le stade tumoral semble influencer l'expression de STING dans certains types de cancers (40, 42).

5.6 Perspectives thérapeutiques

Chez des modèles murins, des agonistes de STING ont permis de rétablir l'efficacité de l'immunothérapie par inhibiteurs des points de contrôle immunitaire parmi des tumeurs initialement résistantes (50, 51).

Ces résultats encourageants ont conduit à des essais chez l'homme d'agonistes de STING, souvent en combinaison avec des inhibiteurs des points de contrôle immunitaire (52, 53).

Objectif de l'étude

Dans l'hypothèse où la voie cGAS - STING serait un biomarqueur de réponse à l'immunothérapie dans le CCR dMMR, notre objectif était de confirmer l'existence d'une surexpression (en immunohistochimie) de la protéine STING au sein des CCR dMMR (versus pMMR).

Nous avons donc comparé l'expression immunohistochimique de la protéine STING entre des cancers colo-rectaux pMMR et dMMR.

MATERIEL ET METHODES

1. TYPE D'ETUDE

Une étude de cohorte monocentrique rétrospective stratifiée a été menée.

2. POPULATION ETUDIEE

2.1 Critères d'inclusion

- diagnostic (histologique) d'adénocarcinome infiltrant (primitif) ;
- de localisation colique ou rectale ;
- sur pièce opératoire reçue au laboratoire entre le 01/11/2017 et le 01/11/2021 ;
- chez un patient âgé de 18 ans ou plus (à la date de réception de la pièce opératoire).

2.2 Critères d'exclusion

- radiothérapie et/ou chimiothérapie néo-adjuvante ;
- < 12 ganglions examinés en cas de statut pN0 ;
- résections endoscopiques (de type mucoséctomie ou dissection sous-muqueuse).

2.3 Stratification

- équilibrée (1/1), selon le statut MMR tumoral ;
- deux critères : le stade de la maladie (les stades I - II et III - IV ont été regroupés) et la date de réception de la pièce au laboratoire (la plus proche).

Exemple : à une pièce de colectomie droite ayant permis le diagnostic de CCR (répondant aux critères d'inclusion et d'exclusion) de statut tumoral dMMR et de stade II reçue au laboratoire le 12/12/2017, il sera affilié la première pièce opératoire reçue au laboratoire à partir de cette date, permettant le diagnostic de CCR (répondant aux critères d'inclusion et d'exclusion) de statut tumoral pMMR et de stade I ou II.

2.4 Mode de constitution de la cohorte

Les examens d'intérêt ont été sélectionnés soit à partir du code défini par l'Association pour le Développement de l'Informatique en Cytologie et en Anatomie Pathologiques (code ADICAP), soit à partir d'un code libre.

Les codes d'extraction utilisés correspondaient, pour le code ADICAP, à un adénocarcinome de localisation colique ou rectale (OHDCA7**, OHDRA7**) et pour le code libre, au statut des protéines MMR en immunohistochimie (« DMMR », « PMMR »).

3. RECUEIL DES DONNEES

3.1 Données cliniques

Les données suivantes ont été recueillies rétrospectivement à partir des dossiers médicaux : l'âge (à la date de réception de la pièce), le sexe, la localisation tumorale (colon ascendant, colon transverse, colon descendant ou rectum) et la présence de métastases à distance (synchrones).

3.2 Données histologiques

Les données suivantes ont été recueillies rétrospectivement à partir des comptes-rendus anatomopathologiques : le type histologique de la tumeur et son grade de différenciation (selon l'OMS des Tumeurs Digestives – 5ème édition, 2019, *Annexe 1*), le stade pTNM (selon l'AJCC 2017, *Annexes 2 et 3*), la présence d'emboles veineux, d'emboles lymphatiques, d'engainements péri-nerveux, de métastases à distance (si réséquées et/ou biopsiées dans le même temps opératoire), le statut des protéines MMR en immunohistochimie et la (ou les) protéine(s) du système MMR pour laquelle (ou lesquelles) le signal nucléaire était absent.

3.3 Données de biologie moléculaire

3.3.1 Statut BRAF

La présence (ou l'absence) de mutation au niveau du codon 600 du gène *BRAF* au sein de l'échantillon tumoral a été recueillie rétrospectivement à partir du dossier médical. Si cette donnée n'était pas disponible, la recherche de cette mutation a été effectuée en biologie moléculaire à l'aide du système Idylla™ NRAS-BRAF Mutation Test (Biocartis) (*cf infra*, chapitre 3.5, page 44).

3.3.2 Syndrome de Lynch

La liste des patients pour lesquels une consultation d'oncogénétique était théoriquement indiquée (en accord avec les recommandations INCa 2021, *cf Figure 8*) a fait l'objet d'une requête dans la base de données de l'Unité de Génétique Clinique du CHU de Rouen (Dr Baert-Desurmont), dans le but d'identifier les patients porteurs d'une mutation (germinale) pathogène des gènes codant pour les protéines du système MMR.

3.4 Détermination du statut MMR tumoral

Pour chaque tumeur, le statut MMR a été déterminé à la fois en immunohistochimie et en biologie moléculaire (avec concordance des deux tests).

3.4.1 Immunohistochimie des protéines MMR

L'étude immunohistochimique des protéines MMR a été réalisée selon la technique mise en œuvre à la date du diagnostic. A partir du bloc le plus représentatif de la tumeur, des coupes sériées mesurant 4 µm d'épaisseur ont été réalisées puis apposées sur lames Super Frost (Thermo-scientific ®, J180AMNZ). Les immunomarquages ont ensuite été effectués de manière systématique (BenchMark ULTRA IHC/ISH Staining Module Ventana MedicalSystems ®) avec les anticorps correspondants (*cf Tableau 1*), puis révélés avec un anticorps secondaire directement couplé à un substrat peroxydase DAB (3,3'-Diaminobenzidine) de coloration marron.

Anti-corps	Fournisseur	Clone	Référence	Date d'utilisation du protocole	Dilution	Pré-traitement	Kit de détection	Temps de pose de l'anti-corps
MLH1	Ventana Roche	M1	760-5091	Jusqu'au 26/12/2019	pré-dilué	60 min	Ultraview DAB	44 min
				À partir du 27/12/2019		64 min	Optiview DAB	24 min
PMS2	Ventana Roche	EPR3947	760-4531	Jusqu'au 31/01/2019	pré-dilué	64 min	Ultraview DAB	44 min
		A16	760-5094	Du 01/02/2019 au 18/04/2019		92 min		
	Agilent	EPR3947	M3647	À partir du 19/04/2019	1/40 ^{ème}	56 min	Optiview	60 min
MSH2	Ventana Roche	G219-1129	760-5093	Du 01/10/2017 au 20/12/2019	pré-dilué	60 min	Ultraview DAB	32 min
				À partir du 21/12/2019		64 min	Optiview DAB	16 min
MSH6	Ventana Roche	44	790-4455	Jusqu'au 09/02/2018	pré-dilué	90 min	Ultraview DAB	32 min
				Du 10/02/2018 au 18/11/2019		64 min	Optiview DAB	12 min
	SP93	790-5092	À partir du 19/11/2019					

Tableau 1 répertoriant la technique mise en œuvre pour l'étude immunohistochimique des protéines MMR en fonction de la date de réalisation.

3.4.2 Biologie moléculaire (PCR – test d’instabilité microsatellitaire)

A partir des lames colorées à l’HES, les zones de tissu tumoral (avec une richesse en cellules tumorales > 25%) et de tissu normal (correspondant par exemple au prélèvement de l’une des limites d’exérèse chirurgicale en cas d’exérèse complète de la tumeur) ont été sélectionnées par le pathologiste (*Figure 12*), afin d’extraire l’ADN correspondant (tumoral et sain) à partir des blocs paraffinés. L’ADN extrait a ensuite été amplifié par deux PCR multiplexes (NR et TGF) avec des amorces fluorescentes dans les régions d’intérêt. Le panel effectué dans notre laboratoire comprend 7 marqueurs microsatellitaires monomorphes (BAT25, BAT26, BAT40, NR21, NR22, NR24 et NR27) et 4 marqueurs microsatellitaires polymorphes (D2S123/AFM093xh3, D5S346/LNS, D17S250/MFd et TGFβ-RII). Les produits d’amplification vont ensuite migrer sur un séquenceur automatique d’ADN (modèle 3130xl, Applied Biosystems) et les courbes ainsi obtenues ont été analysées à l’aide du logiciel GeneMapper (*Figure 7*, page 32).

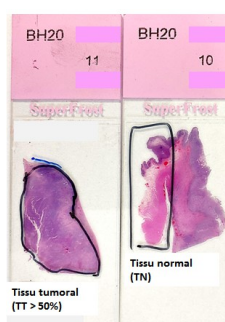


Figure 12 illustrant les territoires de **tissu tumoral** et de **tissu sain** sélectionnés par le pathologiste à partir des lames HES (entourées au feutre noir), dont l’ADN sera ensuite extrait à partir des coupes du bloc de paraffine.

3.5 Détermination du statut mutationnel du gène *BRAF*

La recherche de variants pathogènes au niveau du codon 600 du gène *BRAF* à partir du tissu tumoral a été effectuée à l’aide de l’Idylla™ NRAS-BRAF Mutation Test, réalisé sur le système Biocartis Idylla. La zone de tissu tumoral a été préalablement sélectionnée par le pathologiste afin de maximiser la richesse en cellules tumorales du prélèvement (> 25%). A partir de coupes du tissu tumoral fixé dans le formol et inclus en paraffine, le test extrait (étapes de déparaffinage, désintégration tissulaire et lyse cellulaire) et libère l’ADN, l’amplifie (dans les régions d’intérêt) puis détecte (par fluorescence) la présence des mutations en temps réel.

La liste des mutations détectées par le test est disponible ci-dessous (*Tableau 2*).

GÈNE	EXON	CODON	MUTATION	PROTÉINE	CHANGEMENT DE NUCLÉOTIDE	DÉTERMINATION GÉNÉTIQUE
BRAF	15	600	V600E	p.Val600Glu	c.1799T>A	V600E/D
					c.1799_1800delinsAA	
			V600D	P.Val600Asp	c.1799_1800delinsAC	V600K/R
			V600K	p.Val600Lys	c.1798_1799delinsAA	
V600R	p.Val600Arg	c.1798_1799delinsAG				

Tableau 2 Nomenclature des mutations détectées par l’Idylla™ NRAS-BRAF Mutation Test (issue de la Notice d’instructions d’utilisation fournie par Biocartis).

3.6 Immunohistochimie STING

3.6.1 Technique

Le bloc paraffiné sur lequel l'étude immunohistochimique des protéines MMR a auparavant été effectuée (ou un bloc représentatif de la tumeur si celle-ci a été pratiquée sur la biopsie pré-opératoire) a fait l'objet d'une coupe sériée mesurant 4 µm d'épaisseur sur lame Super Frost (Thermo-scientific ®, J180AMNZ). L'immunomarquage a ensuite été effectué de manière systématique (BenchMark ULTRA IHC/ISH Staining Module Ventana MedicalSystems ®) avec un anticorps monoclonal de lapin anti-STING (clone D2P2F, Cell Signaling ®, dilution 1/1000^{ème}, pré-traitement 36 minutes) révélé avec un anticorps secondaire directement couplé à un substrat peroxydase DAB (3,3'-Diaminobenzidine) de coloration marron (UltraView Universal DAB Detection Kit, Ventana ® 760-500).

3.6.2 Lecture et évaluation

Pour chaque série de lames l'immunohistochimie, une lame témoin était effectuée sur coupe de tissu pulmonaire paraffiné, avec un marquage attendu au niveau du cytoplasme de l'épithélium bronchique (*Figure 13*).

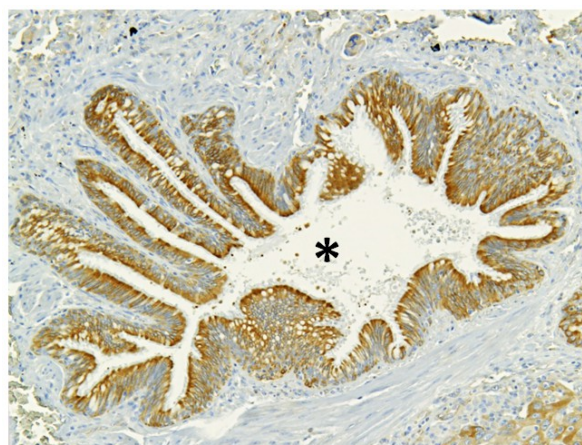


Figure 13 illustrant le résultat attendu de l'immunomarquage *STING* effectué au niveau de la lame témoin, à savoir une positivité cytoplasmique forte (3+) au niveau des cellules de l'épithélium bronchique normal (* correspond à la lumière bronchique).

Après validation de la lame témoin, la série correspondante de lames d'immunohistochimie *STING* a été lue par deux anatomopathologistes de façon indépendante et en aveugle du statut MMR tumoral. L'évaluation reposait sur la détermination du H-score au niveau des cellules tumorales, permettant de calculer un H-score consensuel (correspondant à la moyenne des deux scores).

Le H-score est calculé de la manière suivante : (% de cellules tumorales (par incréments de 10%) multiplié par l'intensité de marquage (0, 1, 2 ou 3+)) x 100. Ainsi, la valeur minimale théorique est 0 (100% des cellules tumorales ne présentent pas de marquage : 100% x 0 x 100) et la valeur maximale théorique est 300 (100% des cellules tumorales présentent un marquage fort : 100% x 3 x 100).

Les définitions suivantes ont été appliquées pour définir les intensités de marquage (*Figure 14*) :

- 0 (nul) : absence de marquage au fort grossissement (x200) (*Figure 14a*) ;
- 1+ (faible) : marquage cytoplasmique (de faible intensité) visible au fort grossissement (x200) (*Figure 14b*) ;
- 2+ (modéré) : marquage cytoplasmique (d'intensité modérée, moindre qu'un score 3+) visible aux grossissements faible (x50) et/ou modéré (x100) (*Figure 14c*) ;
- 3+ (fort) : marquage cytoplasmique (intense) visible dès le faible grossissement (x25, x40 ou x50 selon les microscopes) (*Figure 14d*).

Exemple : une tumeur dont 20% des cellules tumorales ne présentent pas de marquage, 30% un marquage faible (1+), 40% un marquage modéré (2+) et 10% un marquage fort (3+) a un H-score = $(20\% \times 0 + 30\% \times 1 + 40\% \times 2 + 10\% \times 3) \times 100 = 0 + 30 + 80 + 30 = 140$.

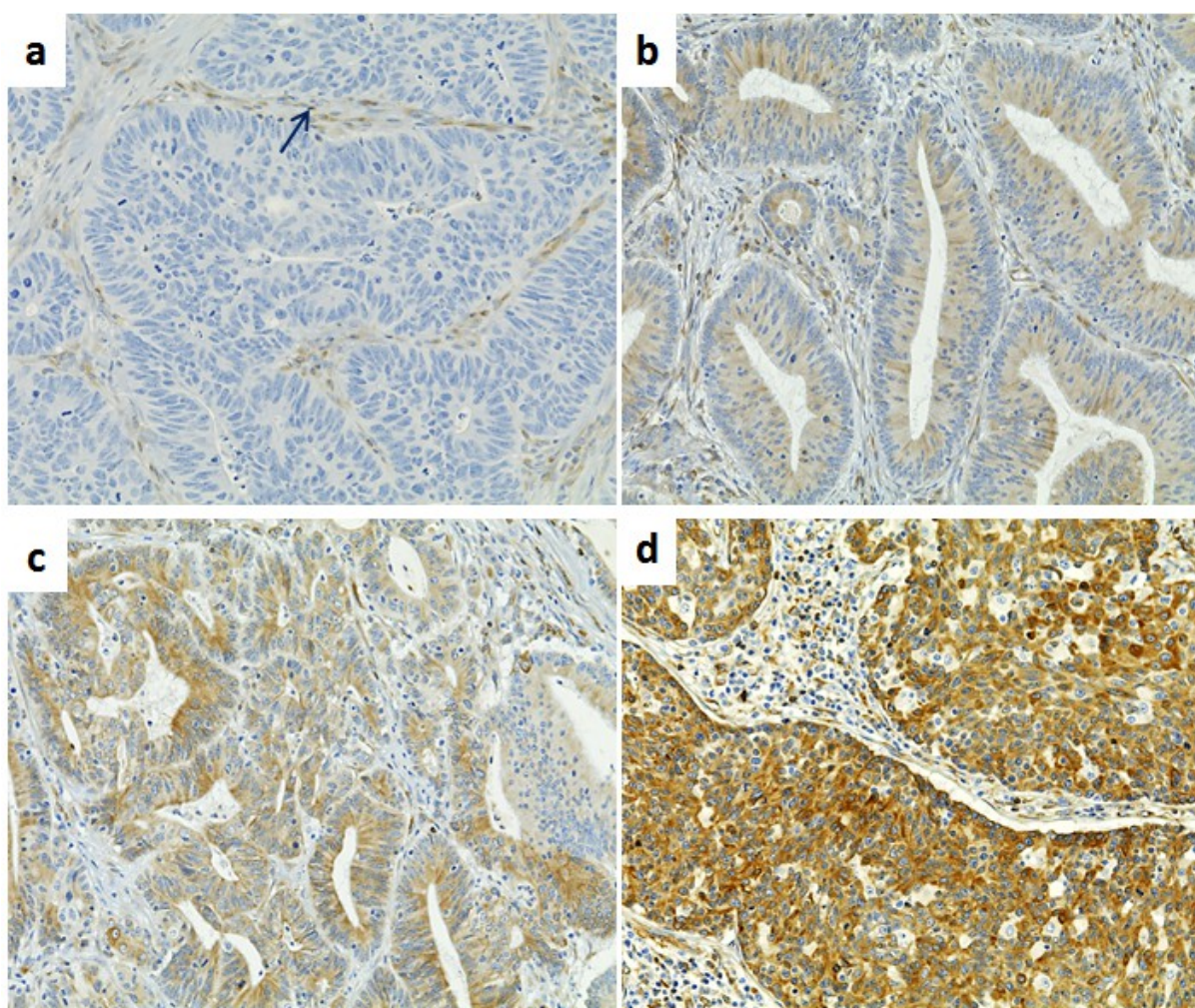


Figure 14 illustrant les différentes intensités de marquage (cytoplasmique) au niveau des cellules tumorales par l'anticorps anti-STING (clone D2P2F, Cell Signaling®) (grossissement x200) : score 0 (**a**), score 1+ (**b**), score 2+ (**c**), score 3+ (**d**).

Noter la présence d'un témoin interne positif au niveau des cellules endothéliales (flèche, **a**) du stroma tumoral.

4. ANALYSES STATISTIQUES

4.1 Taille de la cohorte

En comparant 48 CCR pMMR à 48 CCR dMMR à l'aide du test de Wilcoxon pour échantillons indépendants, cela permet de détecter une différence entre les deux groupes avec une puissance de 80 %, en admettant une erreur de 1ère espèce (ou risque alpha) de 5 %, si l'expression de STING parmi les CCR dMMR est au moins 3,1 fois plus forte que parmi les CCR pMMR (54).

4.2 Tests statistiques

Le H-score STING a été déterminé pour chaque tumeur et a servi de critère d'évaluation principal. Sur la base de ce score, le groupe des CCR dMMR a été comparé au groupe des CCR pMMR à l'aide du test de Wilcoxon pour échantillons indépendants et, sur la base de l'approche de Hodges-Lehmann (55), un intervalle de confiance à 95% a été construit pour la différence entre les deux groupes en ce qui concerne l'expression de STING.

Les deux groupes ont été décrits en utilisant la médiane, les premier et troisième quartiles (Q1 - Q3) si les caractéristiques avaient au moins un niveau ordinal et n'étaient pas catégorisées. Pour comparer les paramètres secondaires de niveau au moins ordinal entre les deux groupes, le test de Wilcoxon pour échantillons indépendants a été utilisé. Lorsque les paramètres secondaires avaient un niveau nominal, le test exact de Fisher ou sa version généralisée (par Freeman et Halton) a été utilisé.

Les analyses concernant les objectifs secondaires étant exploratoires, chaque fois que la valeur p était inférieure à 0.05, les différences correspondantes étaient considérées comme significatives.

Tous les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel *SAS 9.4*.

Accord du comité éthique local

Ce travail a obtenu l'accord du comité éthique local (Comité de Qualification des Projets de recherche) le 04 février 2022.

RESULTATS

1. CARACTERISTIQUES DE LA POPULATION ETUDIEE

Notre cohorte était constituée de 96 patients (48 atteints d'un CCR pMMR et 48 atteints d'un CCR dMMR), dont 54 femmes et 42 hommes. L'âge médian (à la date du prélèvement) était de 76 ans.

Par comparaison aux CCR pMMR, les CCR dMMR correspondaient plus souvent à des adénocarcinomes NOS de haut grade ($n = 13$ vs 2), à des adénocarcinomes mucineux ($n = 11$ vs 2) ou à un carcinome médullaire ($n=1$ vs 0) ($p < 0.0001$). Ils étaient localisés plus fréquemment ($n = 41/48$, soit 85%, vs 19) au niveau du colon ascendant ($p < 0.0001$), et près de la moitié d'entre eux ($n = 23/48$, soit 48%) était mutée au niveau du codon 600 du gène *BRAF*, tandis que parmi les CCR pMMR, seule une tumeur était mutée à ce niveau ($p < 0.0001$).

Parmi les CCR pMMR, il était noté une plus grande fréquence d'embolies veineuses ($n = 23/48$, soit 48%) par comparaison aux CCR dMMR ($n = 12/48$, soit 25%) ($p = 0.03$).

L'ensemble des caractéristiques clinico-pathologiques est exposé dans le *Tableau 3*.

Les statuts dMMR en immunohistochimie (dMMR-IHC) correspondaient dans la grande majorité des cas ($n = 40/48$, soit 83%) à une extinction du couple protéique MLH1/PMS2 (*Tableau 4*), dont plus de la moitié ($n = 26/40$ soit 65%) était attribuable à une origine somatique (ou acquise), caractérisée par la présence mutation p.V600E du gène *BRAF* et/ou d'une hyperméthylation du promoteur du gène *MLH1*.

Sept des 48 patients (14%) atteints d'un CCR dMMR étaient connus porteurs d'un syndrome de Lynch. Pour 15 des 48 patients (31%) atteints d'un CCR dMMR, il n'était pas possible de déterminer la présence ou non d'un syndrome de Lynch (*Tableau 5*).

Tableau 3 : caractéristiques clinico-pathologiques de la population étudiée

	Tous (n=96)	pMMR (n=48)	dMMR (n=48)	Valeur p
<i>Sexe</i>				0.15
Féminin	54	23	31	
Masculin	42	25	17	
<i>Age (en années)</i>				0.96
Médiane	76	74	76	
Q1	65	67	64	
Q3	84	83	85	
<i>Localisation tumorale</i>				<0.0001
Colon ascendant	60	19	41	
Colon transverse	5	3	2	
Colon descendant	26	21	5	
Rectum	5	5	0	
<i>Type histologique</i>				<0.0001
Adénocarcinome NOS				
de bas grade	67	44	23	
de haut grade	15	2	13	
Carcinome médullaire	1	0	1	
Adénocarcinome mucineux	13	2	11	
<i>Stade (UICC 2017 – 8^{ème} éd.)</i>				0.10
I	13	4	9	
II	35	20	15	
III	34	14	20	
IV	14	10	4	
<i>Emboles veineux</i>				0.03
Présents	35	23	12	
Absents	61	25	36	
<i>Emboles lymphatiques</i>				1.00
Présents	45	23	22	
Absents	51	25	26	
<i>Engainements péri-nerveux</i>				0.22
Présents	43	25	18	
Absents	53	23	30	
<i>Mutation BRAF (V600E)</i>				<0.0001
Présente	24	1	23	
Absente	72	47	25	

Tableau 4 : description du statut MMR tumoral au sein de la population étudiée

	dMMR (n=48)	pMMR (n=48)
<i>Biologie moléculaire (PCR)</i>		
MSI	48	.
MSS	.	48
<i>Immunohistochimie des protéines MMR</i>		
pMMR-IHC	.	48
dMMR-IHC		
. MLH1-/PMS2-	40	.
. MSH2-/MSH6-	6	.
. MSH6-	2	.

Tableau 5 : tumeurs dMMR et syndrome de Lynch

	Syndrome de Lynch		
	Présent	Absent	ND*
Tumeurs dMMR	7	26	15
. MLH1-/PMS2-	3	26	11
. MSH2-/MSH6-	3	.	3
. MSH6-	1	.	1

*Non déterminé. Cette situation correspond aux cas pour lesquels une recherche d'hyperméthylation du promoteur du gène *MLH1* (en cas d'extinction du couple *MLH1/PMS2* sans mutation V600E au niveau du gène *BRAF*) n'a pas été réalisée et/ou qu'une analyse génétique constitutionnelle au niveau des gènes codant les protéines du système MMR n'a pas été effectuée.

2. RESULTAT DE L'ETUDE

Nous avons montré une surexpression de la protéine STING (en immunohistochimie) au niveau des cellules tumorales des CCR dMMR par comparaison aux CCR pMMR ($p < 0.001$).

Les H-scores médians étaient évalués à 80 (Q1 – Q3 : 10 – 150) chez les CCR dMMR et à 10 (Q1 – Q3 : 0 – 40) chez les pMMR ($p < 0.001$). Les H-scores s'étendaient de 0 à 250 parmi les CCR dMMR et de 0 à 150 parmi les CCR pMMR (*Figure 15*).

25% des CCR dMMR avaient un H-score ≤ 10 tandis que respectivement 21% et 12,5% des CCR pMMR avaient un H-score ≥ 80 et ≥ 100 .

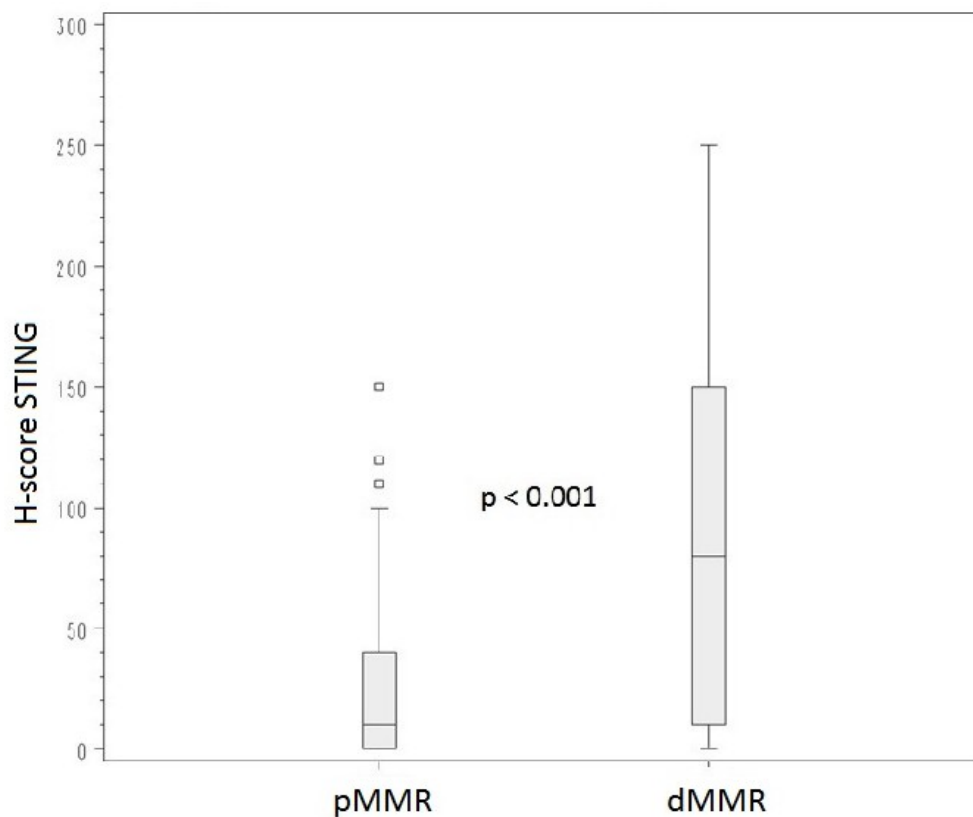


Figure 15 : illustrant le **résultat principal de l'étude** : il existe une différence statistiquement significative ($p < 0.001$) de l'expression de STING au niveau des cellules tumorales (évaluée à l'aide du H-score, en ordonnées) en fonction du statut MMR tumoral (en abscisses)

DISCUSSION

Nos résultats ont confirmé l'hypothèse formulée dans l'introduction (*cf Objectif de l'étude*, page 41).

1. POINTS FORTS

1.1 Perspectives de l'immunomarquage STING

1.1.1 STING et CCR dMMR

Le point le plus intéressant de notre étude, qui renforce l'intérêt de considérer l'immunomarquage STING au sein des CCR en tant que potentiel biomarqueur théranostique (à l'immunothérapie), est l'hétérogénéité de la distribution de l'expression de STING au sein des CCR dMMR, dont découlent plusieurs hypothèses :

- les CCR dMMR non (ou faibles) expresseurs STING correspondent-ils aux patients non répondeurs à l'immunothérapie par ICI (résistance primaire) ?
- les CCR dMMR STING forts (et/ou modérés?) expresseurs correspondent-ils aux patients répondeurs à l'ICI ?

Dans notre cohorte, avec les données cliniques dont nous disposons, nous n'avons identifié qu'un seul patient (#15, avec un H-score STING évalué à 80) traité par immunothérapie (NIVOLUMAB) pendant 2 ans, avec une réponse clinique considérée complète à 2 ans.

- y a-t-il une place pour les traitements agonistes de la voie cGAS-STING et si oui, diffère-t-elle en fonction du statut d'activation de cette voie identifiable à l'aide de l'immunohistochimie ?

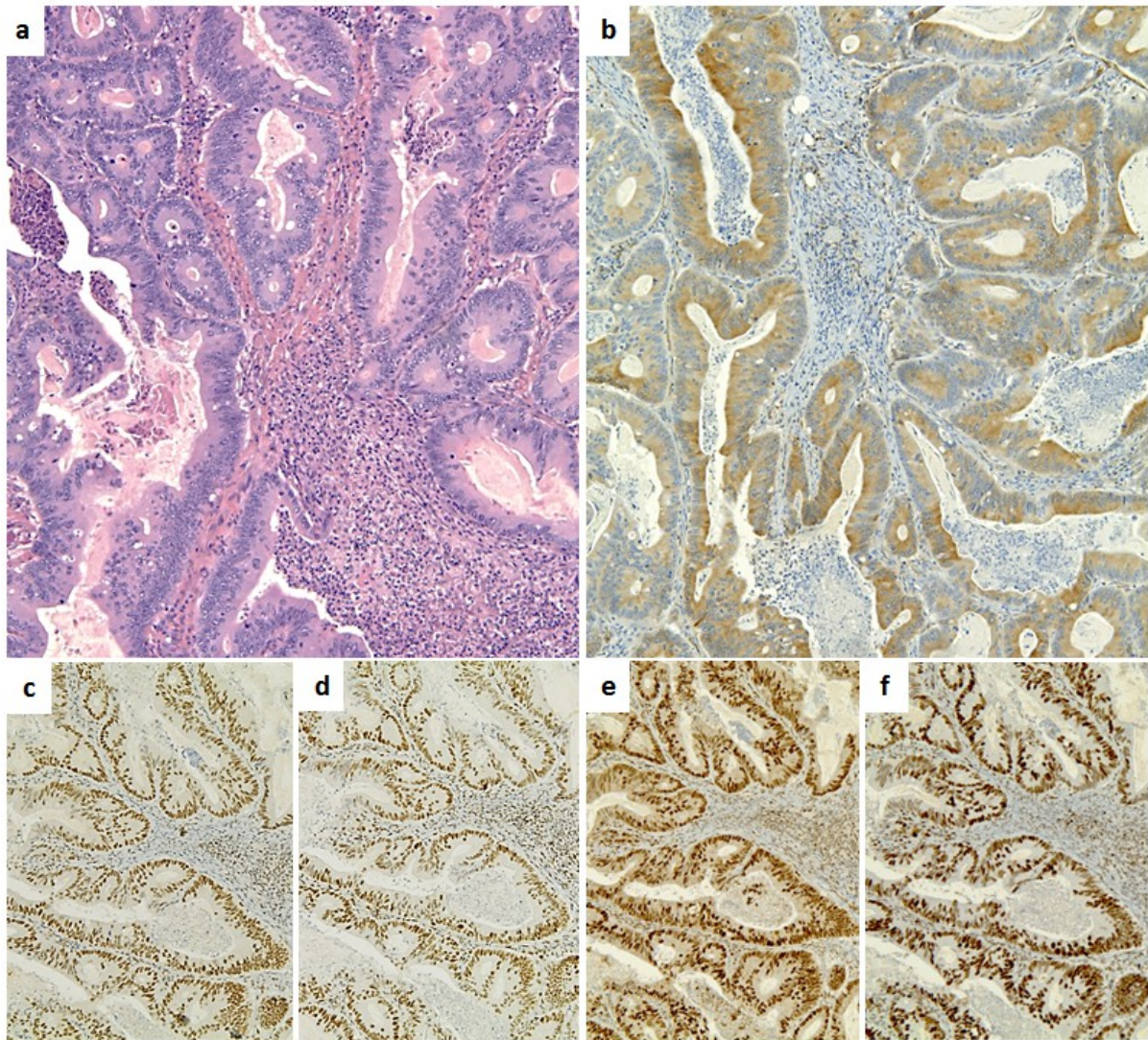
1.1.2 STING et CCR pMMR

D'autre part, nous avons identifié un sous-groupe de CCR pMMR exprimant fortement STING (définis comme présentant un H-score ≥ 80 , correspondant à la valeur médiane des H-scores des CCR dMMR), présentant des caractéristiques morphologiques communes : une architecture glandulaire sous la forme de massifs polyadénoïdes ou prenant des aspects cribriiformes, dont les lumières contiennent de multiples foyers d'abcédation, avec un stroma inflammatoire (*Figure 16*) :

- s'agit-il d'un sous-groupe particulier, pouvant potentiellement bénéficier de l'immunothérapie, bien que la place de l'immunothérapie dans le CCR pMMR ait été jusqu'alors restreinte (20, 56) ?

- ce groupe comprend-il des tumeurs *POL DI/E* mutées, bien que celles-ci soient rares ? En effet, seuls 3% des CCR pMMR possèdent une charge mutationnelle élevée et parmi eux, environ 20% correspondent à des mutations du gène *POL E*, soit moins d'1% des CCR pMMR (57). Par comparaison aux CCR pMMR, les CCR mutés au niveau du gène *POL E* sont identifiés préférentiellement chez des hommes (76%), à un âge plus jeune (âge médian : 54 ans), à des stades moins avancés (I-II : 70%), et au niveau du colon droit. Ces tumeurs présentent très rarement des mutations dites « classiques » des gènes *KRAS* (3%) et *BRAF* (0%), respectivement au niveau des codons 12, 13 et 600 (58). Sur le plan morphologique, les CCR *POL E* mutés présentent des caractéristiques morphologiques communes avec les CCR dMMR, distinctes des CCR pMMR : les types histologiques mucineux et médullaire y sont plus fréquemment rencontrés, et ces tumeurs contiennent plus

de lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs), sans territoire de nécrose tumorale (59). Une autre étude a identifié comme caractéristiques morphologiques communes des CCR *POL E* mutés (variant pathogène P286R) la présence d'une architecture cribriforme associée à des débris nécrotiques intra-luminaux mêlés à des corps apoptotiques et à des polynucléaires neutrophiles (60), tels que nous les avons observés. L'intérêt de son identification repose sur le bénéfice potentiel de l'immunothérapie parmi les CCR pMMR (27, 61).



Photographies issues du Service de Pathologie du CHU de Rouen – Guillaume Scellier

Figure 16 illustrant un adénocarcinome infiltrant (NOS) de bas grade, pMMR-IHC, exprimant fortement STING (# 74).

a. HES correspondante (grossissement x100),

b. Immunomarquage STING (clone D2P2F, Cell Signaling®, grossissement x100),

c-f. Immunomarcages MLH1 (c), PMS2 (d), MSH2 (e) et MSH6 (f) (marquage nucléaire conservé au niveau des cellules tumorales).

L'ensemble de ces hypothèses est résumé et illustré par la figure ci-dessous (*Figure 17*).

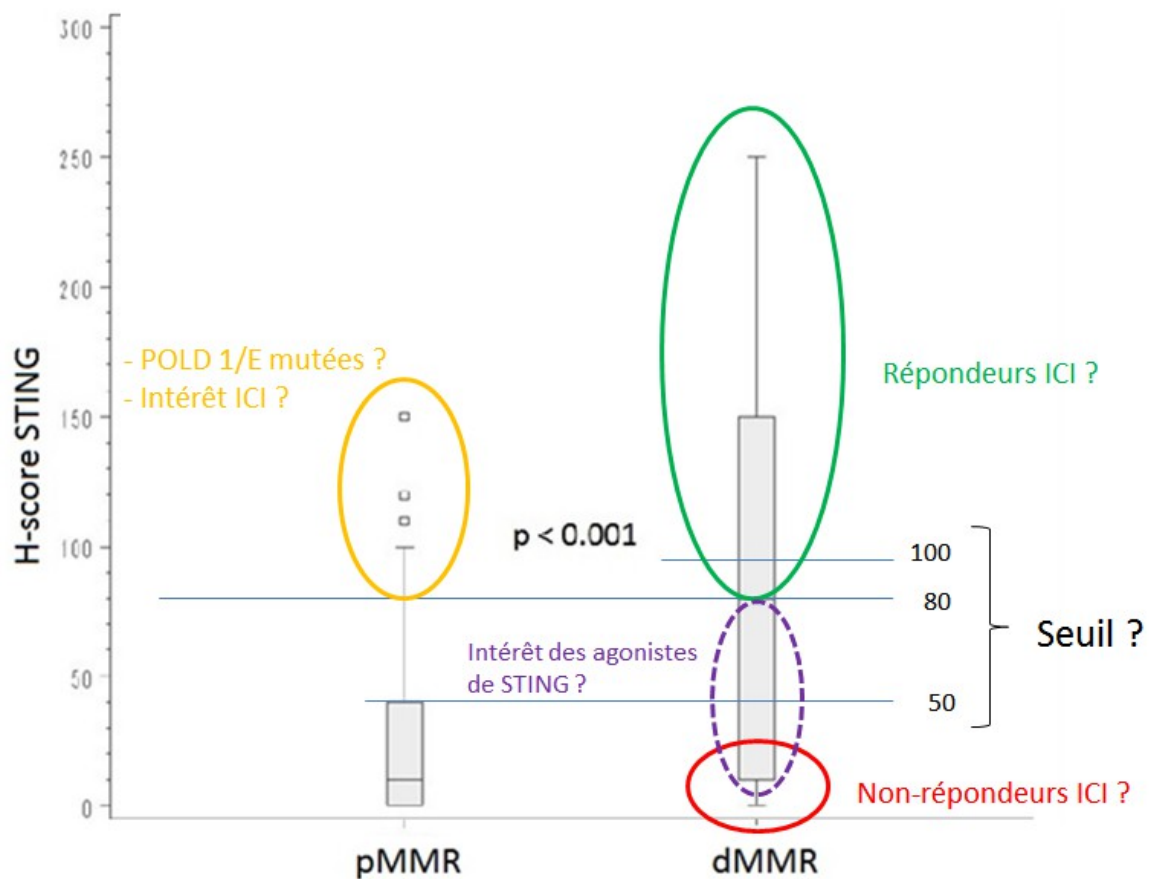
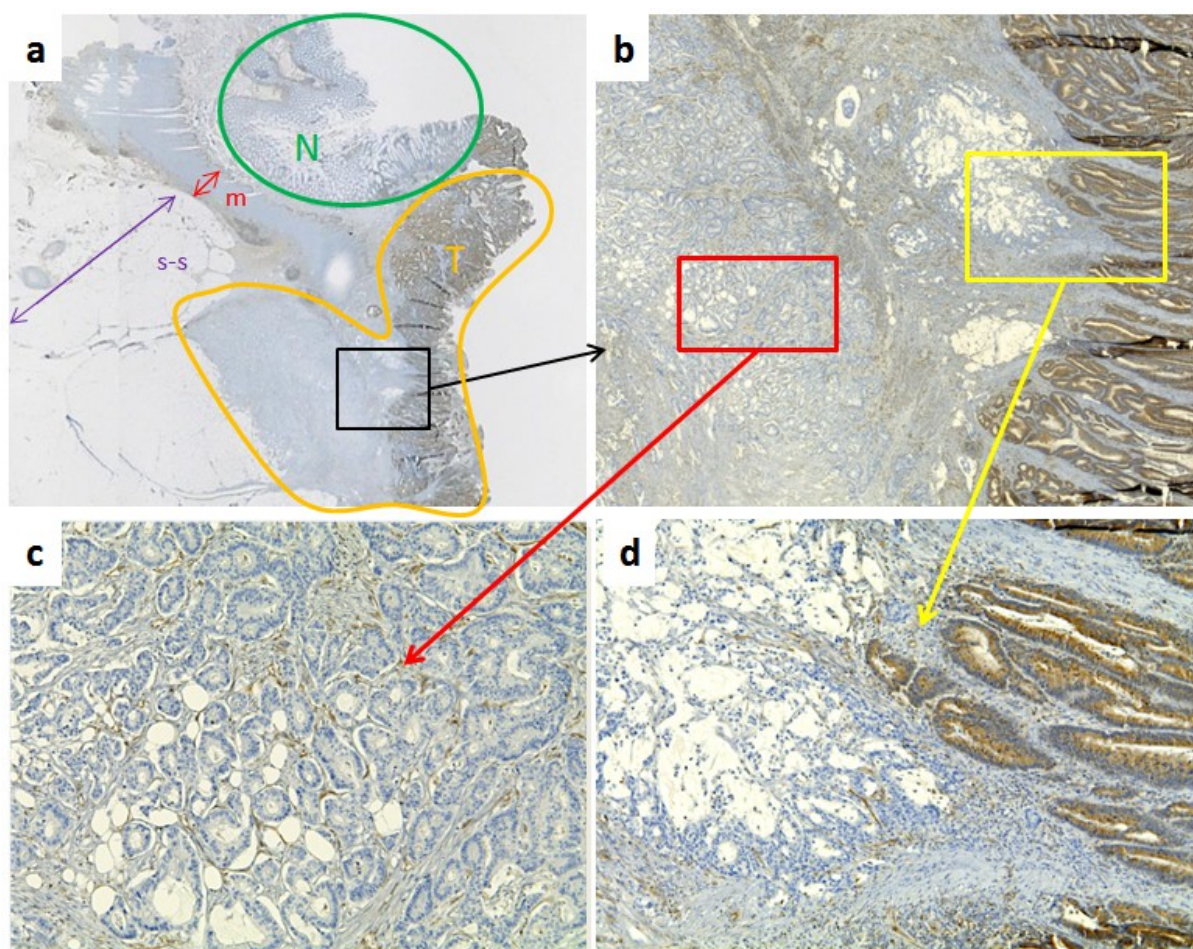


Figure 17 illustrant le rôle de potentiel biomarqueur de réponse à l'immunothérapie de l'immunomarquage STING, à partir de nos résultats, tel que supposé par la Figure 11.

1.1.3 Sur échantillons biopsiques

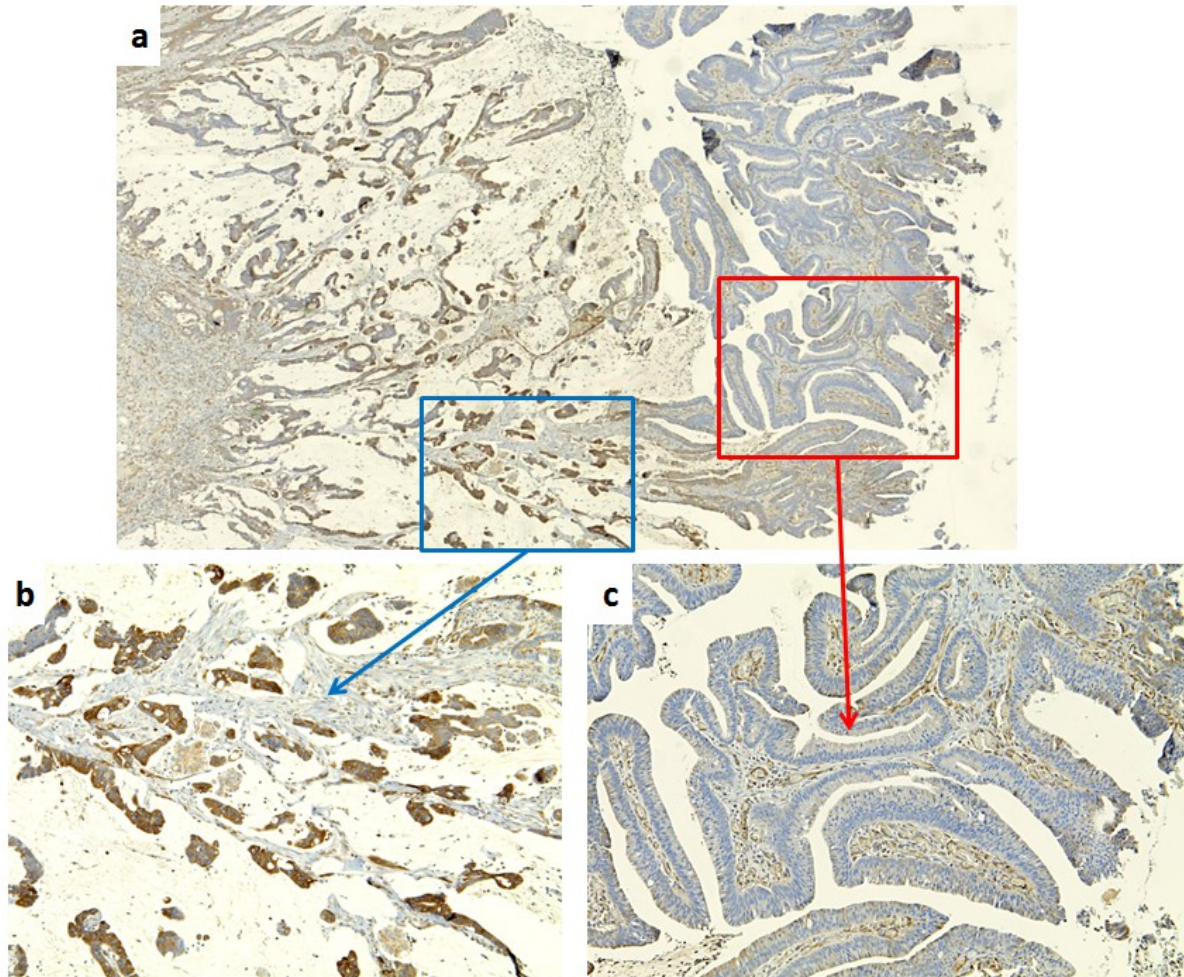
La quantité de tissu tumoral analysable sur des prélèvements issus de pièces opératoires nous a permis de mieux appréhender l'hétérogénéité de l'expression tumorale de STING (*Figures 18 et 19*), à la fois au niveau de la tumeur mais aussi de son stroma. Cette hétérogénéité, couplée à une expression souvent forte au niveau des territoires dysplasiques/de carcinome *in situ* (en superficie de la tumeur), y compris au sein de CCR non ou faible expresseurs (*Figure 18*), doivent inciter à la prudence lors de l'interprétation de ce potentiel futur biomarqueur sur des échantillons biopsiques (de petite taille), représentant souvent le seul matériel tumoral disponible chez des patients métastatiques.



Photographies issues du Service de Pathologie du CHU de Rouen – Guillaume Scellier

Figure 18 illustrant l'hétérogénéité de l'expression tumorale de STING.

a. Vue à faible grossissement montrant la tumeur (T, délimitée par le trait orange) et la muqueuse colique normale adjacente (N, entourée en vert). La partie superficielle de la tumeur exprime fortement STING (a, b et d), tandis qu'en profondeur (au niveau des territoires infiltrant la musculature (m) et la sous-séreuse (s-s)), la tumeur n'exprime pas STING (c).



Photographies issues du Service de Pathologie du CHU de Rouen – Guillaume Scellier

Figure 19 illustrant l'hétérogénéité de l'expression tumorale de STING.

a. Vue à faible grossissement : la partie superficielle (à droite sur la photo) (c) correspond aux villosités dysplasiques n'exprimant pas STING, tandis qu'en profondeur (b), les foyers dégénérés en adénocarcinome mucineux infiltrant expriment fortement STING. Ce cas montre des aspects tout à fait opposés à ceux illustrés par la Figure 18 (page précédente).

1.1.4 Avantages de l'immunohistochimie

La simplicité et la rapidité d'interprétation de l'IHC STING (technique réalisée en moins de 24h, avec un coût acceptable) rendent cette technique intéressante dans l'optique d'un potentiel biomarqueur théranostique. De plus, l'immunohistochimie permet (de façon semi-quantitative), par rapport à certaines techniques de biologie moléculaire (de type expression génique), de déterminer le type cellulaire (tumoral, immunitaire ou endothélial) exprimant ou non la protéine STING. En effet, au sein de notre cohorte, parmi les tumeurs n'exprimant pas STING au niveau des cellules tumorales (H-score à 0), différents profils d'expression ont pu être mis en évidence au niveau du stroma tumoral (*Figure 20*). Est-il pertinent de les classer au sein du même groupe, c'est-à-dire en tant que non-expresseurs ? Ou s'agit-il de groupes distincts vis-à-vis de l'immunité anti-tumorale mise en place ?

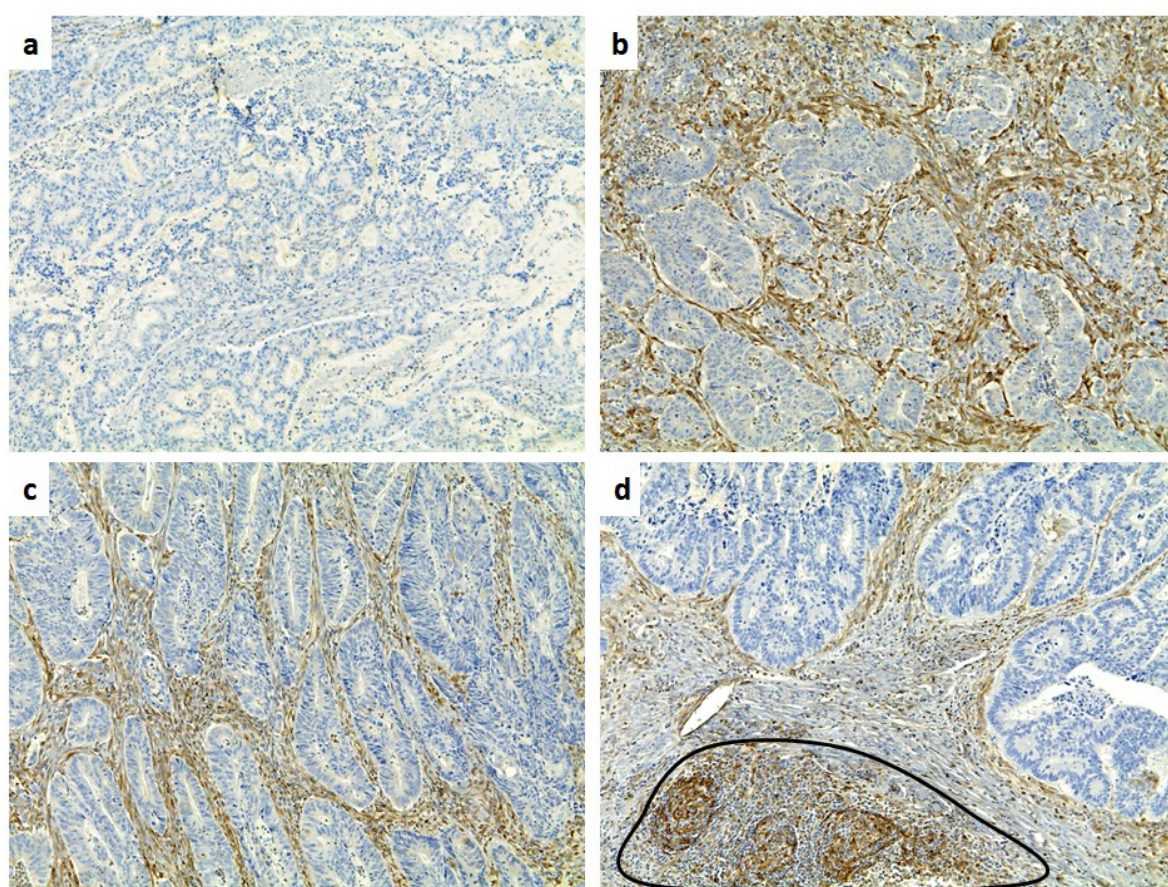


Figure 20 illustrant l'hétérogénéité d'expression de STING au niveau du stroma tumoral parmi quatre tumeurs négatives (H-score à 0).

a. absence d'expression de STING au niveau du stroma tumoral ;

b-c. expression forte au niveau du stroma tumoral, contrastant avec l'absence d'expression complète au niveau des cellules tumorales ;

d. expression modérée à forte au niveau du stroma tumoral et en particulier au niveau d'une structure lymphoïde tertiaire (entourée en noir).

1.2 Comparaison à la littérature

Il s'agit, à notre connaissance, de la première étude à avoir montré et diffusé ce résultat, obtenu à partir d'une large cohorte. La diffusion de nos résultats s'est opérée sous la forme de deux résumés soumis et acceptés (en 2022) à deux congrès (qui se tiendront en mars 2023) : le congrès de l'Académie de Pathologie des Etats-Unis et du Canada (ou *United States and Canadian Academy of Pathology : USCAP*) et lors des Journées Francophones d'Hépatogastroentérologie et d'Oncologie Digestive (JFHOD).

Depuis, seules deux études portant sur l'expression immunohistochimique de la voie cGAS-STING dans le cancer colo-rectal avec instabilité microsatellitaire ont été publiées. Elles ont montré des résultats similaires aux nôtres :

- la première (*Kaneta et al.*), menée par une équipe japonaise et publiée en japonais (seul le résumé est disponible en anglais), a montré une surexpression en immunohistochimie de la voie cGAS-STING au sein des CCR avec instabilité microsatellitaire, avec une augmentation du nombre de TILs CD8+ (63) ;

- la seconde (*Kunac et al.*) a été publiée le 30 décembre 2022. Il s'agissait d'une cohorte monocentrique comparant l'expression immunohistochimique des protéines cGAS et STING au sein de 41 échantillons biopsiques de patients atteints de cancers coliques ou rectaux de stade IV avec et sans instabilité microsatellitaire (21 « MSI-H », 20 MSS). Le statut MMR tumoral était déterminé par test moléculaire. L'immunomarquage STING a été effectué avec un anticorps différent (Proteintech, 19851-1-AP) du nôtre. L'expression de STING était évaluée à l'aide d'un H-score, calculé par deux pathologistes indépendants au niveau des cellules tumorales. Une expression forte de STING était définie de la façon suivante : au moins 50% de cellules tumorales présentant une intensité de marquage à 2+ ou 3+ (sans définition précise de l'intensité de marquage). L'expression immunohistochimique de STING était corrélée au statut « MSI-H » chez les patients atteints d'un CCR de stade IV ($p=0.02$). 85% des CCR MSI-H avaient une expression forte de STING (telle que définie ci-dessus par les auteurs). Par comparaison, 20 CCR dMMR sur 48 (soit 42%) (tous stades confondus) et seul 1 des 4 CCR dMMR stade IV de notre cohorte montraient une expression forte de STING telle que définie par ces auteurs. Mais il faut surtout noter que la moitié (50%) des CCR MSS de leur cohorte présentait une expression forte de STING (telle que définie par les auteurs), contre 1/48 CCR pMMR dans notre cohorte (dont 0 parmi les 10 CCR pMMR de stade IV). (64). Cela souligne, entre autres, l'importance du clone utilisé et la technique de mise au point de l'anticorps.

1.3 Contrôle des biais

1.3.1 Biais de sélection

Notre cohorte était constituée de 96 patients ayant bénéficié d'une chirurgie d'exérèse d'un adénocarcinome colo-rectal dont le statut MMR tumoral a été déterminé par deux tests (IHC et PCR), permettant de limiter les biais de sélection.

De nombreuses caractéristiques clinico-pathologiques et moléculaires différaient (de façon statistiquement significative) au sein des deux groupes étudiés : la localisation tumorale, le type histologique et le grade tumoral, la présence d'embolies veineux, le stade tumoral (IV) ainsi que le statut du gène *BRAF*. En revanche, il n'existait pas de différence significative sur le sexe et l'âge. L'ensemble de ces différences, hormis la présence d'embolies veineux, sont connus et décrits entre les CCR pMMR et dMMR (5, 6, 8, 15). Mais ces caractéristiques ne semblent pas influencer l'expression de STING dans le CCR d'après les données récentes de la littérature :

- le statut mutationnel du gène *BRAF* n'était pas associé à l'expression de STING dans l'étude de *Kunac et al.* (64) ;
- la localisation tumorale, le type histologique et le grade tumoral n'étaient pas associés à l'expression de STING dans l'étude de *Chon et al.* (34).

Dans cette dernière étude, la présence d'embolies veineux et/ou lymphatiques était moins fréquemment identifiée au sein des CCR exprimant fortement STING (34). Dans notre cohorte, il n'était pas noté de différence statistiquement significative sur la présence d'embolies lymphatiques mais uniquement sur la présence d'embolies veineux, plus fréquemment identifiés au niveau des CCR pMMR ($p = 0.03$). Notre hypothèse est que cela est dû à notre choix de regrouper les stades III et IV lors de l'étape de stratification. En effet, il y a plus de CCR de stade IV parmi les CCR pMMR ($n=10$) que parmi les CCR dMMR ($n=4$), en raison de fréquences distinctes du statut dMMR en fonction des stades (12% parmi les CCR de stade III vs 4-5% parmi les CCR de stade IV, soit une fréquence 2 à 3 fois plus élevée) (15).

Aucun CCR dMMR de notre cohorte n'était localisé au niveau du rectum. Cela s'explique par deux facteurs :

- le premier est épidémiologique : le statut dMMR est moins fréquent au niveau du rectum (64) ;
- le second est méthodologique : la radio-chimiothérapie néo-adjuvante était un critère d'exclusion, en raison de la modification de l'expression de STING au niveau des cellules tumorales par altérations de l'ADN induites par ces thérapies (30), bien que cet effet n'ait pas été retrouvé dans l'étude de *Chon et al.* (34).

1.3.2 Biais d'information

Le H-score a été calculé de façon consensuelle par deux pathologistes indépendants, sur pièce opératoire (réduction des biais liés à la représentativité du prélèvement, *cf supra*) et en aveugle du statut MMR tumoral, afin de limiter les biais d'information.

2. LIMITES

Les limites de notre étude sont :

- le caractère monocentrique et rétrospectif ;
- l'absence de calcul de reproductibilité inter et intra-observateur concernant l'évaluation du H-score ;
- l'absence de cancer dMMR de localisation rectale au sein de notre cohorte (applicabilité des résultats), alors qu'une récente étude prospective de phase II a validé l'intérêt de l'immunothérapie dans le cancer du rectum de stade localement avancé (II ou III), avec une réponse (clinique) complète (à 6 mois ou au-delà) chez les 12 patients inclus (65) ;
- et l'absence d'analyse du statut du gène *POL E* au sein du sous-groupe de CCR pMMR avec un H-score STING élevé (≥ 80) (*analyses en cours*).

3. PERSPECTIVES

Ce travail souligne l'intérêt de mener de futures études cliniques évaluant la corrélation entre l'expression immunohistochimique de STING dans le CCR dMMR et la réponse à l'immunothérapie.

Il pose également la question du sous-groupe de CCR pMMR exprimant fortement STING en immunohistochimie, au sein duquel pourraient être identifiées des tumeurs *POL E* mutées et/ou des tumeurs répondant à l'immunothérapie.

ANNEXES

<p style="text-align: center;"><i>Annexe 1</i> - Classification OMS 2019 (5^{ème} édition) des tumeurs épithéliales malignes du colon et du rectum</p>

8140/3 Adénocarcinome sans autre spécificité (*not otherwise specified* : NOS)

- 8213/3 Adénocarcinome festonné
 - 8262/3 Adénocarcinome adénome-like
 - 8265/3 Adénocarcinome micropapillaire
 - 8480/3 Adénocarcinome mucineux
 - 8490/3 Carcinome peu cohésif
 - 8490/3 Carcinome à cellules en « bague à chaton »
 - 8510/3 Adénocarcinome médullaire
 - 8560/3 Carcinome adénoquameux
 - 8020/3 Carcinome indifférencié, sans autre spécificité (NOS)
 - 8033/3 Carcinome avec une composante sarcomatoïde
-

<p style="text-align: center;"><i>Annexe 2</i> - Classification pTNM des carcinomes colo-rectaux (8^{ème} édition – UICC 2017)</p>

T – Tumeur primitive

- TX La tumeur primitive ne peut pas être évaluée
- T0 Absence de preuve histologique en faveur d'une tumeur primitive
- Tis Carcinome in situ : infiltration de la *lamina propria*
- T1 La tumeur envahit la sous-muqueuse
- T2 La tumeur envahit la musculuse
- T3 La tumeur envahit la sous-séreuse ou les tissus péri-coliques ou péri-rectaux non péritonéalisés
- T4 La tumeur envahit (directement) d'autres organes ou structures et/ou perfore le péritoine viscéral
 - T4a La tumeur perfore le péritoine viscéral
 - T4b La tumeur envahit directement d'autres organes ou structures

N – Ganglions lymphatiques régionaux

- NX Les ganglions lymphatiques régionaux ne peuvent pas être évalués
- N0 Absence de métastase ganglionnaire
- N1 Métastase(s) dans 1 à 3 ganglions lymphatiques régionaux
 - N1a Métastase dans 1 ganglion lymphatique régional
 - N2b Métastases dans 2 ou 3 ganglions lymphatiques régionaux
 - N1c Dépôts tumoraux satellites dans la sous-séreuse ou dans les tissus mous péri-coliques ou péri-rectaux *sans* métastase ganglionnaire lymphatique régionale
- N2 Métastases dans au moins 4 ganglions lymphatiques régionaux
 - N2a Métastases dans 4 à 6 ganglions lymphatiques régionaux
 - N2b Métastases dans au moins 7 ganglions lymphatiques régionaux

M – Métastases à distance

M0 Absence de métastase à distance

M1 Métastase(s) à distance

M1a Métastase(s) à distance confinées à un organe (foie, poumon, ovaire, ganglions lymphatiques non régionaux) sans métastase péritonéale associée

M1b Métastases dans plus d'un organe

M1c Métastases péritonéales avec ou sans métastases d'organe(s)

Classification pathologique TNM

pN0 L'examen histologique d'un curage ganglionnaire lymphatique régional doit habituellement inclure au moins 12 ganglions lymphatiques. Si les ganglions lymphatiques examinés sont négatifs, mais que le nombre de ganglions examinés n'atteint pas 12, classer en pN0.

<i>Annexe 3- Stade tumoral des carcinomes colo-rectaux (8^{ème} édition - UICC 2017)</i>

Stade 0	Tis	N0	M0
Stade I	T1, T2	N0	M0
Stade II	T3, T4	N0	M0
Stade III	T1-4	N1, N2	M0
Stade IV	T1-4	N1-2	M1

NB : les stades II à IV sont subdivisés en catégories A, B et C.

BIBLIOGRAPHIE

1. Sung, H, Ferlay, J, Siegel, RL, Laversanne, M, Soerjomataram, I, Jemal et al., Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021; 71: 209 - 249.
<https://doi.org/10.3322/caac.21660>
2. Sharma, Rajesh et al., Global, regional, and national burden of colorectal cancer and its risk factors, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019, *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 2022; 7: 627–47
[https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(22\)00044-9](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(22)00044-9)
3. <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/cancers/cancer-du-colon-rectum>
4. Ma H, Lodewijk A,, Brosens A, G Johan, A Oggerhaus, Francis M. Giardiello et al., Pathology and genetics of hereditary colorectal cancer, *Pathology*, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.pathol.2017.09.004>
5. WHO Classification of Tumours Editorial Board , Digestive System Tumours, WHO Classification of Tumours, 5th Edition, Lyon, Volume 1, 2019
6. Shia J, Schultz N, Kuk D, Vakiani E, Middha S, Segal N. H. et al., Morphological characterization of colorectal cancers in The Cancer Genome Atlas reveals distinct morphology–molecular associations: clinical and biological implications, *Modern Pathology*, 2017 ; 30(4): 599 – 609,
<https://doi.org/10.1038/modpathol.2016.198>
7. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2009 Dec 17;361(25):2449-60.
doi: 10.1056/NEJMra0804588
8. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Sonesson C et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015 Nov;21(11):1350-6.
doi: 10.1038/nm.3967.
9. Angelova M., Charoentong, P., Hackl, H., Fischer ML, Rene Snajder R, Krogsdam AM et al., Characterization of the immunophenotypes and antigenomes of colorectal cancers reveals distinct tumor escape mechanisms and novel targets for immunotherapy. *Genome Biol* 2015;16(1) : 64
<https://doi.org/10.1186/s13059-015-0620-6>
10. Pagès F, Mlecnik B, Marliot F, Bindea G, Ou F.-S., Bifulco C. et al., International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study, *The Lancet*, 2018; 391: 2128–39
11. Stjepanovic N., Moreira L, Carneiro F, Balaguer F, Cervantes A, Balmana J et al., Hereditary gastrointestinal cancers: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up, *Annals of Oncology*, 2019, 30(10): 1558 – 1571

12. © Évaluation du statut MMR tumoral/synthèse, Collection Recommandations et référentiels, novembre 2021

13. Boland, C. Richard and Ajay Goel, Microsatellite Instability in Colorectal Cancer, *Gastroenterology*, 2010;138(6):2073 – 2087, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.064>

14. Frank A. Sinicrope, Lynch Syndrome–Associated Colorectal Cancer, *N Engl J Med* 2018; 379(8):764-773

15. Battaglin F, Naseem M, Lenz HJ, Salem ME. Microsatellite instability in colorectal cancer: overview of its clinical significance and novel perspectives. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2018 Nov;16(11):735-745

16. Luchini C, Bibeau F, Ligtenberg MJL, Singh N, Nottage A, Bosse T et al., ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach, *Annals of Oncology*, 2019; 30(8): 1232 – 1243

17. Guyot D'Asnières De Salins A., Tachon G, Cohen R, Karayan-Tapon L, Junca A6, Frouin E et al., Discordance between immunochemistry of mismatch repair proteins and molecular testing of microsatellite instability in colorectal cancer, *ESMO Open*, 2021; 6(3):100120. <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2021.100120>

18. Angela N. Bartley, Mills A. N., Konnick E, Overman M, Ventura CB, Lesley Souter L et al, Mismatch Repair and Microsatellite Instability Testing for Immune Checkpoint Inhibitor Therapy, *Arch Pathol Lab Med*. 2022;146:1194–1210; doi: 10.5858/arpa.2021-0632-CP

19. Greenson JK, Huang S-C, Casey Herron, Moreno V, Joseph D. Bonner, Tomsho L.P. et al., Pathologic predictors of microsatellite instability in colorectal cancer., *Am J Surg Pathol*. 2009 Jan;33(1):126-33. doi: 10.1097/PAS.0b013e31817ec2b1

20. Le D.T., Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD et al , PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency, *N Engl J Med*. 2015 ; 372 (26) : 2509-20. doi: 10.1056/NEJMoa1500596

21. Overman MJ, McDermott R, Leach JL, Lonardi S, Lenz HJ, Morse MA et al, Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study, *Lancet Oncol*. 2017;18(9):1182-1191. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30422-9

22. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/pembrolizumab-keytruda-5-10-2017>

23. Michael J. Overman, Lonardi S, Wong KYM, Lenz HJ, Gelsomino F, Aglietta M et al, Durable Clinical Benefit With Nivolumab Plus Ipilimumab in DNA Mismatch Repair-Deficient/Microsatellite Instability–High Metastatic Colorectal Cancer, *Journal of Clinical Oncology* 2018 ;36(8) :773-779
24. André T, Shiu K-K, Kim TW, Jensen BV, Jensen LH, Punt C et al, Pembrolizumab in Microsatellite-Instability–High Advanced Colorectal Cancer, *N Engl J Med*; 383:2207-2218, doi: 10.1056/NEJMoa2017699
25. Commission de la Transparence de la Haute Autorité de Santé, Avis du 2 juin 2021, pembrolizumab KEYTRUDA, Nouvelle indication, Cancer colo-rectal (https://www.has-sante.fr/jcms/p_3272286/fr/keytruda-pembrolizumab-cancer-colorectal-metastatique)
26. Loupakis F, Depetris I, Biason P, Intini R, Prete AA, Leone F et al, Prediction of Benefit from Checkpoint Inhibitors in Mismatch Repair Deficient Metastatic Colorectal Cancer: Role of Tumor Infiltrating Lymphocytes, *Oncologist*. 2020 Jun;25(6):481-487. doi: 10.1634/theoncologist.2019-0611
27. Rousseau B, Foote MB, Marin SB, Diplas BH, Lu S et al, The Spectrum of Benefit from Checkpoint Blockade in Hypermutated Tumors, *N Engl J Med*. 2021;25;384(12):1168-1170. doi: 10.1056/NEJMc2031965
28. Peng Z, Cheng S, Kou Y, Wang Z, Jin R, Hu H et al, The Gut Microbiome Is Associated with Clinical Response to Anti–PD-1/PD-L1, *Cancer Immunol Res* 2020; 8 (10): 1251–1261. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-19-1014>
29. Ishikawa H, Barber GN, STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling, *Nature*. 2008;455(7213):674-8. doi: 10.1038/nature07317
30. Barber GN, STING: infection, inflammation and cancer, *Nat Rev Immunol*. 2015;15:760-770. doi:10.1038/nri3921
31. Woo S-R, Fuertes M B, Corrales L, Spranger S, Furdyna M J, Leung MYK et al, STING-Dependent Cytosolic DNA Sensing Mediates Innate Immune Recognition of Immunogenic Tumors, *Immunity* 2014 ;41 : 830–842. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.017>
32. Xia T, Konno H, Ahn J, and Barber GN, Deregulation of STING Signaling in Colorectal Carcinoma Constrains DNA-Damage Responses and Correlates With Tumorigenesis, *Cell Rep*. 2016 ; 14(2): 282–297. doi:10.1016/j.celrep.2015.12.029
33. Zhong G, Peng C, Chen Y, Li J, Yang R, Wu M et al, Expression of STING and PD-L1 in colorectal cancer and their correlation with clinical prognosis, *Int J Clin Exp Pathol* 2018;11(3):1256-1264

34. Chon HJ, Kim H, Noh JH, Yang H, Lee WS, Kong SJ et al., STING signaling is a potential immunotherapeutic target in colorectal cancer, *Journal of Cancer* 2019; 10(20): 4932-4938.
doi: 10.7150/jca.32806
35. Guan J, Lu C, Jin Q, Lu H, Chen X, Tian L et al., MLH1 Deficiency-Triggered DNA Hyper-Excision by Exonuclease 1 Activates the cGAS-STING Pathway, *Cancer Cell*. 2021; 39(1): 109–121.e5.
doi:10.1016/j.ccell.2020.11.004
36. Chen S-Y, Chen S, Feng W, Li Z, Luo Y, Zhu X, A STING-related prognostic score predicts high-risk patients of colorectal cancer and provides insights into immunotherapy, *Ann Transl Med* 2021;9(1):14,
doi: 10.21037/atm-20-2430
37. Wang H, Hu S, Chen X, Shi H, Chen C, Sun L et al., cGAS is essential for the antitumor effect of immune checkpoint blockade, *PNAS* 2017;114(7):1637-1642
www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1621363114
38. Lu C, Guan J, Lu S, Jin Q, Rousseau B, Lu T et al., DNA Sensing in Mismatch Repair-Deficient Tumor Cells Is Essential for Anti-tumor Immunity, *Cancer Cell* 2021;39, 96–108
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.11.006>
39. Gerlinger M, Immunotherapy Sensitivity of Mismatch Repair-Deficient Cancer: Mutation Load Is Not Enough, *Cancer Cell* 2021, 39 : 16-18
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.12.016>
40. Lohinai Z, Dora D, Caldwell C, Rivard CJ, Suda K, Yu H et al., Loss of STING expression is prognostic in non–small cell lung cancer, *J Surg Oncol*. 2022;125:1042–1052,
doi: 10.1002/jso.26804
41. Kitajima S, Ivanova E, Guo S, Yoshida R, Campisi M, Sundararaman S.K. et al., Suppression of STING associated with LKB1 loss in KRAS- driven lung cancer, *Cancer Discov*. 2019 ; 9(1): 34–45.
doi:10.1158/2159-8290.CD-18-0689
42. Song S, Peng P, Tang Z, Zhao J, Wu W, Li H et al., Decreased expression of STING predicts poor prognosis in patients with gastric cancer. *Sci. Rep*. 2017, 7, 39858;
doi: 10.1038/srep39858.
43. Parkes E.E., Humphries MP, Gilmore E, Sidi FA, Bingham V, Phyu S M et al., The clinical and molecular significance associated with STING signaling in breast cancer, *Breast Cancer* 2021, 7:81 ;
<https://doi.org/10.1038/s41523-021-00283-z>
44. Lee K-M, Lin C-C, Servetto A, Bae J, Kandagatla V, Ye D et al., Epigenetic repression of STING by MYC promotes immune evasion and resistance to immune checkpoint inhibitors in triple negative breast cancer, *Cancer Immunol Res*. 2022; 10(7): 829–843.
doi:10.1158/2326-6066.CIR-21-0826

45. Pantelidou C, Sonzogni O, De Oliveria Taveira M, Mehta AK, Kothari A, Wang D et al., PARP inhibitor efficacy depends on CD8+ T cell recruitment via intratumoral STING pathway activation in BRCA-deficient models of triple-negative breast cancer, *Cancer Discov.* 2019; 9(6): 722–737.
doi:10.1158/2159-8290.CD-18-1218
46. Ding L, Kim H-J, Wang Q, Kearns M, Jiang T, Ohlson C.E. et al., PARP Inhibition Elicits STING-Dependent Antitumor Immunity in Brca1-Deficient Ovarian Cancer, *Cell Rep.* 2018 December 11; 25(11): 2972–2980.e5.
doi:10.1016/j.celrep.2018.11.054
47. Takayanagi-Hara R, Sawada Y, Sugino H, Minokawa Y, Kawahara-Nanamori H, Itamura M et al., STING expression is an independent prognostic factor in patients with mycosis fungoides, *Sci Rep* 2022, 12:12739,
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-17122-1>
48. Biesaga B, Smolarczyk R, Mucha-Małecka A, Czapla J, Rys J and Małecki K, Prognostic Significance of STING Immunoexpression in Relation to HPV16 Infection in Patients with Squamous Cell Carcinomas of Oral Cavity and Oropharynx, *Biomedicines* 2022, 10, 2538.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines10102538>
49. Luo X, Donnelly C.R., Gong W, Heath B.R., Hao Y, Donnelly L.A et al., HPV16 drives cancer immune escape via NLRX1-mediated degradation of STING, *J Clin Invest.* 2020;130(4):1635–1652.
<https://doi.org/10.1172/JCI129497>.
50. Nakamura T, Sato T, Endo R, Sasaki S, Takahashi N, Sato Y et al., STING agonist loaded lipid nanoparticles overcome anti-PD-1 resistance in melanoma lung metastasis via NK cell activation. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 2021;9:e002852.
doi:10.1136/jitc-2021-002852
51. Fu J, Kanne DB, Leong M, Hix Glickman L, McWhirter SM, Lemmens E et al., STING agonist formulated cancer vaccines can cure established tumors resistant to PD-1 blockade, *Sci Transl Med.* 2015 ; 7(283): 283ra52.
doi:10.1126/scitranslmed.aaa4306
52. Le Naour J, Zitvogel L, Galluzzi L, Vacchelli E and Kroemer G, Trial watch: STING agonists in cancer therapy, *Oncoimmunology* 2020;9(1) :1–12
<https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1777624>
53. Zheng J, Mo J, Zhu T, Zhuo W, Yi Y, Hu S et al., Comprehensive elaboration of the cGAS- STING signaling axis in cancer development and immunotherapy, *Molecular Cancer* 2020;19:133
<https://doi.org/10.1186/s12943-020-01250-1>
54. Whitehead J., Sample size calculations for ordered categorical data, *Statistics in Medicine*, John Wiley & Sons, Chichester (England), vol. 24, issue 12, p.2257-71, 1993
55. Hollander, M. and Wolfe, D. A. (1999), *Nonparametric Statistical Methods*, 2nd Edition, New York: John Wiley & Sons.

56. Ghiringhelli F and Fumet J-D, Is There a Place for Immunotherapy for Metastatic Microsatellite Stable Colorectal Cancer? , *Front. Immunol.* 2019 ;10:1816.
doi: 10.3389/fimmu.2019.01816
57. Chalabi M, Fanchi LF, Dijkstra KK, Van den Berg JG, Aalbers AG, Sikorska K et al., Neoadjuvant immunotherapy leads to pathological responses in MMR-proficient and MMR-deficient early-stage colon cancers. *Nat Med.* 2020 Apr;26(4):566-576.
doi: 10.1038/s41591-020-0805-8.
58. Fabrizio D A, George T J Jr, Dunne R F, Frampton G, Sun J, Gowen K et al., Beyond microsatellite testing: assessment of tumor mutational burden identifies subsets of colorectal cancer who may respond to immune checkpoint inhibition, *J Gastroint Oncol*, 2018;9(4):610-617.
doi: 10.21037/jgo.2018.05.06
59. Domingo E, Freeman-Mills L, Rayner E, Glaire M, Briggs S, Vermeulen L et al., Somatic *POLE* proofreading domain mutation, immune response, and prognosis in colorectal cancer: a retrospective, pooled biomarker study, *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2016; 1: 207–16.
<http://dx.doi.org/10.1016/>
60. Shia J, Schultz N, Kuk D, Vakiani E, Middha S, Segal N H et al., Morphological characterization of colorectal cancers in The Cancer Genome Atlas reveals distinct morphology–molecular associations: clinical and biological implications, *Modern Pathology* 2017 ;30 :599–609.
doi:10.1038/modpathol.2016.198
61. Ahn S-M, Ansari A A , Kim J, Kim D4, Chun S-M, Kim J et al., The somatic *POLE* P286R mutation defines a unique subclass of colorectal cancer featuring hypermutation, representing a potential genomic biomarker for immunotherapy, *Oncotarget* 2016;42(7) : 68638-49.
62. Bourdais R, Rousseau B, Pujals A, Bouission H, Joly C, Guillemin A et al. Polymerase proofreading domain mutations: New opportunities for immunotherapy in hypermutated colorectal cancer beyond MMR deficiency. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2017; 113: 242-248.
<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.03.027>.
63. Kunac, N.; Degoricija, M.; Viculin, J.; Omerović, J.; Terzić, J.; Vilović, K et al., Activation of cGAS-STING Pathway Is Associated with MSI-H Stage IV Colorectal Cancer. *Cancers* 2023;15:221.
<https://doi.org/10.3390/cancers15010221>
64. Kaneta A, Nakajima S, Mimura K, Kono K., Expression of the cGAS-STING Pathway in dMMR/MSI-H in Colorectal Cancer,. *Gan To Kagaku Ryoho.* 2022 Oct;49(10):1130-1132. Japanese. PMID: 36281609.
65. Cercek A, Lumish M, Sinopoli J, Weiss J, Shia J, Lamendola-Essel M et al., PD-1 Blockade in Mismatch Repair–Deficient, Locally Advanced Rectal Cancer, *N Engl J Med* 2022;386:2363-76.
doi: 10.1056/NEJMoa2201445

Expression immunohistochimique de la protéine STING dans les cancers colo-rectaux avec un système MMR déficient ou fonctionnel

Introduction

En 2018, le cancer colo-rectal (CCR) représentait le 3^{ème} cancer en termes de fréquence et la 2nde cause de mortalité par cancer dans le monde. Le CCR est subdivisé en deux catégories selon que le système des protéines MMR (*MisMatch Repair*) est fonctionnel (pMMR) ou déficient (dMMR). Actuellement, le statut dMMR est le seul biomarqueur de réponse à l'immunothérapie par inhibiteurs des points de contrôle immunitaire (ICI) dans le CCR métastatique (CCRM). Néanmoins, 30% des patients présentent une résistance primaire aux ICI, ce qui renforce l'intérêt d'étudier de nouveaux biomarqueurs. Découverte en 2008, STING est une protéine impliquée dans l'immunité anti-tumorale. Chez des modèles murins, cette voie est activée dans les CCR dMMR et est indispensable à la réponse à l'immunothérapie par ICI.

Notre hypothèse est que l'expression immunohistochimique (IHC) de STING pourrait être un biomarqueur de réponse aux ICI dans le CCR.

Nous avons comparé l'expression IHC de STING entre des CCR dMMR et des CCR pMMR.

Matériel et Méthodes

Une cohorte rétrospective monocentrique d'adénocarcinomes colo-rectaux a été constituée à partir de pièces opératoires reçues entre 2017 et 2021. Le statut MMR tumoral a été confirmé à la fois en IHC et par PCR. Les CCR dMMR ont été stratifiés selon le stade tumoral (UICC 2017) et la date de réception de la pièce avec les CCR pMMR. L'immunomarquage STING (clone D2P2F, Cell Signaling ®) a été évalué au niveau des cellules tumorales (calcul du H-score) en aveugle du statut MMR tumoral.

Résultats

Parmi les 96 CCR inclus (48 CCR dMMR dont 7 correspondaient à un syndrome de Lynch et 48 CCR pMMR), les H-scores médians étaient évalués à 80 (Q1–Q3 : 10–150) chez les CCR dMMR et à 10 (Q1–Q3 : 0–40) chez les CCR pMMR ($p < 0.001$). 25% des CCR dMMR avaient un H-score ≤ 10 tandis que 21% des CCR pMMR avaient un H-score ≥ 80 .

Conclusion

STING est surexprimé en immunohistochimie dans les CCR dMMR par comparaison aux CCR pMMR. De façon intéressante, 25% des CCR dMMR ont une expression nulle ou très faible de STING et pourraient correspondre aux patients non répondeurs aux ICI. L'immunomarquage STING pourrait être un biomarqueur prédictif de la réponse aux ICI. Cette hypothèse est à valider par de futures études cliniques.

Mots clés

Cancer colo-rectal, Instabilité microsatellitaire, MMR déficient, STING, Immunothérapie, Immunohistochimie.