

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année 2016

N° 179

THESE

pour le

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Spécialité Anatomie et Cytologie pathologiques

par

Eva OTT

née le 26 juillet 1986 à SAINT MANDE (Val-de-Marne)

Présentée et soutenue publiquement le 4 octobre 2016

LES ADENOCARCINOMES COLORECTAUX MSI DE TYPE MEDULLAIRE SE
CARACTERISENT PAR UN MICROENVIRONNEMENT IMMUNITAIRE PARTICULIER :
UNE CIBLE DE CHOIX POUR LES IMMUNOTHERAPIES VISANT L'AXE PD-1/PD-L1.

Président : Monsieur le Professeur MOSNIER Jean-François

Directeur de thèse : Madame le Professeur BOSSARD Céline

Membres du jury : Monsieur le Professeur BEZIEAU Stéphane
Monsieur le Professeur MEURETTE Guillaume
Monsieur le Docteur TOUCHEFEU Yann

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Jean-François Mosnier,

Qui me fait l'honneur de présider ce jury de thèse.

Je profite de ce travail pour vous exprimer ma reconnaissance d'avoir accepté ma venue dans cette filière. Je vous remercie également pour la qualité de votre enseignement lors de mon internat. En espérant être à la hauteur de vos attentes sur ce sujet qui vous tient à cœur. Je vous prie de trouver ici l'expression de mon profond respect.

A Madame le Professeur Céline Bossard,

Qui me fait l'honneur de diriger cette thèse.

Je te remercie pour ta disponibilité tout au long de ce travail et tes conseils pour la rédaction. Je te tiens aussi à te remercier pour ton enseignement en pathologie ainsi que ton soutien appuyé dans mon cursus professionnel particulier. Je te prie de trouver ici toute ma gratitude et mon respect.

A Monsieur le Professeur Stéphane Bézieau,

Qui me fait l'honneur d'être membre de mon jury de thèse.

Je vous remercie de juger ce travail et de l'intérêt que vous lui porterez.

Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Guillaume Meurette,

Qui me fait l'honneur d'être membre de mon jury de thèse.

Je vous prie de trouver ici l'expression de mon respect et de ma reconnaissance pour avoir bien voulu juger ce travail.

A Monsieur le Docteur Yann Touchefeu,

Qui me fait l'honneur d'être membre de mon jury de thèse.

Je vous remercie d'avoir accepté si rapidement de participer à ce jury.

Soyez assuré de mon respect et de ma gratitude.

Merci à l'ensemble du personnel du service d'anatomopathologie du CHU de Nantes, à tous les médecins, techniciens et secrétaires. Merci, en particulier, au Docteur Elisabeth Cassagnau, pour ses enseignements et son engagement afin que je puisse poursuivre mon double cursus, au Professeur Christian Laboisse, pour avoir accepté mon droit au remord vers cette jolie spécialité, à Laure, pour son éternelle bonne humeur, au Docteur Christine Kandel-Aznar pour son soutien, au Docteur Christine Sagan, pour sa sympathie et ses encouragements. Je souhaite également remercier particulièrement les techniciens d'immunohistochimie du service.

A l'équipe du service d'anatomopathologie du CH de Saint Nazaire, au Dr Pascale Guerzider et Dr Laurent Benard pour leur disponibilité, au Dr Aude Colson-Rapin, au Dr Julie Gonin, pour leur soutien, merci aux secrétaires et aux techniciens.

Au Docteur Renaud Clément, à l'ensemble du service de médecine légale de Nantes, Guillaume, David, Leslie, Lucia, Laurent, Claude, aux agents du service mortuaire. Merci pour vos enseignements et pour les bons moments passés ensemble.

A l'ensemble du service de Médecine légale de Limoges, merci au Professeur Paraf, pour sa disponibilité lors de mon dernier semestre et pour toutes les connaissances qu'il m'a transmis, merci à Fanny, Sylvine, Maxime et Anaïs.

Merci à mes collègues et amis. A ma chère Fanny, à Marie-Elyse, à Lilia.
A mes anciens coexternes parisiens, en particulier, Mini la réunionnaise, Anne et Stéphanie O.
Aux internes de Laennec, Camille, Anne, Dylan, Dean, Justin, Paulette, Moles, Cécile, Joséphine, Lulu, Guéno, à Nénette...merci pour ce début d'internat, un chouya animé avec vous. Merci à Stéphanie V., suédoise dans l'âme, Elise, Tiphaine et Audrey.

Merci à mes co-internes d'anatomopathologie pour cet internat ensemble : « Charles Edward » et Cie, Delphine « DD », Juliette et Cie, Othman, Marie, Salim, Oli, avec une mention particulière à Faustine (complice de stages et soirées) et à Clotilde (ou bien « Chlothilde ») et Cie.

Merci aux internes avec qui j'ai partagé l'internat de Limoges, à Marie-Lys, Lorène, Guillaume, Julien, pour leur soutien et sympathie pour ce dernier et ultime semestre.

A ma famille, à mes grands-parents disparus qui ne me verront pas Docteur, en particulier Mamie, si fière, à l'époque, de me présenter dans les rues de Chaumes-en-Brie, comme « future Docteur ».

A ma sœur chérie Mélanie (« Manie » ou Dr Ott-Masson, il est loin le temps de « c'est du brouillon ?»), à Vincent mon BF, aux petits, Andrea, mon filleul, et Nina, pour leur soutien « naïf » mais tellement sincère dans les moments de fatigue. Avec tout mon amour.

A ma sœur Olivia, qui est sûrement le pourquoi de ce que je suis et fais désormais.

A mes parents. A mon père et son sempiternel, mais bienveillant, dicton « courage et confiance ». A ma mère, toujours présente et aimante. Merci de m'avoir toujours soutenue dans ma vie personnelle et dans mon parcours professionnel. J'en profite pour vous exprimer tout mon amour.

A Sullivan, merci pour tout, « trotro » et plus encore.

Merci enfin à tous ceux que j'aurai pu oublier.

*« Ce n'est pas parce que les choses sont difficiles que nous n'osons pas,
mais parce que nous n'osons pas qu'elles sont difficiles. »*

Sénèque

Table des matières

GENERALITES	8
I. LE CANCER COLO-RECTAL.....	8
I.1. Epidémiologie.....	8
I.2. Classification anatomo-pathologique des adénocarcinomes colorectaux	9
I.1.1. Caractéristiques des adénocarcinomes médullaires.....	10
I.3. La classification moléculaire des CCR.....	11
I.3.1. Les voies d’instabilité moléculaire	11
I.3.2. Proposition de nouvelle classification moléculaire des CCR	15
I.4. Aspects thérapeutiques.....	17
II. L’AVENEMENT DES IMMUNOTHERAPIES EN PATHOLOGIE TUMORALE.....	18
II.1. La réponse immunitaire anti-tumorale idéale	18
II.1.1. La théorie de l’immunosurveillance	18
II.1.2. Les effecteurs cellulaires impliqués dans la réponse anti-tumorale.....	19
II.1.3. Le cycle de l’immunité anti-tumorale	20
II.2. Les mécanismes d’échappement de la tumeur à la réponse immunitaire	22
II.2.1. Le couple récepteur ligand PD-1/PD-L1	22
II.2.1.1. Description et profil d’expression en physiologie et pathologie tumorale	23
II.2.1.2. Effets biologiques	25
II.2.1.3. Applications en oncologie générale	27
II.2.1.4. Application au cancer colorectal.....	30
II.2.2. IDO-1, enzyme immunosuppressive du microenvironnement tumoral	33
II.2.2.1. Description et profil d’expression en physiologie et pathologie tumorale	33
II.2.2.2. Effets biologiques	34
II.2.2.3. Application en oncologie générale.....	35
II.2.2.4. Application au cancer colorectal.....	36

OBJECTIFS DE L'ETUDE	38
PATIENTS ET METHODES.....	39
I- Patients.....	39
II - Recueil des données anatomopathologiques et cliniques.....	40
III – Immunohistochimie.....	40
IV - Analyses statistiques	44
RESULTATS.....	45
I - Caractéristiques anatomo-cliniques des patients.....	45
II - L'expression de PD-L1 était plus fréquente dans les CCR MSI, et notamment dans le sous-type médullaire où PD-L1 était exprimé par les cellules tumorales.	47
III - IDO-1 était essentiellement exprimée par les cellules tumorales, de manière significative dans les trois groupes de CCR.	53
IV – Les densités en TIL PD-1+ et T-bet+ étaient significativement plus élevées dans les CCR MSI, notamment les CCR de sous-type médullaire, étaient corrélées entre elles et à l'expression de PD-L1. ...	56
DISCUSSION	61
ANNEXES.....	67
BIBLIOGRAPHIE.....	71

LISTE DES ABREVIATIONS

ADK : adénocarcinome
AM : adénocarcinome médullaire
CCR : cancer colo-rectal
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CT : cellules tumorales
CTLA-4 : cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
FDA : Food and Drug Administration
HES : hémalun-éosine-safran
IDO-1 : Indoleamine 2,3-dioxyenase
IFN- γ : interféron gamma
IL : interleukine
MMR : MisMatch Repair
MSI : MicroSatellite Instability
MSS : MicroSatellite Stability
NR : non renseigné
NSCLC : non small cell lung carcinoma
PD-1: programmed cell death 1
PD-L1 : programmed cell death ligand 1
TCR : récepteur des lymphocytes T
TIL : lymphocytes intra-tumoraux
Th1 : lymphocyte T helper 1
TMA : Tissue MicroArray
TNM : Tumor Node Metastase
UICC : Union Internationale Contre le Cancer
WHO : World Health Organisation
MET : microenvironnement tumoral
SI : système immunitaire
ST : stroma
CI : checkpoint immunitaire

GENERALITES

I. LE CANCER COLO-RECTAL

I.1. Epidémiologie

Le CCR est le 3^{ème} cancer le plus fréquent dans le monde, avec 1,2 millions de nouveaux cas et 600000 décès par an (1). La France est l'un des pays d'Europe où l'incidence du CCR est la plus élevée pour les deux sexes. Il a touché 43 000 personnes et a causé 17 500 décès en 2015 en France (2). L'âge moyen au diagnostic est de 70 ans dans les pays développés (1). 20% des patients sont métastatiques au moment du diagnostic.

Le taux de survie relative à 5 ans est de 56 % mais est très variable en fonction du stade de la maladie. En effet, le stade pTNM (pathological Tumor Node Metastasis - 7^{ème} édition publiée par l'UICC, Union Internationale contre le Cancer, en 2009, tableau 1 en annexes) est le principal facteur pronostique reconnu de manière consensuelle. Il précise les facteurs histopronostiques suivants : la taille de la tumeur (pT), l'extension ganglionnaire locale (pN) et l'extension métastatique à distance (pM). La survie globale à 5 ans est de 94 % pour les stades I ; 80 % pour les stades II ; 47 % pour les stades III ; et seulement 5 % pour les stades IV (données de l'HAS en 2013).

Cependant, certains auteurs ont proposé l'immunoscore, basé sur la densité en lymphocytes T mémoires CD45RO+ et cytotoxiques CD8+, comme nouveau facteur pronostique. L'immunoscore semble, en effet, plus puissant que le stade pTNM (3) et permettrait même d'effacer la différence pronostique reconnue entre les CCR MSI et les CCR MSS (4). Ces auteurs proposent donc la nouvelle classification TNM-I (TNM-Immune) pour prédire au mieux la survie des patients. Elle est d'ailleurs en cours de validation au sein d'un consortium international (3).

1.2. Classification anatomo-pathologique des adénocarcinomes colorectaux

D'un point de vue morphologique, plusieurs sous-types d'adénocarcinomes sont décrits dans la classification des tumeurs du système digestif de l'Organisation Mondiale de la Santé (World Health Organisation (WHO), édition 2010, tableau 2 en annexes).

Les adénocarcinomes sans autre spécificité (Not Otherwise Specified) sont les plus fréquents (80%). Ils sont gradés selon le degré de différenciation de la prolifération tumorale, c'est-à-dire le pourcentage de structures pseudo-glandulaires constituant la tumeur : bien différenciés (>95% de structures pseudo-glandulaires), moyennement différenciés (50-95%) et peu différenciés (<50%) (5). Les adénocarcinomes peu différenciés ou indifférenciés sont reconnus pour être de moins bon pronostic (6).

Parmi les variantes histologiques, on retrouve notamment :

- les adénocarcinomes mucineux, définis par une composante mucineuse extra-cellulaire, représentant plus de 50% du volume tumoral,
- les carcinomes à cellules en bague à chaton (<1% des CCR),
- les adénocarcinomes festonnés
- les adénocarcinomes médullaires (5,7).

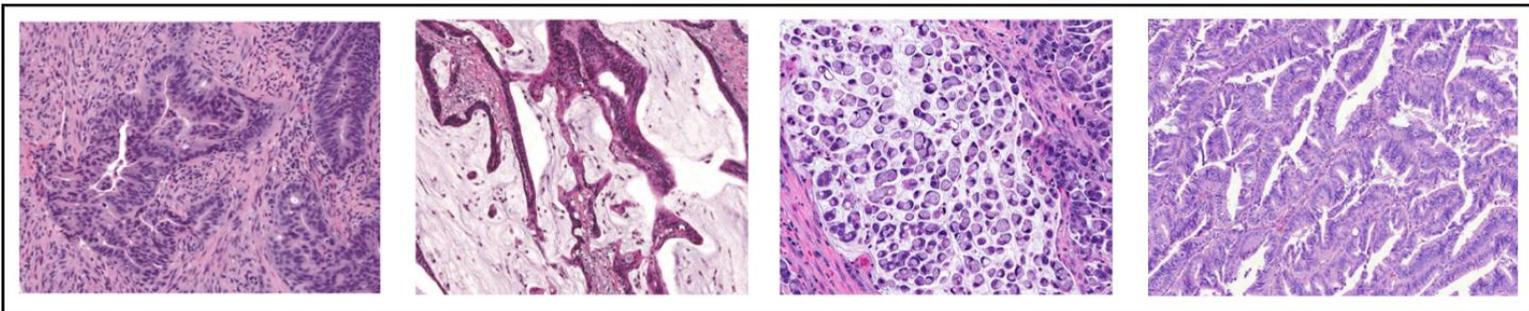


Figure 1: Aspect microscopique des différents CCR (Flemming et al, 2012 et Nagtegaal et al, 2015)

De gauche à droite : adénocarcinomes NOS moyennement différencié, mucineux, à cellules en bagues à chatons et festonné.

I.1.1. Caractéristiques des adénocarcinomes médullaires

Les adénocarcinomes de type médullaire (AM) correspondent à une variante histologique extrêmement rare de CCR. La classification OMS 2010 définit ce sous-type à l'aide des critères morphologiques suivants : nappes de cellules tumorales avec un large noyau vésiculeux, au nucléole proéminent et un abondant cytoplasme éosinophile, associées à un abondant infiltrat lymphocytaire intra-tumoral et péri-tumoral (figure 2). Ils sont très souvent associés à un phénotype MSI. Cette définition ne précise pas le pourcentage de la tumeur devant présenter ces caractéristiques morphologiques, ni la richesse exacte en TIL nécessaire.

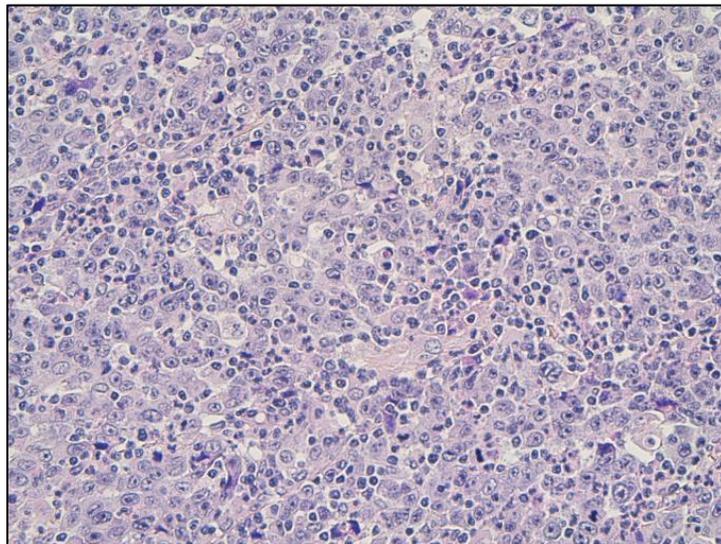


Figure 2 : Aspect microscopique d'un adénocarcinome médullaire (HES x 20)

D'après une méta-analyse récente, leur prévalence moyenne est estimée à 2,7% des CCR, mais variant de 2,8 à 4% selon les études en fonction notamment du pourcentage de la composante médullaire quand elle était précisée (8–11). Hinoi et al utilisaient, quant à eux, le terme de carcinome peu différencié à grandes cellules comme équivalent d'AM (12).

D'un point de vue anatomo-clinique, les AM touchent davantage les femmes avec un âge moyen au diagnostic de 77 ans, siègent préférentiellement au niveau du colon droit avec des lésions de plus grande taille, classée le plus souvent pT3-pT4 au moment du diagnostic (8,11). Les

métastases ganglionnaires sont plus rares dans les AM comparativement aux ADK peu ou moyennement différenciés (8).

Enfin, d'un point de vue moléculaire, près de 90% des AM ont un phénotype MSI (MicroSatellite Instability) d'après une méta-analyse récente (8).

Malgré leur caractère morphologique peu différencié, les AM ont un meilleur pronostic que des ADK bien ou peu différenciés (7,11,15). Ils semblent également être de meilleur pronostic que les CCR MSI de même stade, âge et grade (11). Il est donc important de les différencier des adénocarcinomes NOS peu différenciés ou indifférenciés, qui représentent le principal diagnostic différentiel. Néanmoins, ce diagnostic différentiel n'est pas toujours aisé et certains auteurs proposent de s'aider du phénotype MSI et de la perte d'expression de MLH1 en IHC notamment (14,15). La perte d'expression de ARID1A, gène suppresseur de tumeur, notamment décrit dans l'ovaire et dont le rôle est de réguler la structure de gènes en remodelant la chromatine, a aussi été proposée comme aide au diagnostic des AM (8,16).

I.3. La classification moléculaire des CCR

I.3.1. Les voies d'instabilité moléculaire

Trois voies d'instabilité moléculaire ont été décrites dans la carcinogénèse colorectale, non exclusives et se chevauchant dans certains cas (figure 3) :

- la voie d'instabilité chromosomique CIN (Chromosomal Instability) représentant 75% des CCR,
- la voie d'hyper méthylation des îlots CpG CIMP représentant 25% des CCR,
- la voie de l'instabilité microsatellitaire MSI représentant 15% des CCR (17).

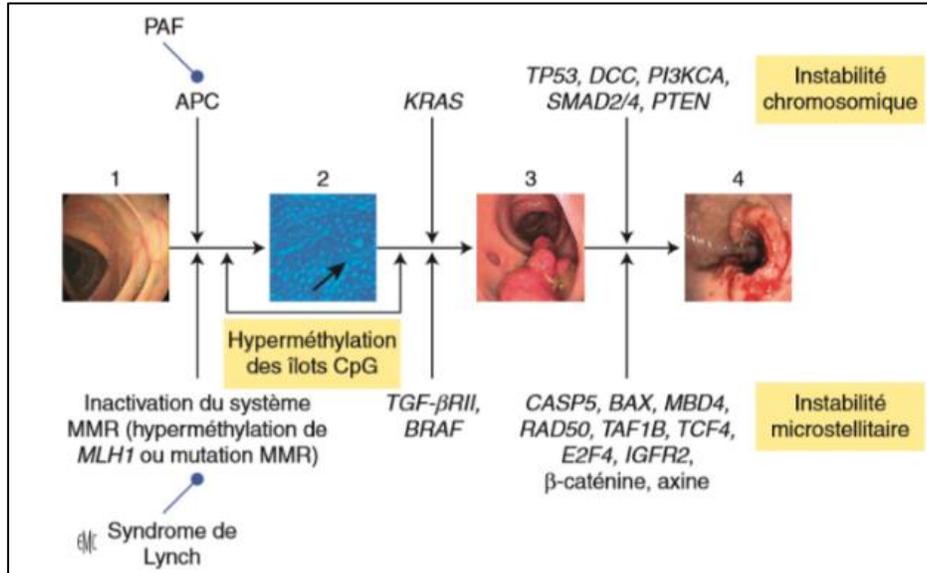


Figure 3: Principales anomalies moléculaires selon les voies de carcinogénèse (Tougeron et al, 2014)

1.3.1.1. La voie CIN d'instabilité chromosomique

La voie **CIN**, décrite par Fearon et Vogelstein en 1990 (18), se caractérise par l'acquisition séquentielle et l'accumulation d'anomalies chromosomiques au cours de l'évolution tumorale aboutissant à la séquence « adénome-carcinome ». Elle concerne la majorité des CCR sporadiques. Cette voie a été initialement décrite dans un syndrome de prédisposition héréditaire au CCR, la polypose adénomateuse familiale (PAF), de transmission autosomique dominante (1 % des CCR). Cette voie se caractérise par des pertes alléliques sur le bras court des chromosomes 17 et 8 et sur le bras long des chromosomes 18, 5 et 22 (19). Ces pertes alléliques sont associées à des mutations des gènes suppresseurs de tumeurs tels que APC, TP53, SMAD2/3 ou proto-oncogène KRAS et participent ainsi à l'inactivation bi-allélique de ces gènes (17).

1.3.1.2. La voie CIMP

L'hyperméthylation des îlots CpG est la modification épigénétique la plus fréquente dans les CCR. Les îlots CpG sont des régions riches en dinucléotides cytosine-guanine localisées au niveau des promoteurs et dans les premiers exons des gènes (17,20).

Le phénotype méthylateur de ces îlots est appelé **CIMP**, et inclus en particulier les CCR de phénotype MSI (hyperméthylation du promoteur MLH1) de type sporadique et la mutation de BRAF. Les CCR CIMP sont plus souvent des tumeurs peu différenciées du colon droit, de la femme.

1.3.1.3. La voie d'instabilité microsatellitaire

L'instabilité **MSI** est la conséquence d'une défaillance du système de réparation des anomalies de réparation des mésappariements de l'ADN lors de sa réplication, le système MMR (Mismatch Repair). Ce système de réparation est constitué de 4 protéines, MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2, groupées en hétérodimères (MSH2/MSH6, MLH1/PMS2 et MSH2 peut également former un hétérodimère avec MSH3). A l'état normal, les erreurs de réplication sont réparées par le système MMR, participant à la stabilité du génome. Dans les CCR sporadiques, cette défaillance est secondaire à une anomalie épigénétique, l'hyperméthylation des îlots CpG du promoteur de MLH1. La défaillance du système MMR est à l'origine d'un phénotype « mutateur » induisant de très nombreuses mutations dans le génome, et en particulier dans des séquences répétées du génome, les séquences microsatellites. Les microsatellites sont des séquences d'ADN mono, di ou trinuécléotidiques répétées au sein du génome et dispersées dans les régions codantes et non codantes du génome. Lors de la réplication de l'ADN, les ADN polymérases sont plus enclins à faire des erreurs dans ces séquences microsatellites, soit par l'insertion de bases supplémentaires, soit par suppression de bases (figure 4)(21). La défaillance du système MMR est responsable d'une augmentation de ces erreurs. Il existe, ainsi, dans les cancers MSI une augmentation du taux de mutations de cadre de lecture et mutations faux-sens, par une accumulation de plusieurs insertions ou délétions de séquences microsatellites tout au long du génome (22).

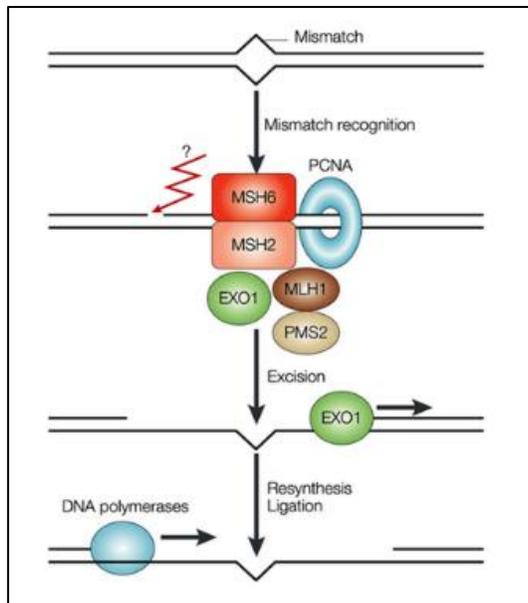


Figure 4: Représentation du système MMR (Martin et al, 2002)

En pratique clinique, la recherche d'une instabilité microsatellitaire est réalisée 1) à visée diagnostique, en cas de suspicion de cancer héréditaire de type Lynch (ou HNPCC, « Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer ») selon les critères de Bethesda révisés (23), représentant 2,5% des CCR MSI, et secondaire à une mutation constitutionnelle d'un gène MMR puis à un second événement, somatique, dans les cellules tumorales induisant une défaillance du système MMR, et 2) à visée thérapeutique. En effet, selon les recommandations du thésaurus national de cancérologie digestive, la détermination du statut MSI ou MSS de la tumeur est recommandée pour proposer l'indication d'une chimiothérapie adjuvante pour un patient opéré d'un cancer de stade II « à haut risque » (pT4, analyse de moins de 12 ganglions, présence d'embolies veineux, périnerveux et/ou lymphatiques, tumeur peu différenciée, perforation et occlusion révélatrice) (24,25). Une chimiothérapie adjuvante par 5-FU n'est pas recommandée pour les stades II « à haut risque » MSI. En effet, le statut MSI semble être un facteur de résistance à la chimiothérapie adjuvante par 5-FU seul (26). Certaines études ont cependant montré un bénéfice du FOLFOX chez des patients MSI (27,28). Pour les CCR MSI de stade III, d'après l'association des gastro-entérologues oncologues, l'ajout d'oxaliplatine à la chimiothérapie adjuvante permettrait cependant de contrebalancer les effets délétères du 5FU seul (29).

L'étude du phénotype MSI fait appel à 2 techniques complémentaires : l'immunohistochimie et la biologie moléculaire. L'IHC va permettre d'objectiver l'absence d'expression tissulaire d'une des protéines de réparation des mésappariements de l'ADN du système MMR, MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2 sur coupes en paraffine. La biologie moléculaire par PCR multiplex va mettre en évidence l'instabilité des séquences microsatellites. Un changement de taille d'au moins deux des cinq marqueurs microsatellites mono et dinucléotidiques dans la tumeur par rapport à la normale définit le phénotype MSI-H (High), tandis que le phénotype MSS ne présente aucun marqueur microsatellite instable (30,31).

Les CCR MSI sont de préférence observés dans le côlon proximal chez la femme âgée. Morphologiquement, les CCR MSI sont des tumeurs riches en lymphocytes intra-tumoraux et péri-tumoraux avec des aspects de type « Crohn-like » et un front d'invasion de type expansif. Ils correspondent le plus souvent aux variantes histologiques mucineux, à cellules en bagues à chatons ou médullaire. D'après Alexander et al, le type histologique médullaire, la lymphocytose intra-épithéliale et la faible différenciation seraient les meilleurs critères pour déterminer le caractère MSI (avec une forte spécificité mais toutefois une faible sensibilité) (10).

Le pronostic des CCR MSI est meilleur que celui des CCR MSS à stade égal, notamment pour les stades II-III (32). Ils sont associés à une faible fréquence des métastases à distance (33).

1.3.2. Proposition de nouvelle classification moléculaire des CCR

Récemment, une nouvelle classification des CCR a été proposée, de manière consensuelle, par plusieurs groupes internationaux, intégrant des caractéristiques moléculaires et cliniques (figure 5). Cette classification repose sur l'étude transcriptionnelle de 4000 échantillons tumoraux, corrélée aux caractéristiques cliniques et permet d'identifier 4 sous types de CCR, permettant notamment de démembrer les CCR MSS et d'isoler les CCR MSI (34).

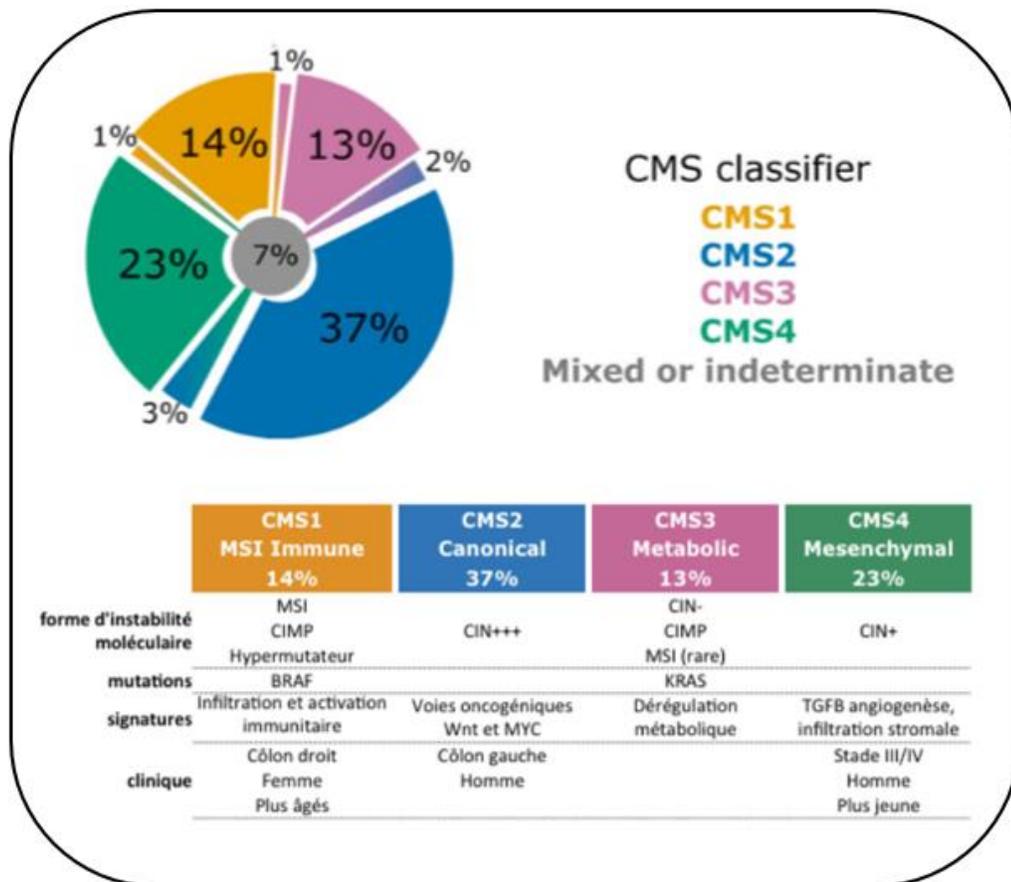


Figure 5: Distribution et caractéristiques des différents sous types moléculaires consensus d'après la taxonomie proposée par Guinney et al, 2015

Le sous-type CMS2, « canonique », représente 37% des CCR, principalement localisés dans le colon gauche et touchant des hommes. Il se caractérise par une instabilité chromosomique marquée et est associé aux voies de signalisation oncogéniques Myc et Wnt.

Le sous-type CMS3, « métabolique », représente 13% des CCR et se caractérise par une signature moléculaire métabolique dysrégulée et inclus à la fois des tumeurs CIN et CIMP, avec des mutations KRAS fréquentes.

Le sous-type CMS4, « mésenchymateux », représentant 23% des CCR, est de mauvais pronostic. Ces CCR sont caractérisés par une surexpression des gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse, dans l'angiogenèse, dans la voie d'activation du TGFβ, et du remodelage de la matrice extracellulaire.

Enfin, le sous-type **CMS1** représente 14% des CCR. Il correspond aux CCR MSI et CIMP, caractérisés par un phénotype hypermutateur, avec fréquemment une mutation de BRAF. Il se caractérise par une signature immunitaire Th1 et cytotoxique, contre-balancée par une surexpression de gènes immunorégulateurs pouvant participer à l'échappement tumoral au système immunitaire.

1.4. Aspects thérapeutiques

Le traitement des CCR repose principalement sur la chirurgie associée ou non à une chimiothérapie adjuvante. Après exérèse chirurgicale d'un CCR, la chimiothérapie est indiquée pour les stades III et est une option pour les stades II à « haut risque ». La chimiothérapie de référence est le FOLFOX.

Les patients métastatiques sont, quant à eux, le plus souvent, traités par des protocoles associant chimiothérapie et thérapie ciblée dirigée soit contre le récepteur à l'EGF (cetuximab, panitumumab) (epidermal growth factor) ou soit le VEGF (Vascular endothelial growth factor) (bevacizumab). Des essais cliniques testent actuellement l'efficacité des immunothérapies chez ces patients (PRODIGE 18, NCT00265824).

II. L'AVENEMENT DES IMMUNOTHERAPIES EN PATHOLOGIE TUMORALE

II.1. La réponse immunitaire anti-tumorale idéale

II.1.1. La théorie de l'immunosurveillance

La théorie de l'immunosurveillance des tumeurs a été initialement proposée par Paul Erlich au début du XX^{ème} siècle et reconnaissait au système immunitaire un rôle majeur dans le contrôle de la prolifération des cellules tumorales. Actuellement, la théorie des « 3 E » énoncée par Robert Schreiber ne fait que prolonger la théorie de l'immunosurveillance d'Erlich. Elle stipule que l'interaction du système immunitaire avec la cellule tumorale peut aboutir à l'**E**limination de la tumeur, à un **E**quilibre (contrôle de la prolifération tumorale sans éradication) ou à un **E**chappement de la cellule tumorale au système immunitaire, cette dernière phase étant la phase cliniquement visible (Figure 6) (35–37).

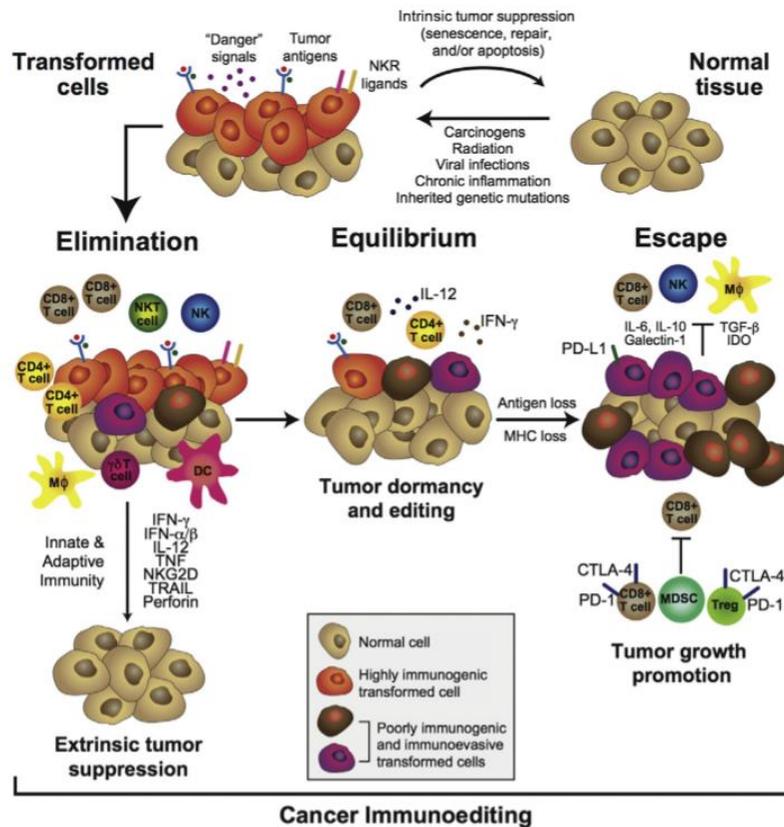


Figure 6 : Le concept d'immunoediting en trois phases (Ward et al, 2016)

Plusieurs arguments à la fois expérimentaux chez l'animal (souris déficientes en cellules ou molécules de l'immunité innée ou adaptative développent plus facilement des tumeurs (38)), épidémiologiques (les déficits immunitaires primitifs ou secondaires, induits, sont des facteurs de risques de développement de tumeurs malignes) ou cliniques chez l'homme (régression spontanée de cancer du rein ou mélanome associée à une réaction lymphocytaire T cytotoxique, meilleur pronostic des tumeurs infiltrées par de nombreux lymphocytes T CD8+ mémoires) plaident pour l'influence de la réponse immunitaire dans le contrôle tumoral. Trois facteurs sont impliqués à différents niveaux dans ce processus d'immunosurveillance : l'antigénicité tumorale plus ou moins marquée, et l'état du microenvironnement tumoral incluant la densité et la nature des cellules immunitaires (39).

II.1.2. Les effecteurs cellulaires impliqués dans la réponse anti-tumorale

La réponse immunitaire (SI) repose sur l'immunité innée et adaptative. L'**immunité innée** est non spécifique, basée sur la reconnaissance de motifs bactériens ou d'anomalies à la surface des cellules du soi (perte des molécules du CMH...), immédiate et sans mémoire. Elle fait intervenir notamment les granulocytes, les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules NK. Ces cellules interagissent avec les cellules de l'immunité adaptative que sont les lymphocytes T et les lymphocytes B. L'**immunité adaptative** se différencie de l'immunité innée par plusieurs points. Elle est durable, à l'origine d'une mémoire après un premier contact avec un antigène avec production d'anticorps via l'immunité humorale (40). Les lymphocytes T cytotoxiques CD8+ jouent un rôle prépondérant dans cette immunité. Ils sont capables d'une activité cytotoxique après la reconnaissance d'un complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I/peptide exprimé à la surface de la cellule tumorale, via la libération de granules cytotoxiques contenant des enzymes et cytotoxines (perforine, granzymes). Ils peuvent également induire l'apoptose de la cellule tumorale quand leur récepteur membranaire Fas reconnaît le ligand Fas-L sur la cellule tumorale. Les lymphocytes T CD4+ helper ont un rôle plus complexe et moins direct dans la réponse anti-tumorale. Les lymphocytes T CD4+ de type Th1 jouent notamment un rôle essentiel dans l'induction et la persistance des lymphocytes T CD8+ anti-tumoraux via la sécrétion de cytokines comme l'IL-2 ou l'IFN γ (40).

II.1.3. Le cycle de l'immunité anti-tumorale

La réponse immunitaire anti-tumorale est médiée en grande partie par les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques, selon un processus multi-étapes (Figure 7) (41).

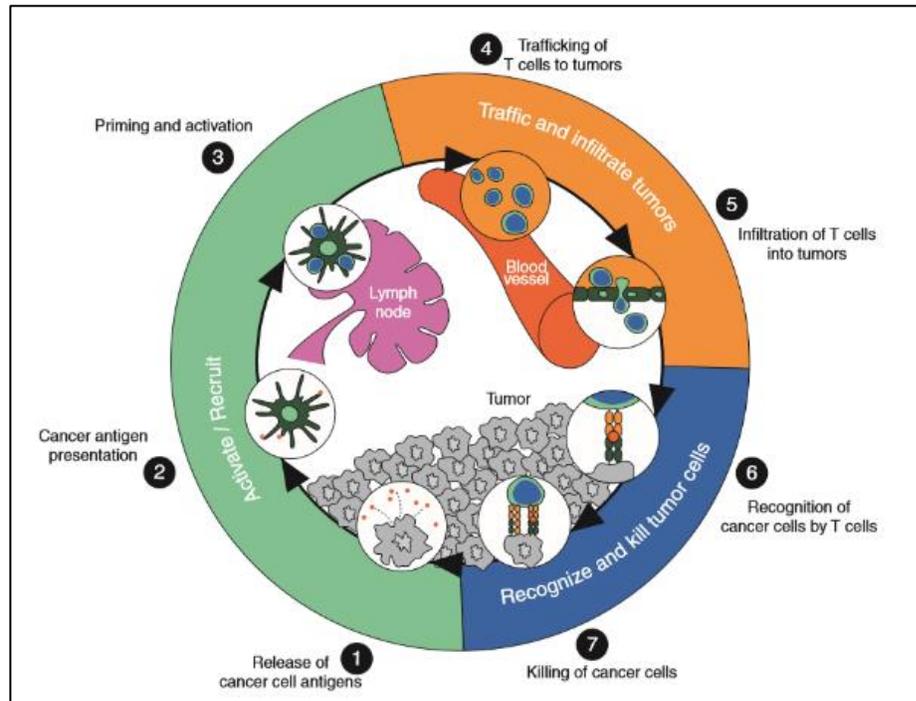


Figure 7. L'immunité anti-tumorale : un processus multi-étapes (Kim et Chen, 2016)

La mort des cellules tumorales entraîne le relargage d'antigènes tumoraux (étape 1) capturés et apprêtés par les cellules dendritiques, les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) les plus efficaces (étape 2). Ces CPA vont ensuite migrer dans le ganglion de drainage et présenter le complexe CMH/peptide aux lymphocytes T CD8+ et CD4+ via leur TCR (étape 3, reconnaissance antigénique par les LT appelée « priming » lymphocytaire) conduisant à l'activation et à la maturation des CPA. Au cours de ce processus, la CPA exprime à la membrane des molécules de co-stimulation CD80 ou CD86, OX40L, se liant à différents récepteurs lymphocytaires activateurs (dont CD28, OX40) optimisant l'activation, la différenciation, la prolifération, la cytotoxicité et la production cytokinique du lymphocyte T (dont l'IFN γ) ou des récepteurs inhibiteurs (PD-1, CTLA-4), limitant l'activation lymphocytaire durant cette étape de priming lymphocytaire (42) (figure 8).

Les lymphocytes T CD4+ naïfs, une fois activés, vont se différencier en lymphocytes T effecteurs CD4 helper (Th) de type Th1 notamment. Les Th1 produisent entre autre l'IFN γ qui favorise l'immunité cellulaire et active les cellules NK, les macrophages et vont aider également au priming des lymphocytes T CD8+ (Figure 9) (43). Les lymphocytes T effecteurs migrent du ganglion vers la tumeur (étape 4) et l'infiltrent (étape 5). Ils reconnaissent les cellules tumorales de façon spécifique via leur TCR qui reconnaît le complexe peptide/CMH (CMH de classe I pour les lymphocytes T CD8+ et CMH de classe II pour les lymphocytes T CD4) (étape 6). Il s'ensuit la destruction de la cellule tumorale via l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8+ (étape 7) et le relargage de néo-antigènes conduisant à un nouveau cycle (41,44).

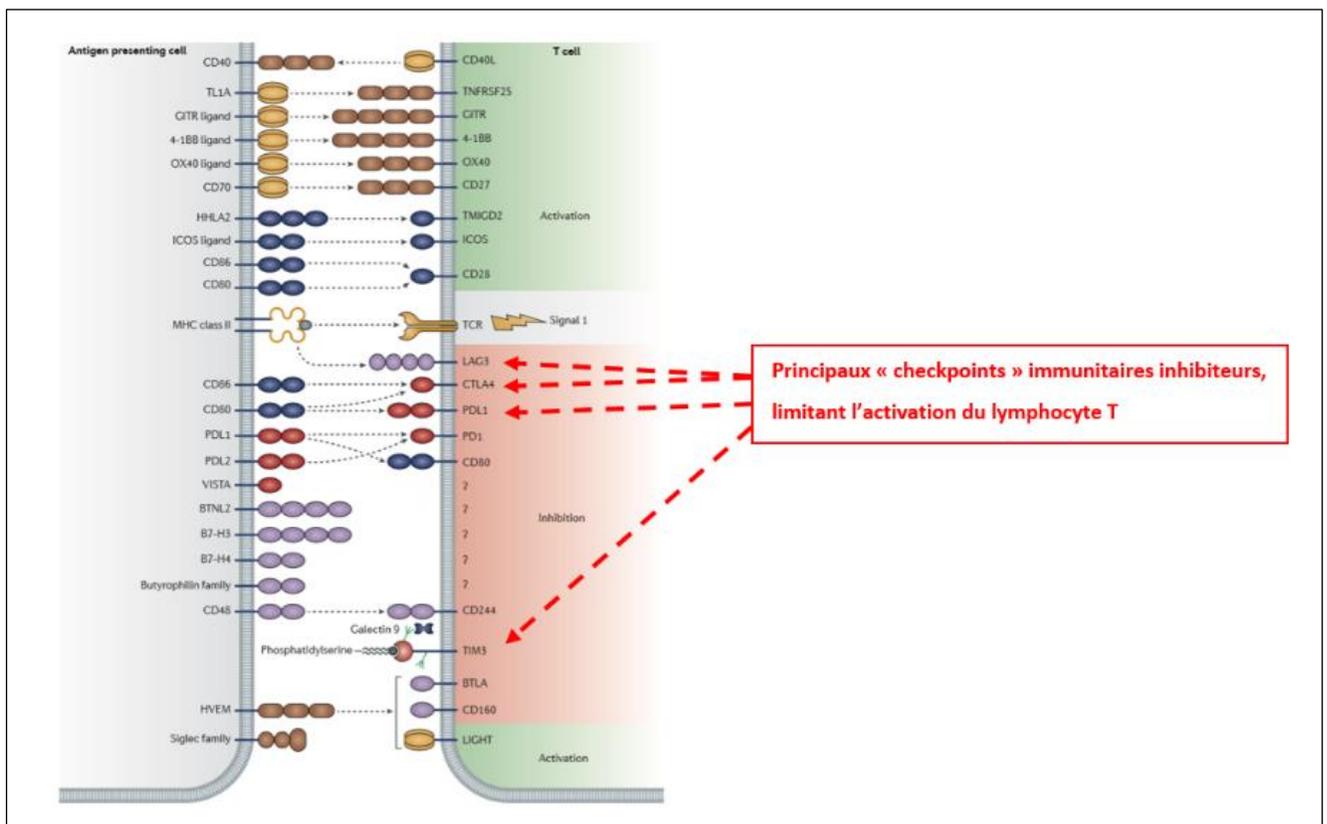


Figure 8 : Les molécules de co-stimulation exprimées par la CPA au cours du processus de maturation et leurs récepteurs respectifs sur le lymphocyte T (Mahoney, 2015, modifié)

II.2. Les mécanismes d'échappement de la tumeur à la réponse immunitaire

Les différentes étapes de ce cycle qui visent à produire un microenvironnement inflammatoire anti-tumoral peuvent être inhibées par la tumeur. L'échappement tumoral à la réponse immunitaire anti-tumorale, induit par le SI lui-même sélectionnant des variants tumoraux résistants à l'attaque immunologique, peut être lié à différents mécanismes dont :

- la perte d'expression de néoantigènes tumoraux immunogènes,
- la perte d'expression de molécules du CMH de type 1 par la cellule tumorale,
- un échappement de la cellule tumorale à l'apoptose par augmentation d'expression de molécules anti-apoptotiques,
- la production par la cellule tumorale de molécules immunosuppressives (IL10, TGF β , IDO-1...),
- le recrutement dans le microenvironnement tumoral de cellules immunitaires suppressives (lymphocytes T régulateurs, cellules myéloïdes suppressives, macrophages de type M2...),
- à l'expression de molécules inhibant et/ou favorisant l'apoptose des lymphocytes T effecteurs comme Fas-L ou PD-L1 (31,29).

Les mécanismes d'échappement mis en place par la cellule tumorale que nous détaillerons sont l'expression de ligands capables d'interagir avec les récepteurs lymphocytaires inhibiteurs comme PD-L1 et la production de molécules immunosuppressives comme IDO-1(46).

II.2.1. Le couple récepteur ligand PD-1/PD-L1

Les interactions entre PD-1 et PD-L1 limitent l'activation lymphocytaire : il s'agit d'un « **checkpoint** » (point de contrôle) immunitaire (CI) inhibiteur (figure 9).

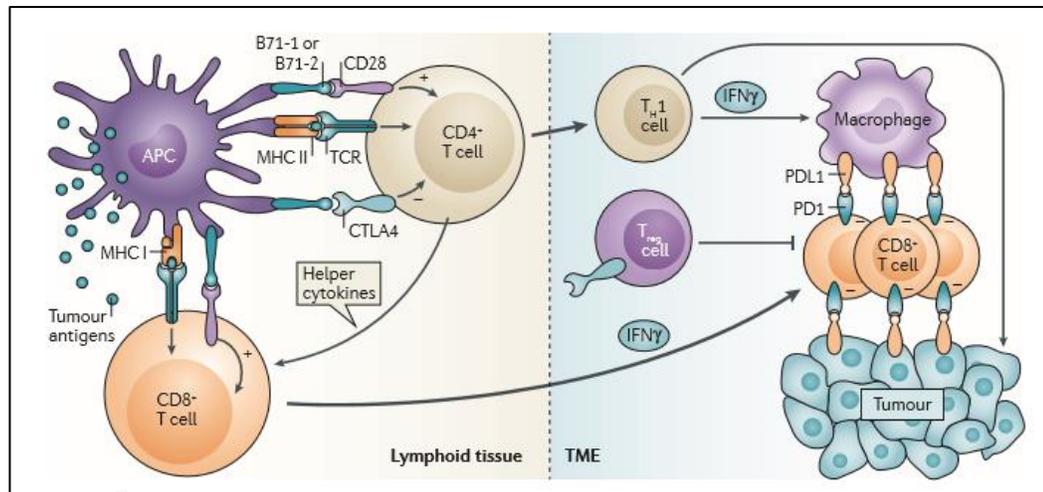


Figure 9 : Place du checkpoint immunitaire PD-L1 PD-1 lors de l'activation du lymphocyte (Topalian et al, 2016)

II.2.1.1. Description et profil d'expression en physiologie et pathologie tumorale

Le récepteur PD-1 et ses ligands sont des protéines transmembranaires, de la famille des B7/CD28, parmi la super-famille des immunoglobulines. La première description du récepteur **PD-1** (CD279) date de 1992 (47). Il s'agit d'un corécepteur inhibiteur, constitué d'un domaine extramembranaire IgV, d'une région transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique comprenant un « immunoreceptor tyrosine inhibitory motif » ITIM, et un « immunoreceptor tyrosine switch motif » ITSM. En conditions physiologiques, PD-1 est exprimé par les thymocytes CD4- CD8- lors de la formation des lymphocytes dans le thymus (48) et par des cellules hématopoïétiques telles que les cellules B naïves, monocytes (49).

En périphérie, après reconnaissance antigénique et stimulation cytokinique, PD-1 est exprimé par les lymphocytes T CD 4 et CD8 activés (50), les cellules B activées (51), les lymphocytes Treg, les cellules NK (52), les cellules dendritiques.

PD-1 interagit avec **deux ligands** : **PD-L1** (B7-H1 ou CD274) et **PD-L2** (B7-DC ou CD273). En conditions physiologiques, PD-L1 est exprimé de façon constitutive par des macrophages (poumon, amygdale, foie) et par des cellules du syncytiotrophoblaste placentaire (49,53,54).

Dans un microenvironnement inflammatoire, l'expression de PD-L1 peut être induite par des cytokines comme les IFN de type 1 et 2, le TNF α sur des cellules hématopoïétiques activées (les cellules dendritiques, les macrophages, les cellules NK, les monocytes, les lymphocytes B et T) et des cellules non hématopoïétiques, cellules endothéliales et épithéliales (46,53,55–57). PD-L1 est biologiquement actif uniquement lorsqu'il est exprimé à la surface des cellules.

Dans le cancer, PD-L1 peut être exprimé par les lymphocytes T, les cellules myéloïdes associés aux tumeurs, les cellules plasmocytoïdes et par les cellules tumorales (49). L'expression « aberrante » de PD-L1 par les cellules tumorales a été décrite dans des cancers dits « immunogènes » tels que les cancers du rein (58), du poumon (59,60) ou les mélanomes (55,61). Dans ces cancers, PD-L1 peut être également exprimé par les cellules immunitaires du stroma. Dans certains cancers comme l'estomac, l'expression de PD-L1 est davantage observée sur les cellules immunitaires du stroma (55,62–64).

L'expression aberrante de PD-L1 par les cellules tumorales et les cellules immunitaires du stroma peut être induite de deux façons selon les concepts de résistance immunitaire inné et adaptative. Dans le cas de la **résistance immunitaire innée**, l'expression peut être induite par des altérations génétiques ou des voies de signalisation oncogénique (65). Le second moyen d'induction d'expression de PD-L1 reflète l'adaptation des tumeurs à la réponse immunitaire : c'est la **résistance immunitaire adaptative** décrite par Taube et al en 2012 dans les mélanomes. Elle est notamment médiée par de nombreuses molécules, telles que des cytokines pro-inflammatoires (IFN de type 1 et 2, IL10, IL4, TNF α), des facteurs de croissance telle que l'IFN γ , restant le principal inducteur d'expression de PD-L1 (66,67). D'une part, les lymphocytes CD4 Th1 et CD8 activés vont produire ces signaux inflammatoires dans le MET, ce qui, d'un côté, va activer la destruction tumorale par les macrophages et les CPA, et d'un autre côté, va induire l'expression de PD-L1 via ces mêmes macrophages et les cellules tumorales (68). D'autre part, quelques heures ou jours après l'activation, les lymphocytes activés vont exprimer le récepteur PD-1.

L'expression physiologique de **PD-L2** est plus limitée, induite par IL-4 et IFN γ de façon moindre (46) et retrouvée principalement sur des cellules hématopoïétiques (macrophages, mastocytes et cellules dendritiques) (49). Dans le cancer, la surexpression de PD-L2 est plus limitée

et a été rapportée notamment dans certains lymphomes (69) et cancers de l'endomètre (70). Son affinité pour le récepteur PD-1 est plus importante que PD-L1.

II.2.1.2. Effets biologiques

D'un point de vue fonctionnel, la liaison de PD-1 avec son ligand PD-L1 entraîne la phosphorylation des domaines ITIM et ITSM et le recrutement de SHP2 (67), qui bloque l'activation de ZAP70, PI3K (et AKT), PKC θ , essentielle à la production d'IL-2, à l'origine d'une diminution de la prolifération cellulaire. La voie de signalisation de PD-1 active Cbl-b et Smad3 qui, respectivement, diminuent l'expression des TCR à la surface et la prolifération cellulaire. La liaison PD-L1/ PD-1 diminue donc le contact entre le TCR et les complexes CMH/ peptides antigéniques présentés par des CPA (46,71,72). Elle inhibe également le gène anti-apoptotique Bcl-xL et active le gène pro-apoptotique Bim (figure 10). Cette voie diminue ainsi la prolifération des lymphocytes T et induit leur apoptose (73).

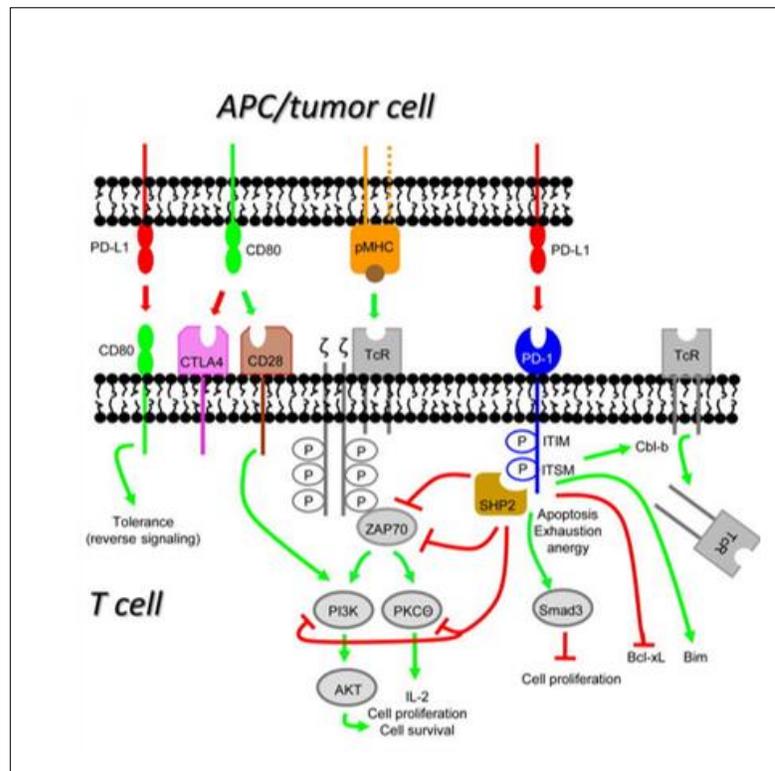


Figure 10 : La voie de signalisation de PD-1 (Ostrand-Rosenberg et al, 2014)

A l'état physiologique, cette interaction PD-1/PD-L1 sert à maintenir l'homéostasie immunitaire, la tolérance du soi, prévient l'auto-immunité et limiter les dommages collatéraux liés à une réponse immunitaire excessive (49). Cet effet est en partie médié par l'expression de PD-1 par les Treg qui contribue à leur prolifération en convertissant les lymphocytes T CD4 naïfs en Treg favorisant la tolérance (74,75).

En situation pathologique, en cas d'infection chronique ou de **cancer**, la stimulation prolongée des antigènes à l'origine de l'activation des lymphocytes va favoriser l'interaction PD-1/PD-L1. Cette interaction va avoir des effets sur le lymphocyte T cytotoxique CD8+ (Tc1) principalement, résumés dans la figure 11. Les principaux effets sont :

- d'induire à un état de non réponse, appelé « **exhaustion** », correspondant à un épuisement, ou à une anergie (76). L'exhaustion est un état réversible correspondant à la perte de la capacité à sécréter les molécules cytolytiques et les cytokines pro-inflammatoires telles que IL-2, IFN γ et TNF α (77,78), après une stimulation prolongée ou répétée avec un antigène,
- d'entraîner la libération d'IL-10, enzyme immunosuppressive (56,79),
- d'induire l'apoptose des lymphocytes T.

L'interaction PD-1/PD-L1 va en parallèle protéger la cellule tumorale exprimant PD-L1 de manière aberrante, des effets cytotoxiques des lymphocytes T CD8+ et de l'apoptose induite par Fas par les lymphocytes T CD8+ (« molecular shield ») (80).

L'interaction PD-1/PD-L1 peut aussi limiter l'activité lytique des cellules NK (52) et inhiber la réponse clonale B (51).

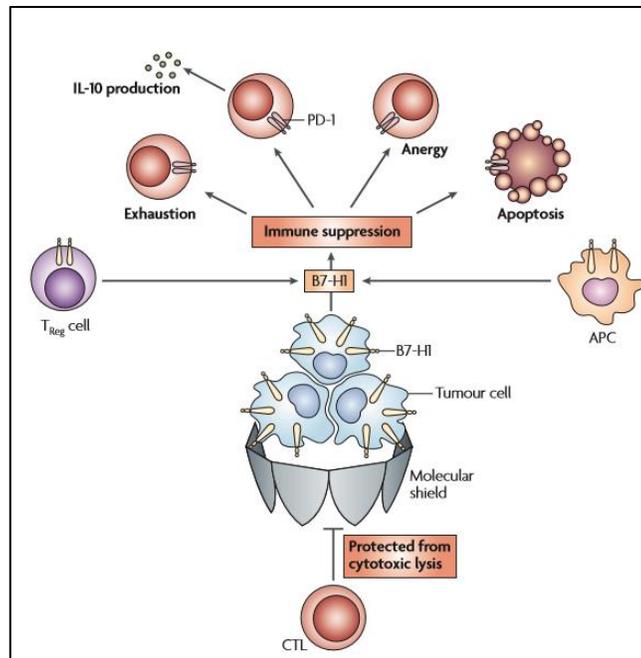


Figure 11 : L'immunosuppression induite par PD-L1 lors de l'échappement tumoral (Zou et al, 2008)

L'interaction PD-1/PD-L1 réprime ainsi la réponse immunitaire anti-tumorale cytotoxique et favorise l'échappement de la tumeur à cette réponse anti-tumorale (81). La surexpression de PD-1 et PD-L1 rompt le cycle de l'immunité anti-tumorale de deux façons. La surexpression de PD-L1 et PD-1 dans le ganglion va limiter l'activation de nouveaux lymphocytes T dans les ganglions. Secondairement, cette surexpression va limiter l'action des lymphocytes T CD8+ sur les cellules tumorales.

II.2.1.3. Applications en cancérologie générale

C'est le concept d'immunosurveillance et notamment la mise en évidence de la surexpression de PD-L1 dans de nombreux cancers qui a participé et accéléré le développement des immunothérapies anticancéreuses pour inhiber ces mécanismes d'immunosuppression mis en place dans le micro-environnement tumoral (53).

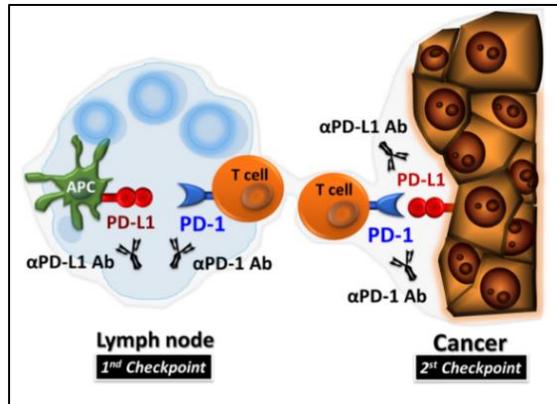


Figure 12 : Place des inhibiteurs de la voie PD-1/PD-L1 dans le ganglion et la tumeur (Hamanishi et al, 2016)

Les anti-PD-1 empêchent la liaison de PD-1 avec ses ligands PD-L1 et PD-L2 (figure 12). Les anticorps anti PD-L1 bloquent eux spécifiquement l'interaction spécifique PD-L1/PD-1 mais aussi PD-L1/CD80, mais ils n'empêchent pas l'interaction PD-1/PD-L2.

La conséquence principale de ces inhibiteurs est de réactiver les lymphocytes T « exhausted », d'augmenter leur prolifération, leur cytotoxicité et leur capacité à produire des cytokines inflammatoires (figure 13)(82).

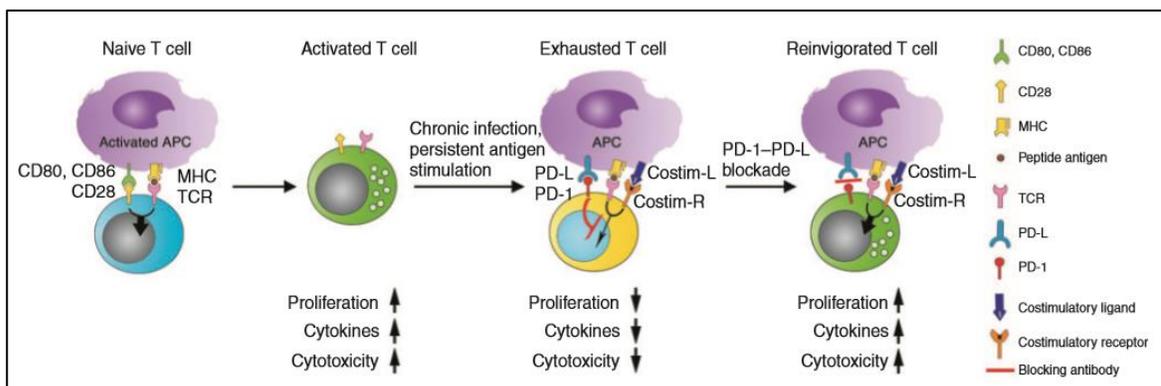


Figure 13 : Effets des anti PD-1/PD-L1 sur les lymphocytes « exhausted », dans le cadre d'une pathologie virale chronique (Sharpe et al, 2007)

En France, les anti PD-1, le nivolumab et le pembrolizumab, ont obtenu l'AMM en 2015, dans plusieurs indications en situation métastatique : le mélanome, le cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC) et le carcinome à cellules rénales (tableau 1 et en annexes, tableau 3).

Cible	Nom	Source	Classe Ig	Phase
PD-1	Nivolumab (Optivo®, BMS-936558, MDX 1106)	BMS	IgG4	Approuvé
	Pembrolizumab (Keytruda®, MK3475, lambrolizumab)	Merck	IgG4	Approuvé
	Pidilizumab (CT-011)	Curetech	IgG1k	II
	AMP-224	Amplimmune	Protéine de fusion, PD-L2, IgG2a	I
	AMP-514 (MEDI0680)	Amplimmune	Protéine de fusion PD-L2	I
PD-L1	BMS-936559 (MDX1105),	BMS	IgG4	I
	Azetolizumab (Tecentriq®, MPDL3280A)	Genentech/Roche	IgG1k	Approuvé
	Durvalumab (MED4736)	MedImmune/Astrazeneca	IgG1k	III
	Avelumab (MSB0010718C)	EMD Serono (Merck)	IgG1	I

Tableau 1 : Caractéristiques des principaux anti-PD1 et anti PD-L1.

L'efficacité des anti PD-1 ou PD-L1 a ainsi été démontrée dans plusieurs essais cliniques avec des réponses objectives significatives et durables dans des cancers solides au stade métastatique (55,83–85) tels que le cancer du poumon NSCLC (86), le mélanome (85,87–89), le cancer de vessie (90), de l'estomac (91) ou hématologiques dans le lymphome de Hodgkin (92).

Il existe toutefois une variabilité de réponse aux anti-PD1 ou PD-L1 rendant nécessaire la recherche de biomarqueurs pour identifier les patients susceptibles de répondre à ces thérapies. L'expression de PD-L1 comme biomarqueur prédictif de réponse a été suggérée par Topalian et al en 2012, dans différentes tumeurs solides (mélanome, rein, poumon) avec 36 % de réponse objective au nivolumab pour des patients avec expression de PD-L1 par la tumeur, contre 0 % pour des patients sans expression de PD-L1 (83).

Les premières études ont montré le plus souvent une corrélation entre l'expression de PD-L1 en IHC avec la probabilité de réponse au traitement (55,62,83,88,90,93,94). D'après Sunshine et al, 1400 patients, dans un ensemble d'études, ont été traités avec, en moyenne, 45% de réponse objective pour les patients aux tumeurs PD-L1+ (95).

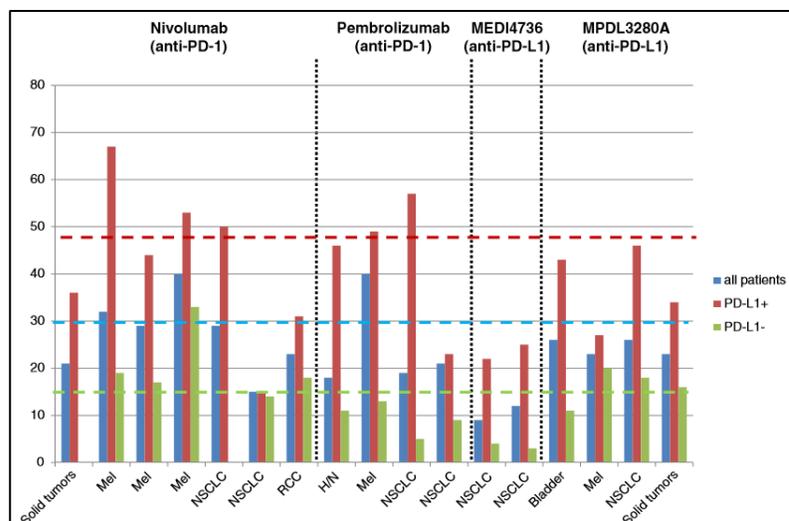


Figure 14 : Association de l'expression de PD-L1 des prélèvements, avant traitement, et de la réponse objective aux immunothérapies anti-PD-1 et anti PD-L1 (Sunshine et al, 2015)

Cependant, aucun seuil de positivité n'a encore été fixé à ce jour, ni de précision sur le type de cellules devant exprimer PD-L1. De plus, 5 à 20% des patients ayant une tumeur PD-L1 - présentent une réponse objective en fonction des essais cliniques (96), laissant penser que PD-L1 n'est peut-être pas le meilleur facteur prédictif dans ce contexte.

Enfin, la valeur pronostique de l'expression de PD-L1 est variable selon le type de cancer et selon les études. L'expression de PD-L1 a été associée à un mauvais pronostic dans le cancer du rein (97), de vessie (90,98), de l'œsophage (99) ou du col utérin (100), tandis qu'elle a été associée à un meilleur pronostic dans les mélanomes (61). D'autres études dans le cancer du rein (101), du pancréas (76), du poumon (60,63), ne rapportaient pas d'association.

II.2.1.4. Application au cancer colorectal

L'efficacité parfois spectaculaire des anti-PD-1/PD-L1, dans le mélanome notamment, a motivé leur utilisation dans le cadre d'essais cliniques de phase I ou II chez des patients atteints de CCR (tableau 2) avec des résultats initialement peu probants. Seuls quelques essais montraient des réponses anecdotiques.

Auteurs (ref.)	Essais	Nombre de CCR	Nombre de CCR avec IHC	Résultat clinique	Relation expression en IHC et réponse
Brahmer 2010 (102)	Essai anti PD-1	14	0	Une réponse complète	Parmi tous les cancers : association réponse et PD-L1 significative
Topalian 2012 (83)	Essai anti PD-1	19	7	Pas de réponse, un décès	Parmi tous les cancers : association réponse et PD-L1 significative
Brahmer 2012 (85)	Essai anti PD-L1	18	0	Pas de réponse	
Lipson 2013 (103)	Essai anti PD-1	1	1	Une réponse complète, durable à trois ans	CCR MSI PD-L1+, surtout le stroma, avec TIL PD-1+ 3 cas de réponse (rein et mélanome)
Taberero 2013 (104)	Essai anti PD-L1	4		Une réponse partielle, une maladie stable	
Herbst 2014 (88)	Essai anti PD-L1	14 inclus (6 pour la survie)	1	1 ^{ère} réponse à 18 semaines, arrêt de traitement à 48 semaines	Cas CCR : PD-L1+ stroma Parmi tous les cancers : association réponse et PD-L1 significative si par le stroma
Taube 2014 (55)	Essai anti PD-1	8	8	Pas de détail pour CCR Parmi tous les cancers : 10 réponses objectives, 12 avec bénéfices cliniques	Parmi tous les cancers : Association réponse et PD-L1 significative si par les cellules tumorales , supérieure à la présence de TIL-PD-1+ ou de TIL seul (9 PD-L1+ par les cellules tumorales, 8 par le stroma dans les réponses objectives)
Le 2015 (105)	Essai anti PD-1	11 MSI 21 MSS (+9 MSI non CCR)	10 MSI, 17 MSS, (+ 7 MSI non CCR)	4 /10 CCR MSI : 4 réponses partielles (5 stables, 1 progression) 0 /18 CCR MSS	D'après annexe, 2 CCR avec cellules tumorales et stroma PD-L1+ avec réponse partielle 2 réponses partielles PD-L1-
Bendell 2016 (106)	Essai anti PD-1 + inhibiteur MEK	23 CCR		4 réponses partielles, 5 malades stables	

Tableau 2 : Les essais cliniques d'anti PD-1 et PD-L1 dans les CCR.

Lipson et al ont rapporté une réponse durable à un anti PD-1 chez un patient atteint de CCR de phénotype MSI suggérant le **rôle de l'instabilité microsatellitaire** dans la réponse aux immunothérapies (103).

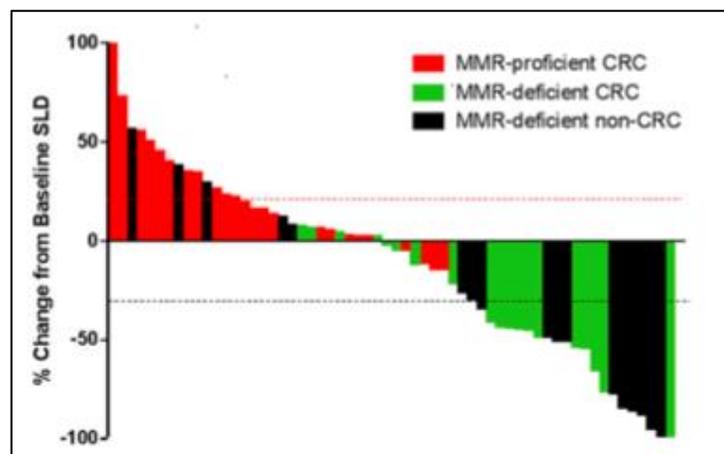


Figure 15 : Réponse aux anti-PD-1 dans des CCR MSI, des CCR MSS et des tumeurs MSI non CCR dans un essai de Le et al en 2015 (Lee et al, 2016)

Ce sont les résultats de l'essai de phase 2 de Le DT en 2015 testant l'efficacité d'un anti-PD-1, le pembrolizumab, dans des tumeurs MSI dont des CCR qui ont montré l'influence majeure de l'instabilité microsatellitaire dans la réponse objective à cette molécule (105). En effet, dans cette étude, une réponse objective était observée dans 40% des CCR MSI, tandis qu'aucune réponse n'était rapportée dans les CCR MSS (figure 15).

De manière intéressante, cette étude montrait une corrélation entre l'expression membranaire de PD-L1 par des cellules myéloïdes et lymphocytaires avec la réponse objective. En revanche, deux patients sans expression de PD-L1 présentaient une réponse objective, posant le problème de la robustesse de ce marqueur potentiel, qui reste à préciser dans les essais cliniques en cours.

Suite aux résultats de cette étude, le pembrolizumab a été autorisé pour les CCR avancés MSI par la FDA aux USA en novembre 2015.

De nombreux essais cliniques sont en cours dans les CCR, notamment en France : parmi eux, un essai de phase II comparant l'efficacité de nivolumab (anti-PD-1) en monothérapie versus l'association nivolumab/ipilimumab (anti CTLA-4) dans des CCR MSI métastatiques et récidivants (107), un essai de phase II étudiant le pembrolizumab en monothérapie dans des CCR métastatiques ou localement avancés, préalablement traités, de statut MSI (108), un essai de phase II étudiant le durvalumab (MEDI4736), un anti-PD-L1, dans des CCR avancés, MSI ou riche en TIL (109), un essai de phase III étudiant le pembrolizumab versus chimiothérapie dans des CCR de stade IV, MSI et MSS (110).

L'expression rapportée de PD-L1 et PD-1 dans les CCR est variable selon les études en raison de la méthodologie très variable en fonction des études (anticorps différents, sur TMA (Tissue MicroArray), le plus souvent, seuil de positivité variable, analyse des cellules tumorales et/ou des cellules du stroma) (figure 1 et tableau 4 en annexes). La fréquence d'expression varie ainsi entre 0 et 89% selon les études. Les études les plus récentes retrouvent une expression préférentielle dans les CCR MSI par rapport aux MSS (54,105,111,112).

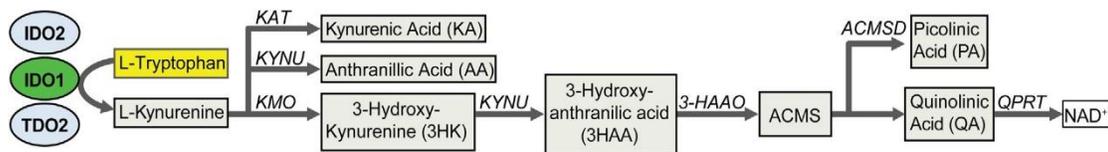
L'expression de PD-1 par les lymphocytes a surtout été étudiée dans les CCR MSI (tableau 5 en annexes). Llosa et al rapportaient une expression de PD-1 dans ces CCR par les TIL CD4 et CD8, intraépithéliaux, du stroma et du front d'invasion (FI). Gatalica et al ont rapporté une densité en TIL PD-1 plus importante dans les CCR MSI (77% contre 39% de CCR MSS)(111).

II.2.2. IDO-1, enzyme immunosuppressive du microenvironnement tumoral

II.2.2.1. Description et profil d'expression en physiologie et pathologie tumorale

L'indoléamine 2,3-dioxygénase existe sous la forme de deux isoformes, IDO-1 et 2 avec un rôle prépondérant d'IDO-1 (113).

IDO-1 est une enzyme cytosolique, qui participe au catabolisme du tryptophane en le convertissant en kynurénine. Le catabolisme du tryptophane est initié soit par l'IDO-1 ou 2 ou par le tryptophane 2,3- dioxygénase 2 (TDO-2), de structure différente d'IDO-1 et 2 (figure 16).



ACMS, 2-amino-3-carboxymuconate semialdehyde; ACMSD, aminocarboxymuconate-semialdehyde decarboxylase; 3-HAAO, 3-hydroxyanthranilic acid oxygenase; IDO1, indoleamine 2,3-dioxygenase 1; IDO, indoleamine 2,3-dioxygenase 2; KAT, kynurenine aminotransferase; KMO, kynurenine 3-monoxygenase; KYNU, kynureninase; NAD⁺, nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized form); QPRT, quinolinic acid phosphoribosyltransferase; TDO, tryptophan dioxygenase

Figure 16 : Place de l'IDO-1 dans le catabolisme du tryptophane (Santhanam et al, 2015)

En conditions physiologiques, elle est exprimée dans la plupart des tissus, principalement par les CPA (macrophages, cellules dendritiques, monocytes). IDO-1 est exprimée de façon constitutionnelle par les cellules endothéliales du placenta, des poumons, et des cellules épithéliales du tractus génital féminin et dans les tissus lymphoïdes par les cellules dendritiques matures. Dans la muqueuse colique normale, IDO-1 est exprimé par des cellules de la lamina propria (114).

En conditions pathologiques, après une infection bactérienne ou virale, IDO-1 peut être induite sur le site de l'**inflammation** et retrouvée sur les cellules épithéliales, les éosinophiles, les cellules endothéliales. Dans les colites, IDO-1 peut être exprimée par les cellules épithéliales de la muqueuse colique, induite par des cytokines inflammatoires telles que IFN γ , TNF α , IL-1 β (113)..

En pathologie tumorale, IDO-1 peut être exprimé dans certaines tumeurs (115,116), par les cellules dendritiques, les cellules myéloïdes associées aux tumeurs, les cellules endothéliales et les cellules tumorales (114).

L'expression d'IDO-1 semble être régulée de deux façons. L'expression d'IDO-1 pourrait être régulée par le gène suppresseur de tumeur BIN1, d'après de modèles murins. La perte de BIN1, altéré dans différents cancers, semble *in vivo* augmenter l'expression de IDO-1, à l'origine d'une diminution de l'activité des cellules T (115) (via une voie impliquant STAT1 et NFκB). Une étude a tenté en IHC de montrer une relation entre le taux d'IDO-1 et BIN1 dans des CCR sans y parvenir (117). Elle est principalement induite dans la tumeur en réponse à des signaux inflammatoires produits par des lymphocytes T activés, tels que l'IFNγ (66,118). Ce mécanisme semble prédominer dans certains cancers du sein de type « basal like », avec un abondant infiltrat inflammatoire T (119).

II.2.2.2. Effets biologiques

En conditions physiologiques, IDO-1 a un rôle tolérogène. Il empêche une réaction inflammatoire excessive et prévient l'auto-immunité (113,120–122).

Le rôle de la surexpression d'IDO-1 dans l'échappement tumoral a été décrit par la première fois par Uyttenhove en 2003 dans un modèle animal (115). **En pathologie tumorale, IDO-1** participe à cet échappement par différents mécanismes (figure 17) :

- dès le priming des lymphocytes T en inhibant la maturation des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes (41,96),
- en activant la voie GCN2 et en inhibant la voie mTOR, secondairement à la déplétion en tryptophane, essentiel aux fonctions anaboliques des lymphocytes (121), ce qui aboutit à une diminution de la prolifération des lymphocytes T, une augmentation de l'apoptose (123) et est à l'origine d'une **anergie** des cellules T activées (124),
- en activant le récepteur AhR, secondairement à l'action directe des métabolites du tryptophane (116), ce qui aboutit à la **différenciation des T naïfs en Treg** favorisant leur prolifération et diminue l'expression du TCR,
- en inhibant l'activation de lymphocytes T par des CPA voisines n'exprimant pas IDO-1,

- en inhibant directement l'activation de cellules NK et les cellules B, contribuant ainsi davantage à l'immunosuppression (115,125).

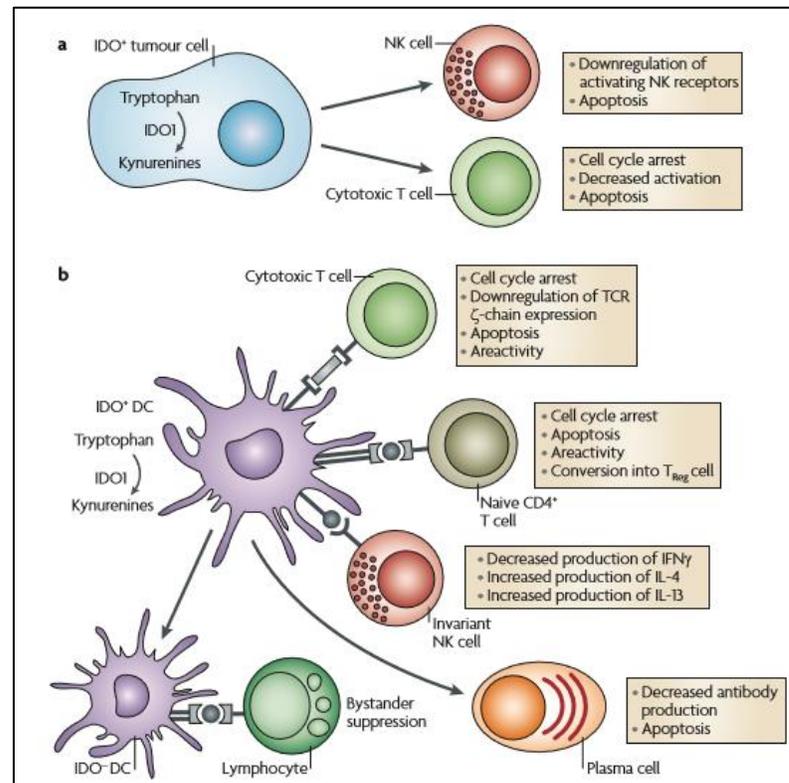


Figure 17 : L'immunosuppression induite par l'IDO-1 (Löb et al, 2009)

Dans la tumeur, les cellules tumorales IDO-1+ inhibent les cellules T cytotoxiques et les cellules NK (120,125). IDO-1 augmenterait également l'activité des cellules myéloïdes associées aux tumeurs et favoriserait l'angiogénèse (115).

II.2.2.3. Application en cancérologie générale

Actuellement, quatre inhibiteurs sont testés dans des essais cliniques dans des cancers métastatiques (124) :

- Indoximod, aussi appelé D-1MT (1-methyl-D-tryptophan) ou NLG8189, (NewLink Genetics) (68),
- INCB024360 ou Epacadostat (Incyte),
- NLG919 (Genentech),
- vaccin ciblant IDO, en phase 1 dans des cancers du poumon non à petites cellules (126).

Deux études récentes (ASCO 2016) rapportaient des résultats préliminaires majeurs : un essai de phase 2 dans des cancers du pancréas métastatiques rapportait 45% de réponse objective (2 réponses complètes) et des réponses durables à plus de 6 mois à la combinaison indoximod et gemcitabine/nab-paclitaxel ; un essai de phase 1b/2 dans des mélanomes avancés rapportait 53% de réponse objective (8/15) et deux réponses complètes à la combinaison indoximod et pembrolizumab (anti PD-1). Des essais de phase 2 sont en cours avec l'indoximod dans le cancer du sein, de la prostate, du cerveau et en phase 1 dans des tumeurs primitives cérébrales pédiatriques (127).

L'epacadostat, inhibant les fonctions d'IDO-1 médiées par les cellules dendritiques (128), a également été testé en monothérapie et en association avec d'autres traitements, avec récemment un essai de phase 3 aux USA dans le mélanome en combinaison avec le pembrolizumab (NCT02752074).

Aucune donnée dans la littérature ne rapporte à ce jour de marqueur prédictif de réponse aux inhibiteurs d'IDO-1.

II.2.2.4. Application au cancer colorectal

L'expression d'IDO-1, dans les tumeurs, est variable selon les études. IDO-1 est exprimé par les cellules du stroma et les cellules tumorales, dans 12 à 78% des CCR (114,117,129,130). Une étude récente a rapporté une augmentation de l'expression du gène codant pour IDO-1 par les TIL des CCR MSI (131) et plus particulièrement dans les adénocarcinomes médullaires (132).

Des études dans les CCR tendent à montrer un intérêt de l'inhibition de la voie d'IDO-1 en combinaison avec d'autres traitements (133,134). D'après Pucceti et al, sur 69 CCR, 42% exprimait en IHC à la fois IDO-1 et la kynurénine, suggérant qu'IDO-1 ne semble pas être la seule molécule à induire la kynurénine et l'intérêt des combinaisons afin de cibler la voie du tryptophane.

Un essai clinique de phase I en 2014 dans des tumeurs solides avancées dont 29 CCR n'a pas mis en évidence de réponse complète ou partielle à l'épacadostat en monothérapie, 30% des patients inclus dans cette étude avait toutefois une maladie stable à 8 semaines (113,135).

Un essai de phase 1-2 testant l'épacadostat en combinaison avec le nivolumab (anti PD-1) dans des cancers avancés dont des CCR est en cours (NCT02327078).

OBJECTIFS DE L'ETUDE

Afin de mieux identifier les patients susceptibles d'être éligible aux immunothérapies anti PD-1/PD-L1 et anti IDO-1, nous avons étudié, dans une série rétrospective de CCR, de type MSI en se focalisant notamment sur les CCR de type médullaire connus pour être associés à un riche microenvironnement immunitaire, et de type MSS, la fréquence et le profil d'expression des deux molécules immunorégulatrices que sont le ligand PD-L1 et l'enzyme IDO-1, ainsi que le type et la densité de l'infiltrat lymphocytaire associé.

Précisément, nous avons :

- comparé le profil d'expression immunohistochimique de PD-L1 et d'IDO-1 par les cellules tumorales et/ou les cellules du stroma, sur coupes entières, dans 3 sous-groupes de CCR : les CCR MSI médullaires, les CCR MSI non médullaires et les CCR MSS,
- corrélié cette expression avec la densité en TIL PD-1+ et T-bet+, ces TIL T-bet+ étant susceptibles de produire de l'IFN γ , cytokine de type Th1 connue pour induire l'expression de PD-L1 et IDO-1 ^(118,136).

PATIENTS ET METHODES

I- Patients

Nous avons inclus dans cette étude **21 adénocarcinomes MSI de type médullaire** opérés ente 2002 et 2015 au CHU de Nantes (service de chirurgie digestive et endocrinienne), et déjà identifiés pour une étude anatomo-clinique antérieure. Nous avons défini ce sous-groupe selon les critères morphologiques et moléculaires suivants :

- les caractéristiques morphologiques des adénocarcinomes médullaires définies par la classification des tumeurs du système digestif de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS 2010 ; 7^{ème} version): « placards de cellules tumorales (pas ou rares formations glandulaires) au noyau à chromatine vésiculeuse avec un nucléole proéminent au sein d'un cytoplasme éosinophile, associée à de très nombreux lymphocytes intra-épithéliaux. La classification OMS ne précise pas quel pourcentage du volume tumoral doit présenter ces aspects morphologiques. Nous avons considéré qu'ils devaient être prépondérants et représenter au moins 70% du volume tumoral.
- la présence d'une instabilité microsatellitaire

Nous avons comparé cette cohorte à **20 adénocarcinomes MSI non médullaires** opérés ente 2007 et 2012, en identifiant les différents sous-types histologiques autres que médullaire, et à **39 adénocarcinomes NOS MSS** de grade variable, opérés ente 2007 et 2014. Ces cas ont été identifiés après interrogation du logiciel DIAMIC, et relus (EO et CB) afin de confirmer le sous-type histologique et le grade de différenciation.

Nous avons tenté d'apparier les patients des 3 groupes en fonction du stade pTNM.

Nous avons exclu de l'étude les patients ayant eu un traitement néo-adjuvant (chimiothérapie et/ou radiothérapie), les patients sous traitement immunosuppresseur et les patients pour lesquels nous ne disposions pas de matériel tissulaire suffisant.

Cette étude a été réalisée en accord avec les règles d'éthique émises par notre institution.

II - Recueil des données anatomopathologiques et cliniques

Pour chaque patient, les comptes rendus anatomopathologiques et les dossiers cliniques ont été consultés. Les informations suivantes ont été colligées : sexe, âge au diagnostic, date de l'intervention, localisation tumorale, taille tumorale, type histologique défini selon la classification OMS, stade pTNM selon l'UICC, statut MSI ou MSS déterminé dans le cadre de la prise en charge diagnostique ou dans le cadre d'une étude antérieure.

III – Immunohistochimie

III.1. Anticorps utilisés

L'étude immunohistochimique a été réalisée sur un automate Dako (Autostainer Link) à partir de coupes entières du bloc le plus représentatif de la tumeur afin d'étudier le caractère hétérogène ou non de l'expression de PD-L1 et d'IDO-1 notamment.

Les anticorps primaires utilisés et leur protocole sont résumés dans le tableau suivant :

	Fournisseur	Type	Clone	pH	Dilution
PD-L1	Ozyme	Monoclonal, lapin	E1L3N	9	1/100
PD-1	Abcam	Monoclonal, souris	NAT 105	6	1/400
IDO-1	Millipore	Monoclonal, souris	10.1	9	1/100
T-bet	Santa Cruz	Monoclonal, souris	4B10	6	1/100
CD163	Novocastra	Monoclonal, souris	10D6	6	1/100

III.2. Evaluation des différents immunomarquages

PD-L1

L'expression de PD-L1 par les filets nerveux a servi de témoin intrinsèque pour l'interprétation de l'immunomarquage (figure 18).

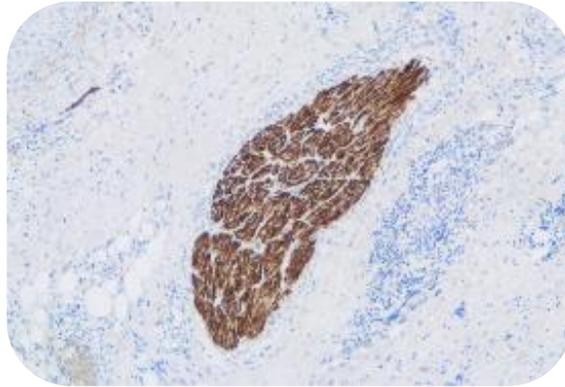


Figure 18 : Expression de PD-L1 par les filets nerveux de la paroi colique (x10)

Nous avons pris en compte **l'expression membranaire (+/- cytoplasmique) de PD-L1** par **les cellules tumorales** et par **les cellules du stroma**. L'intensité du marquage a également été prise en compte (1 = faible, 2 = modérée, 3 = forte).

Nous avons évalué le pourcentage de cellules PD-L1+ avec une intensité modérée à forte de manière semi-quantitative en 5 scores pour les cellules tumorales et en 4 scores pour les cellules du stroma (résumés dans le tableau 3).

Seuls les cas présentant plus de 5% de cellules tumorales PD-L1+ avec une intensité modérée à forte ont été considérés comme PD-L1+ sur les cellules tumorales (scores 1 à 4), et seuls les cas renfermant plus de 5 amas d'au moins 50 cellules marquées/cm², avec une intensité modérée à forte ont été considérés comme PD-L1+ sur les cellules du stroma (score 2 à 3).

Expression de PD-L1 en immunohistochimie		
Score	Par les cellules tumorales	Par les cellules du stroma
0	<5%	< 4 amas de cellules marquées/cm ² , ou de façon isolée
1	6%-25%	4 – 5 amas (au moins 50 cellules) de cellules marquées/cm ²
2	26%-50%	> 5 amas de cellules marquées/cm ² , répartition hétérogène
3	51%-70%	Marquage diffus
4	>70%	

Tableau 3 : Quantification semi-quantitative en immunohistochimie de l'expression membranaire de PD-L1 avec intensité modérée à forte

IDO-1

L'expression d'IDO-1 par les cellules endothéliales nous a servi de témoin intrinsèque (figure 19).

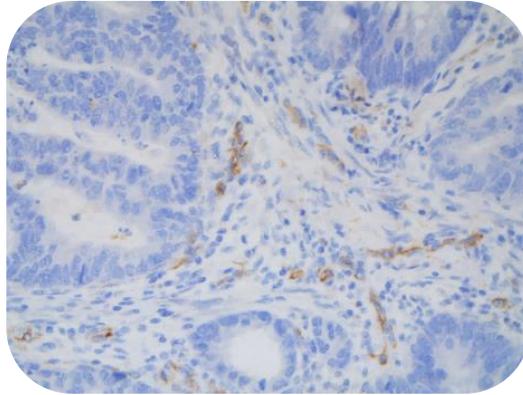


Figure 19 : Expression d'IDO-1 par les cellules endothéliales du stroma (x20)

Nous avons pris en compte l'expression de IDO-1 par les cellules tumorales et par les cellules du stroma. Le marquage était cytoplasmique, homogène ou granuleux. L'intensité du marquage a été prise en compte (1 = faible, 2 = modérée ou 3 = forte) et le pourcentage de cellules IDO-1+ a été évaluée de manière semi-quantitative en 5 scores pour les cellules tumorales et en 4 scores pour les cellules du stroma (résumés dans le tableau 4).

Seuls les cas avec plus de 5 % des cellules tumorales IDO-1+ avec une intensité modérée à forte ont été considérés IDO-1+ (scores 1 à 4), et seuls les cas avec plus de 5 % des cellules du stroma IDO-1+ avec une intensité modérée à forte ont été considérés IDO-1+ pour les cellules du stroma (score 1 à 3).

Expression d'IDO-1 en immunohistochimie		
Score	Par les cellules tumorales	Par les cellules du stroma
0	<5%	<5%
1	6%-25%	6%-25%
2	26%-50%	26%-50%
3	51%-70%	>50%
4	>70%	

Tableau 4 : Quantification semi-quantitative en immunohistochimie de l'expression d'IDO-1 avec intensité modérée à forte

PD-1

Les lymphocytes T folliculaires helper (TFH) PD-1+ dans les follicules lymphoïdes nous ont servis de témoin interne (figure 20). L'expression membranaire de PD-1 a été évaluée manuellement de manière semi-quantitative. Les lymphocytes intra-tumoraux (TIL, intra-épithéliaux et du stroma) ont été pris en compte. Le nombre de TIL PD-1 + a été évalué dans les 5 champs les plus riches au grossissement 200. Le résultat a ensuite été rapporté en nombre de TIL PD1+ par champ.

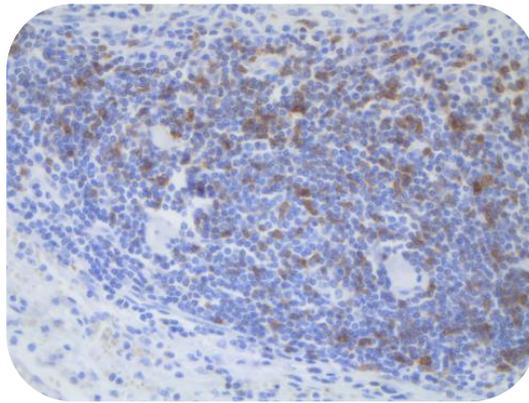


Figure 20 : Lymphocytes TFH PD-1+ intra-folliculaires (x20)

T-BET

L'expression nucléaire de T-bet a été évaluée manuellement de manière semi-quantitative de la même façon que pour PD-1. Le nombre de TIL T-bet + a été évalué dans les 5 champs les plus riches au grossissement 200. Le résultat a ensuite été rapporté en nombre de TIL T-bet + par champ.

IV - Analyses statistiques

L'ensemble des données anatomo-cliniques, immunohistochimiques et moléculaires a été inclus dans une base de données. Les données épidémiologiques ont été présentées en nombres et pourcentages et les données quantitatives en médiane, minimum et maximum. Le test du Chi-2 bilatéral ou le test exact de Fisher ont été utilisés pour déterminer les associations entre les variables qualitatives (selon les effectifs). Le test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour étudier les variables quantitatives et graduelles, notamment pour évaluer la relation entre la densité en TIL-PD-1+ ou en TIL T-bet+ et les caractéristiques morphologiques et moléculaires des CCR. Un coefficient de Spearman a été calculé pour étudier la corrélation entre la densité en TIL PD-1+ ou T-bet+ et l'expression de PD-L1. Les mêmes analyses ont été effectuées pour l'expression d'IDO-1. Les données manquantes ont été exclues de l'analyse statistique. Une valeur de p inférieure à 0,05 a été retenue pour déterminer la significativité statistique. Ces analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 7.

RESULTATS

I - Caractéristiques anatomo-cliniques des patients

Les caractéristiques anatomo-cliniques des patients sont résumées dans le tableau 5. Nous avons inclus 35 hommes et 45 femmes. Parmi les 41 CCR MSI, 39 étaient des cas sporadiques, 2 patients avaient un syndrome de Lynch. Parmi les 20 CCR MSI non médullaires, la majorité correspondait à des ADK mucineux (n=10, 50%) ou des ADK NOS bien à moyennement différenciés (n=7, 35%). Parmi les 39 CCR MSS, la majorité correspondait à des ADK NOS bien à moyennement différenciés (n=31, 79.5%) ou à des ADK mucineux (n=4, 10.2%). Nous avons également un CCR de type morphologique médullaire parmi les CCR MSS.

Les CCR de phénotype MSI, quelle que soit la variante histologique, présentaient les caractéristiques anatomo-cliniques habituelles des CCR MSI : la majorité des tumeurs était localisée au colon droit (83% versus 30% des CCR MSS) ($p < 0,0001$), de plus grande taille (moyenne 6,84 cm versus 5 cm dans les MSS) ($p = 0,0004$), en particulier dans les CCR MSI médullaires, et touchait préférentiellement des femmes (62,3% vs 43,6% dans les MSS) ($p = 0,04$), âgées ($p < 0,0001$).

	CCR MSI médullaires (n = 21)	CCR MSI non médullaires (n =20)	p	CCR MSS (n = 39)	p (MSI vs MSS)
Age: moyenne (extrêmes)	76,2 (35 – 95)	77,2 (61 – 89)	0,68	66,4(44 – 87)	p<0,0001
Sexe Homme Femme	8 (38,1%) 13 (61,9%)	5 (25%) 15 (75%)	0,5	22 (56,4%) 17 (43,6%)	0,04
Site tumoral Colon droit Colon transverse Colon gauche Rectum Grêle	18 (85,75%) 2 (9,5%) 0 (0%) 0 (0%) 1 (4,75%)	16 (80%) 2 (10%) 2 (10%) 0 (0%) 0 (0%)	0,69 1	12 (30,8%) 5 (12,8%) 19 (48,7%) 3 (7,7%) 0 (0%)	<0,0001 0,72 0,0038
Taille tumorale (cm) : moyenne (extrêmes)	7,52 (4-11)	6,1 (3-10)	0,03	5,03 (1,5-10)	0,0004
Sous type histologique Adénocarcinome NOS : - Bien /moyennement différencié - Peu différencié Adénocarcinome mucineux Adénocarcinome médullaire Adénocarcinome polymorphe Adénocarcinome festonné	0 (0%) 0 (0%) 0 (0%) 21(100%) 0 (0%) 0 (0%)	7 (35%) 1 (5%) 10 (50%) 0 (0%) 2 (10%) 0 (0%)		31 (79,5%) 1 (2,56%) 4 (10,26%) 1 (2,56%) 1 (2,56%) 1 (2,56%)	<0,0001 0,14 <0,0001
pT pT1 pT2 pT3 pT4	0 (0%) 2 (9,5%) 13 (62%) 6 (28,5%)	0 (0%) 0 (0%) 12 (60%) 8 (40%)	0,52	5 (12,8%) 2 (5,2%) 27 (69,2%) 5 (12,8%)	0,03
pN pN0 pN1 pN2	14 (66,6%) 4 (19,1%) 3 (14,3%)	8 (40%) 9 (45%) 3 (15%)	0,12	23 (59%) 12 (30,8%) 4 (10,2%)	0,65
pM M0 M1	19 (90,5%) 2 (9,5%)	16 (80%) 4 (20%)	0,40	31 (79,5%) 8 (20,5%)	0,56
Stade I II III IV	2 (9,5%) 11 (52,5%) 6 (28,5%) 2 (9,5%)	0 (0%) 7 (35%) 9 (45%) 4 (20%)	0,41	6 (15,4%) 15 (38,6%) 10 (25,5%) 8 (20,5%)	0,56

Tableau 5 : Caractéristiques anatomo-cliniques des patients inclus dans l'étude

II - L'expression de PD-L1 était plus fréquente dans les CCR MSI, et notamment dans le sous-type médullaire où PD-L1 était exprimé par les cellules tumorales.

PD-L1 n'était pas exprimé par les cellules épithéliales de la muqueuse colique normale (figure 21).

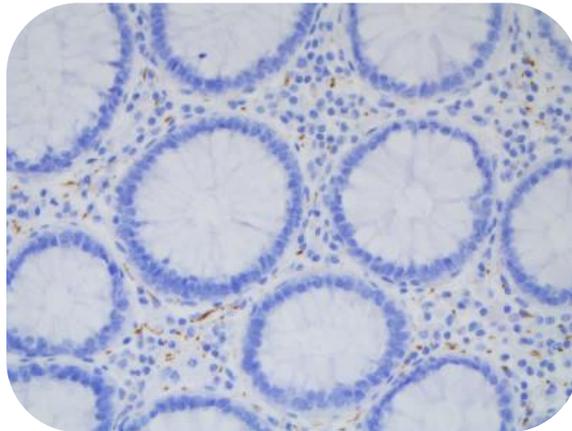
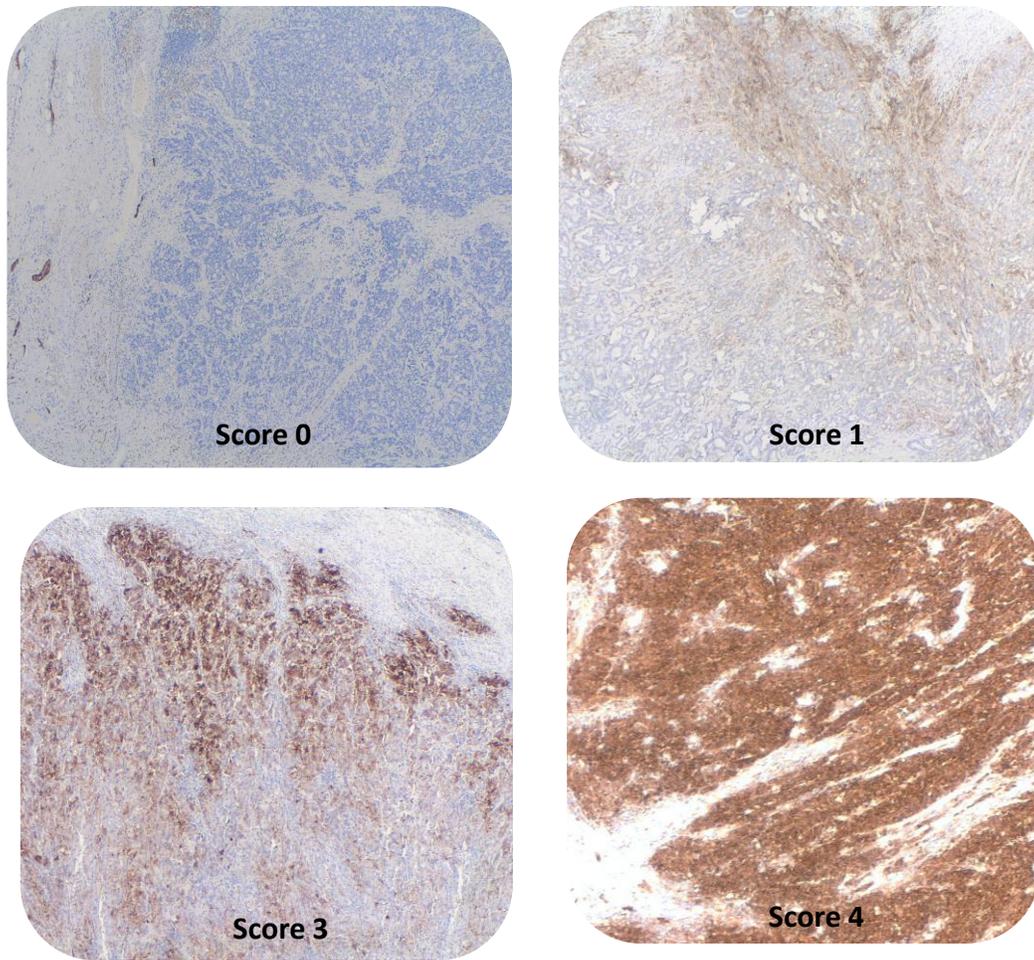


Figure 21 : Absence d'expression de PD-L1 par la muqueuse colique normale (x20)

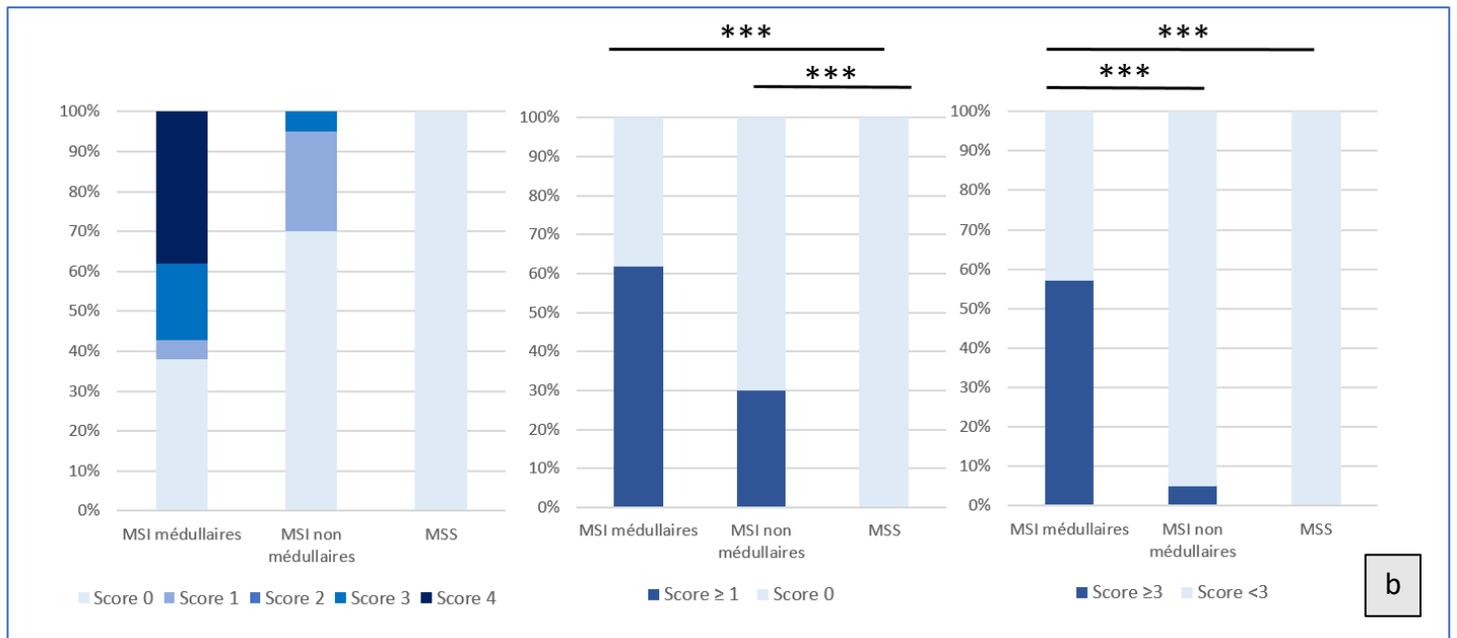
Dans les CCR, 78% (32/41) des CCR MSI étaient PD-L1+ (expression membranaire +/- cytoplasmique par les cellules tumorales et/ou les cellules du stroma) contre 46% (18/39) des CCR MSS ($p=0,005$). Plus précisément, dans les CCR MSI, l'expression de PD-L1 était plus importante dans les CCR de type médullaire. En effet, 90% des CCR médullaires étaient PD-L1+ (19/21) contre 65 % des CCR MSI non médullaires (13/20), mais la différence n'atteint pas la significativité statistique ($p = 0,06$).

II. 1 – L'expression de PD-L1 par les cellules tumorales était hétérogène, présente uniquement dans les CCR MSI, et préférentiellement dans le sous-type médullaire.

L'expression aberrante de PD-L1 par les cellules tumorales (score ≥ 1) n'était retrouvée que dans les CCR MSI (19/41, 46%) (au total, 61 cas score 0, 6 score 1, 0 score 2, 5 score 3, 8 score 4). Aucun CCR MSS ne présentait ce profil d'expression de PD-L1 par les cellules tumorales ($p < 0,0001$) (figure 22).



a



b

Figure 22: Profil d'expression de PD-L1 par les cellules tumorales dans les trois groupes de CCR

a : Représentation des scores d'expression de PD-L1 par les cellules tumorales (x2,5)

b : Expression de PD-L1 par les cellules tumorales dans les trois groupes de CCR : ensemble des scores, score 1 et score 3.

Cette expression tumorale était hétérogène, soit diffuse (équivalent au score 4), soit en foyers, plus focale, assez souvent à l'interface avec le stroma, notamment au niveau du front d'invasion mais pas uniquement (figure 23).

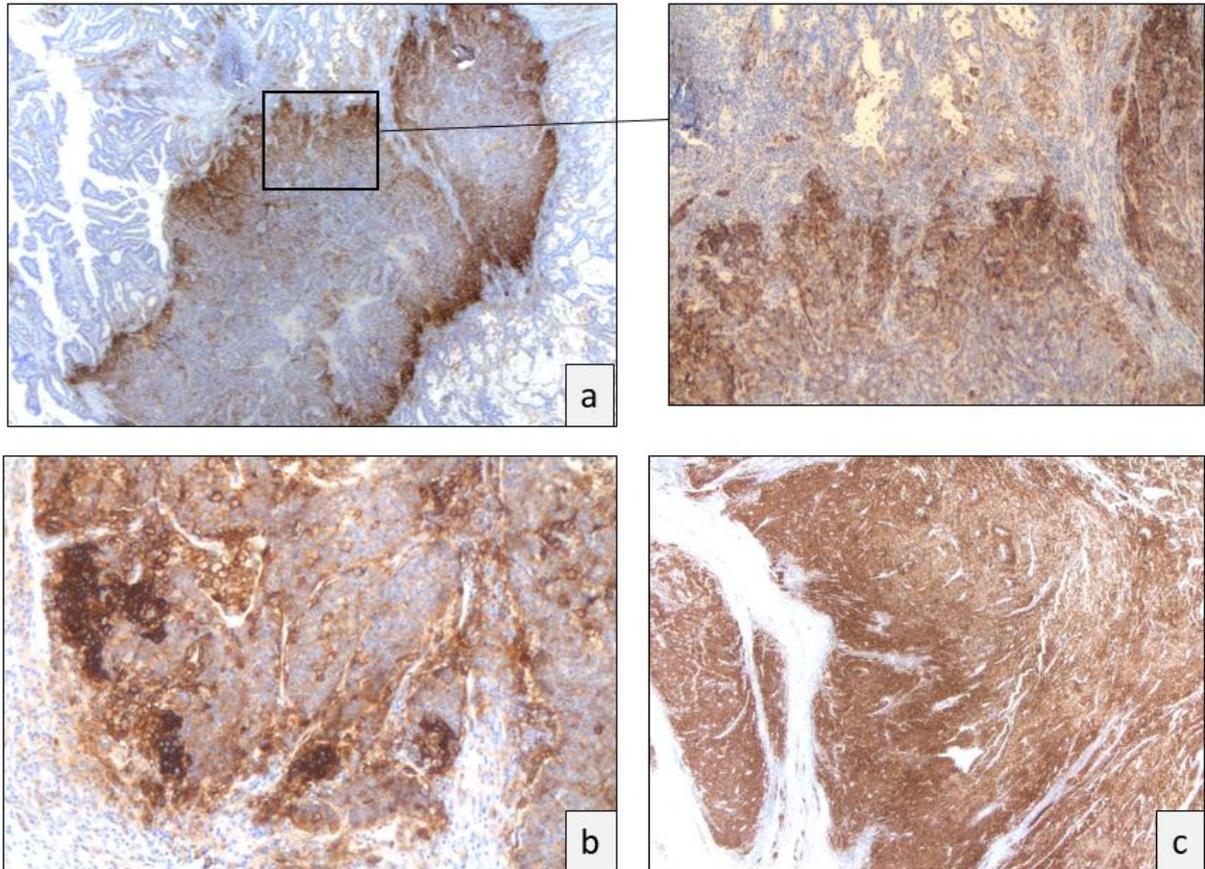


Figure 23 : Expression hétérogène de PD-L1 par les cellules tumorales dans les CCR MSI

a : Expression focale de PD-L1 par les cellules tumorales dans un CCR MSI non médullaire avec un renforcement à l'interface tumeur/ stroma au sein de ce foyer (x 1,25) ; b : Renforcement d'expression de PD-L1 par les cellules tumorales à l'interface tumeur/stroma dans un CCR MSI médullaire (x10) ; c : Expression homogène et diffuse de PDL1 dans un CCR MSI médullaire (x1,25)

Elle était préférentiellement retrouvée dans le sous-type médullaire (62%, 13/21) par rapport aux non médullaires (30%, 6/20), mais la différence n'atteignait pas la significativité statistique ($p=0,061$). En revanche, si l'on considère une expression aberrante de PD-L1 par plus de 50% des cellules tumorales (score ≥ 3), ce profil d'expression est significativement plus fréquent dans les CCR de type médullaire (57%, 12/21) que dans les CCR non médullaires (5%, 1/20) ($p = 0,0005$) (Figure 22).

II. 2 – L'expression de PD-L1 par les cellules du stroma était hétérogène, plus fréquente dans les CCR MSI, mais était significative dans les CCR MSS.

L'expression de PD-L1 par les cellules du stroma était également répartie de façon hétérogène au sein des tumeurs, le plus souvent en foyers encorbant des ilots de cellules tumorales, principalement au niveau du front d'invasion mais également dans le centre de la tumeur (figure 25).

L'expression de PD-L1 par quelques cellules du stroma regroupées en amas (score 1, 4 à 5 amas d'au moins 50 cellules/cm² PDL1+) était assez fréquente dans les CCR (20%, 19/80) et notamment dans les CCR MSS (33%, 13/39).

Cependant, en considérant une expression significative de PD-L1 par les cellules du stroma (score ≥ 2 , plus de 5 amas d'au moins 50 cellules marquées/cm², celle-ci était retrouvée dans 56 % de CCR MSI (23/41), et 43 % de CCR MSS (18/39) ($p=0,5$) (figure 25). Parmi les CCR MSI, 52% des CCR MSI médullaires et 60% des CCR MSI non médullaires exprimaient PD-L1 par le stroma. Aucune différence statistiquement significative n'a été démontrée.

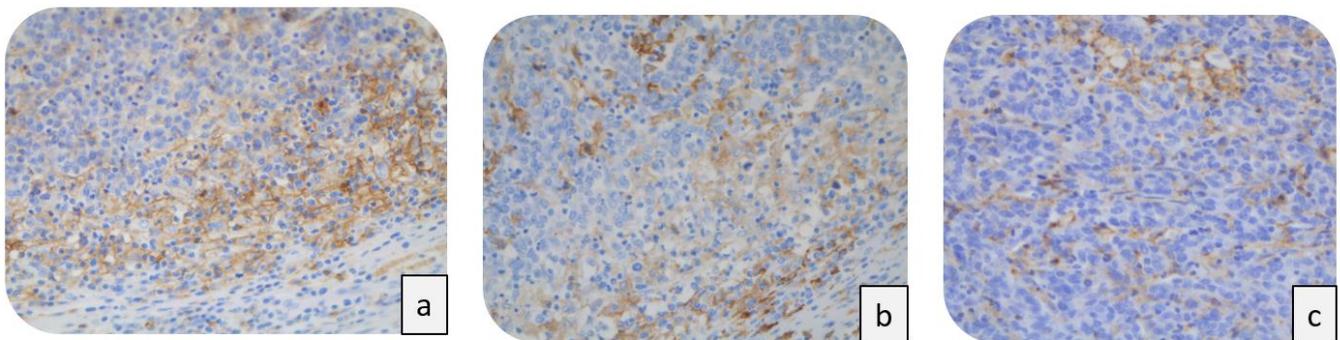


Figure 24 : Les cellules du stroma PD-L1+ (a) se superposent à des cellules myéloïdes CD163+(b) avec rares cellules lymphoïdes PD-L1+ (c) (x20)

Concernant la nature des cellules du stroma PD-L1+, il s'agissait essentiellement de cellules de grande d'allure macrophagique CD163+, associée à de rares éléments lymphoïdes (figure 24). Une partie des CCR MSI PD-L1+ présentait une expression de PD-L1 à la fois par les cellules tumorales et par les cellules du stroma : 23,8% des CCR médullaires et 25 % des CCR MSI non médullaires.

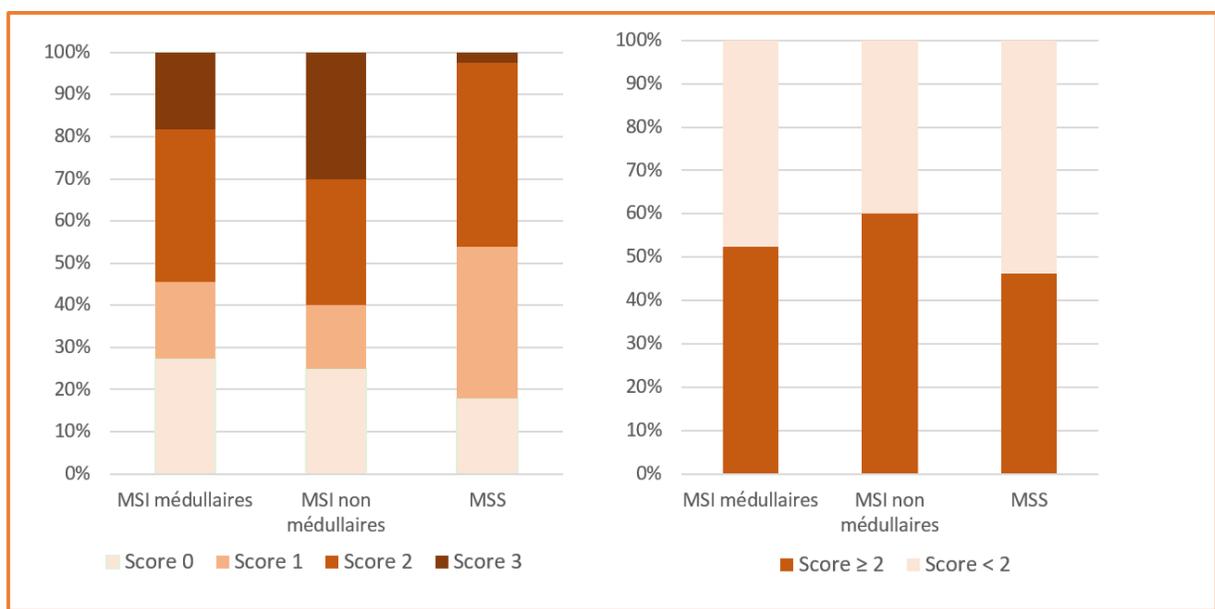
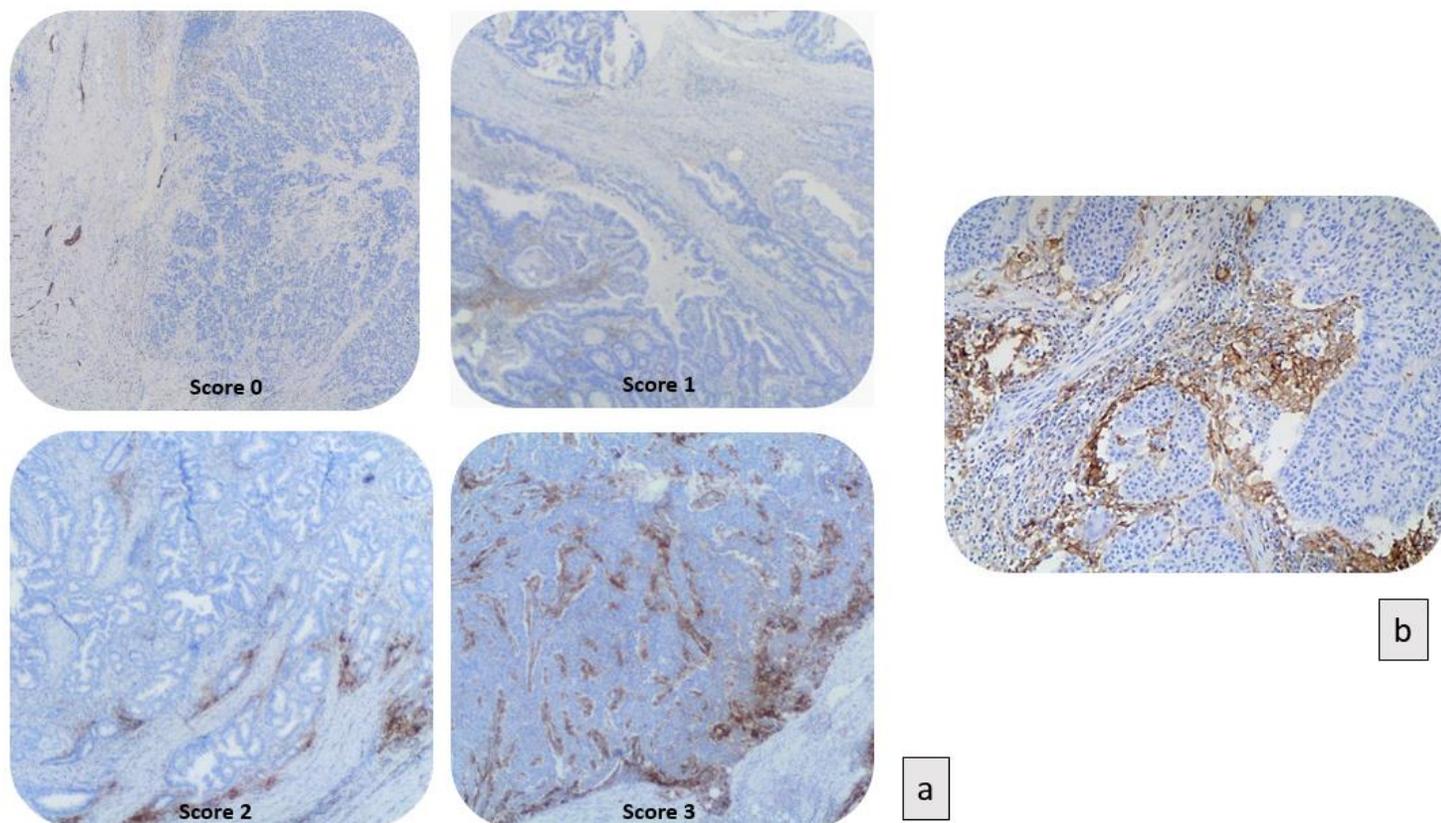


Figure 25 : Profil d'expression de PD-L1 par les cellules du stroma dans les CCR.

a : Représentation des scores d'expression de PD-L1 par les cellules du stroma dans les CCR

b : CCR MSI médullaire avec image d'encorbellement des cellules tumorales par des cellules du stroma PD-L1 +(x 10)

c : Expression de PD-L1 par les cellules du stroma dans les trois groupes de CCR : ensemble des scores et score 2

II.3 – L'expression de PD-L1 était associée à certaines caractéristiques anatomo-cliniques

L'expression de PD-L1 globale (cellules tumorales et/ou cellules du stroma) était retrouvée préférentiellement dans des tumeurs volumineuses (>7,5cm, $p=0,004$), de phénotype MSI ($p=0,0052$), dans la variante médullaire ($p=0,0015$), de stade II ($p=0,01$) (tableau 6).

	PD-L1 + (n=50) (%)	PD-L1- (n = 30) (%)	p
Age			
Moyenne	72,4	72,3	0,74
<65	14 (28)	7 (23,3)	0,794
≥65	36 (72)	23 (76,7)	
<75	22 (44)	18 (60)	0,24
≥75	28 (56)	12 (40)	
Sexe			
Homme	19 (38)	16 (53,3)	0,24
Femme	31 (62)	14 (46,6)	
Stade UICC			
I	4 (8)	4 (13,3)	
II	26 (52)	7 (23,3)	0,01
III	12 (24)	13 (43,3)	
IV	8 (16)	6 (20)	0,76
Taille tumorale			
Moyenne	6,5	5,21	0,023
<5 cm	15 (30)	9 (30)	1
>5 cm	35 (70)	21 (70)	
<7,5 cm	30 (60)	27 (90)	0,004
≥7,5 cm	20 (40)	3 (10)	
Type histologique			
NOS BD MD	20 (40)	18 (60)	0,10
NOS PD	1 (2)	1 (3,4)	
Médullaire	20 (40)	2 (6,6)	0,0015
Mucineux	8 (16)	6 (20)	0,76
Polymorphe	1 (2)	2 (6,6)	0,55
Festonné	0 (0)	1 (3,4)	
Site tumoral			
Droit	30 (60)	16 (53,3)	0,64
Autres	20 (40)	14 (46,7)	
Statut			
MSI	32 (64)	9 (30)	0,0052
MSS	18 (36)	21 (70)	

Tableau 6 : Caractéristiques anatomo-pathologiques des CCR selon l'expression globale de PD-L1

Sur les deux cas de CCR MSI héréditaires, l'un exprimait PD-L1 par les cellules tumorales, l'autre par les cellules du stroma.

III - IDO-1 était essentiellement exprimée par les cellules tumorales, de manière significative dans les trois groupes de CCR.

IDO-1 n'était exprimée dans la muqueuse colique normale que par des cellules du chorion d'allure macrophagique et quelques cellules dendritiques dans les îlots lymphoïdes intra-muqueux. En revanche, elle était exprimée par les cellules épithéliales de la muqueuse péritumorale (figure 26).

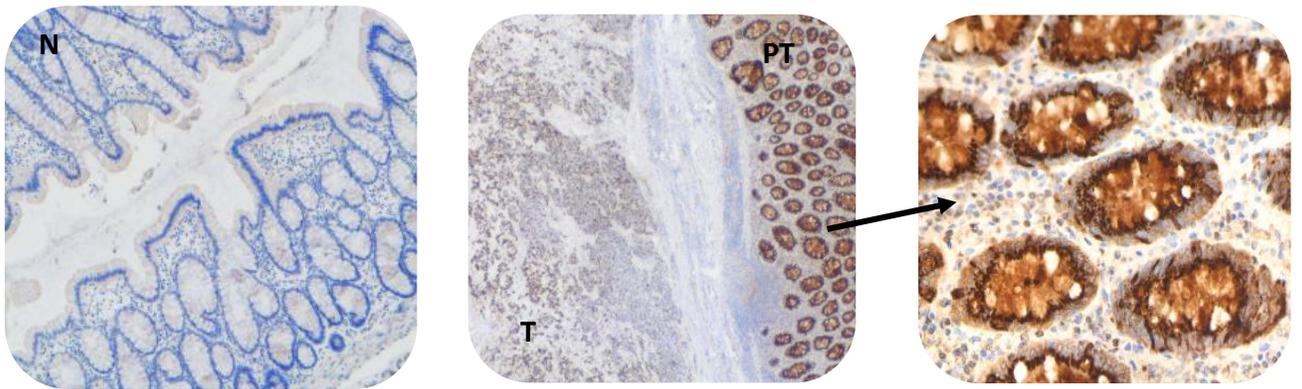


Figure 26 : Profil d'expression d'IDO en muqueuse colique normale et péritumorale.

Expression d'IDO-1 par de rares cellules du chorion de la muqueuse colique normale (N) (x5), au milieu : expression d'IDO-1 par la muqueuse colique péri tumorale (PT) (x1,25) dans un CCR MSI non médullaire (x2,5), principalement par les cellules épithéliales de la muqueuse péritumorale (x20) (T = tumeur).

Dans les CCR, IDO-1 était exprimée de manière aberrante essentiellement par les cellules tumorales, sous la forme d'un marquage cytoplasmique homogène ou granuleux. L'expression d'IDO-1 par les cellules du stroma était rare, observée uniquement dans 1 CCR MSS (figure 27) par des cellules d'allure macrophagique ou dendritique (score 3).

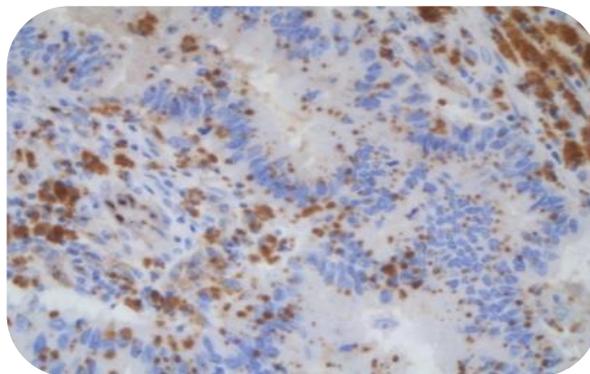


Figure 27 : Expression aberrante d'IDO-1 par les cellules du stroma dans un CCR MSS (score 3) associée à une expression focale dans les cellules tumorales (score 1) (x20).

Cette expression (score \geq 1, plus de 5% des cellules tumorales) était retrouvée dans 46% de CCR MSI et 38% des CCR MSS. Parmi les CCR MSI, cette expression concernait 47% des CCR MSI médullaires et 45% des CCR non médullaires. Nous n'avons pas retrouvé de différence d'expression statistiquement significative entre les groupes. Si l'on considère l'expression aberrante d'IDO-1 par plus de 50% des cellules tumorales (score \geq 3), 14% des CCR MSI médullaires, 10% des CCR non médullaires, et 23% des CCR MSS présentaient ce profil, sans différence statistiquement significative (figure 28).

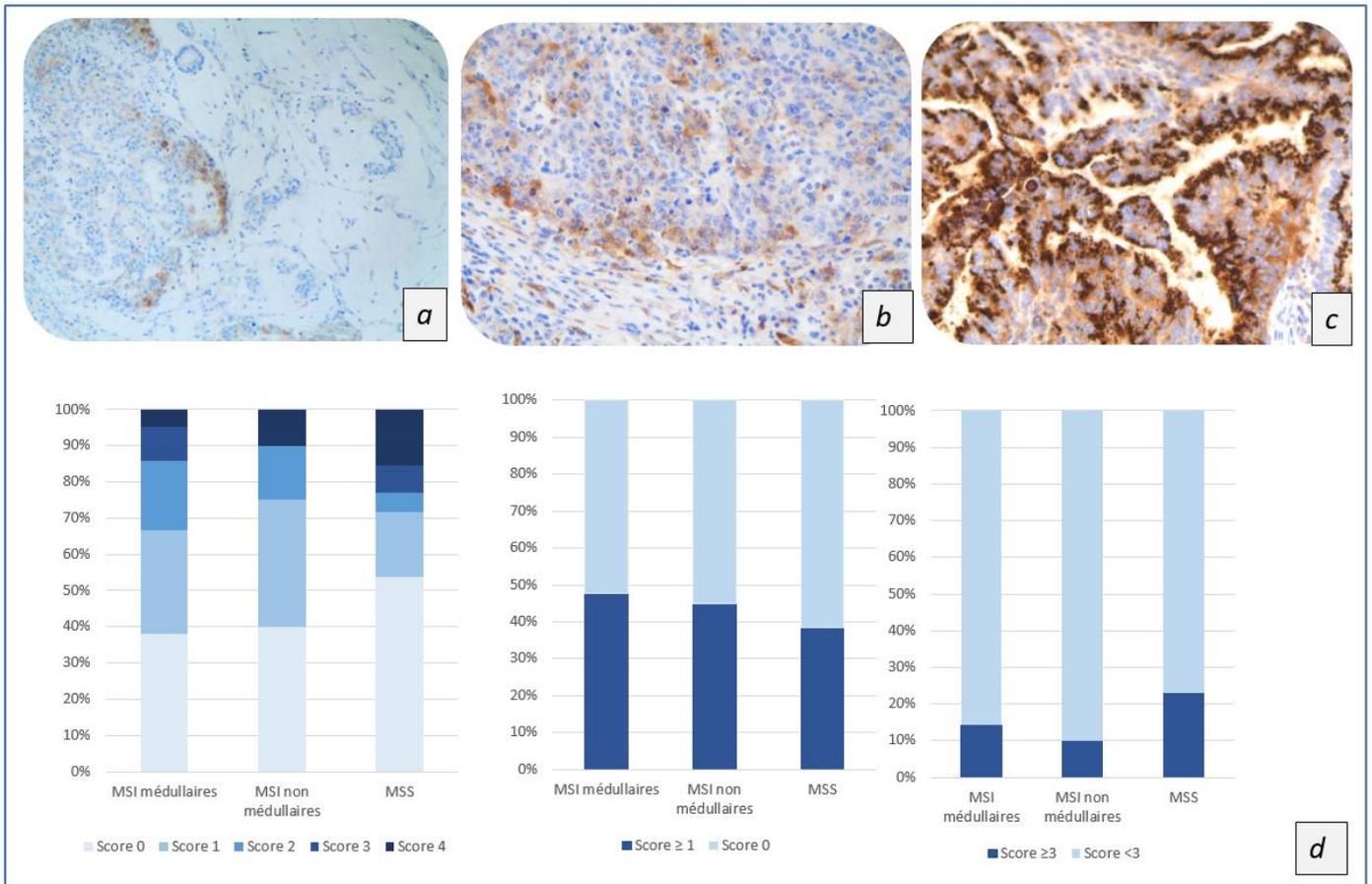


Figure 28 : Profil d'expression d'IDO-1 par les cellules tumorales dans les CCR

a : CCR MSI non médullaire (10% de cellules tumorales, score 1) (x10), b : CCR MSI médullaire (20% de cellules tumorales, score 1) (x20) ; c : CCR MSS (80% de cellules tumorales, score 4) (x20) ; d : expression d'IDO-1 par les cellules tumorales dans les trois groupes de CCR : ensemble des scores, score 1 et 3.

L'expression d'IDO-1 était plus fréquente dans les CCR du colon droit ($p=0,04$) (tableau 7).

	Expression d'IDO-1		
	IDO CT+ (n = 34) (%)	IDO CT- (n = 46) (%)	p
Age			
Moyenne	74	71	0,85
Rang	54-89	35-95	
<75	15 (44,1)	26 (56,5)	0,36
≥75	19 (55,9)	20 (43,5)	
Sexe			
Homme	15 (44,1)	20 (43,5)	1
Femme	19 (55,9)	26 (56,5)	
Stade UICC			
I	2 (5,9)	6 (13)	0,0534
II	20 (58,8)	13 (28,3)	
III	8 (23,5)	17 (37)	
IV	4 (11,8)	10 (21,7)	
Taille tumorale			
Moyenne	6,4	5,7	0,17
<7,5 cm	22 (64,7)	36 (78,2)	0,21
≥7,5 cm	12 (35,3)	10 (21,8)	
Site tumoral			
Droit	15 (44,1)	31 (67,4)	0,0430
Gauche	11 (32,4)	10 (21,7)	
Transverse	5 (14,7)	4 (8,7)	
Grêle	1 (2,9)	0 (0)	
Rectum	2 (5,9)	1 (2,2)	
Type histologique			
NOS BD MD	13 (38,3)	25 (54,3)	0,26
NOS PD	1 (2,9)	1 (2,2)	
Médullaire	11 (32,4)	11 (23,9)	0,45
Mucineux	7 (20,6)	7 (15,2)	0,56
Polymorphe	1 (2,9)	2 (4,4)	1
Festonné	1 (2,9)	0 (0)	
Statut			
MSI	19 (55,9)	22 (47,8)	0,5
MSS	15 (44,1)	24 (52,2)	

Tableau 7 : Caractéristiques anatomo-cliniques des CCR selon l'expression d'IDO-1.

Nous n'avons pas mis en évidence de relation entre l'expression d'IDO-1 et l'expression de PD-L1 que ce soit par les cellules tumorales ($p=0,42$) ou par les cellules du stroma ($p=0,82$).

IV – Les densités en TIL PD-1+ et T-bet+ étaient significativement plus élevées dans les CCR MSI, notamment les CCR de sous-type médullaire, étaient corrélées entre elles et à l'expression de PD-L1.

IV.1 – Densité en TIL PD-1+

La densité en TIL PD-1+ était significativement plus élevée dans les CCR MSI (233,8/champ +/- 326,2) que dans les CCR MSS (42,7/champ +/- 158,8) ($p < 0,0001$) (figure 29).

Dans les CCR MSS, le cancer avec la densité la plus élevée en TIL PD-1+ (997/champ) correspondait au CCR de sous-type médullaire.

Dans les CCR MSI, la densité en TIL PD-1+ était significativement plus élevée dans les CCR de type médullaire (369,2/champ, 2 à 1555/champ +/- 406) que dans les CCR non médullaires (91,6/champ, 1,8 à 260/champ +/- 94,7) ($p = 0.003$).

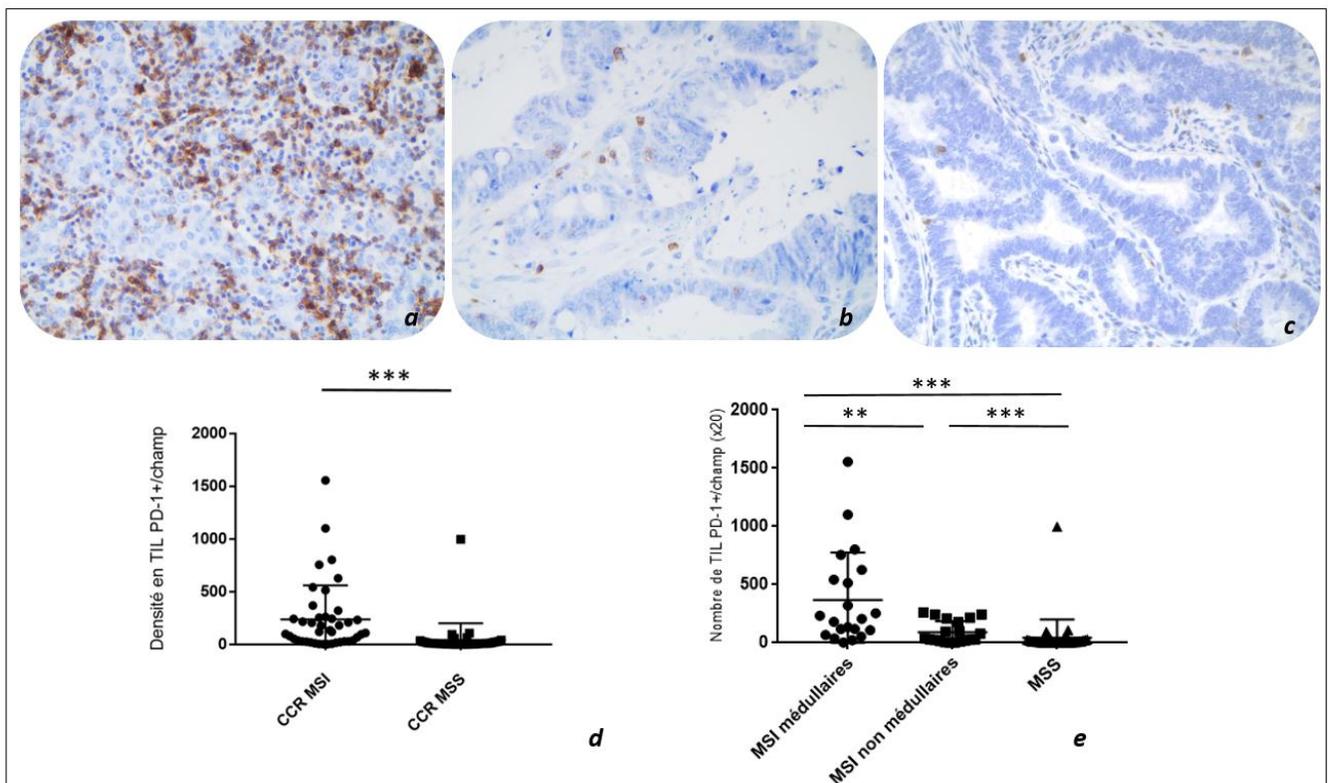
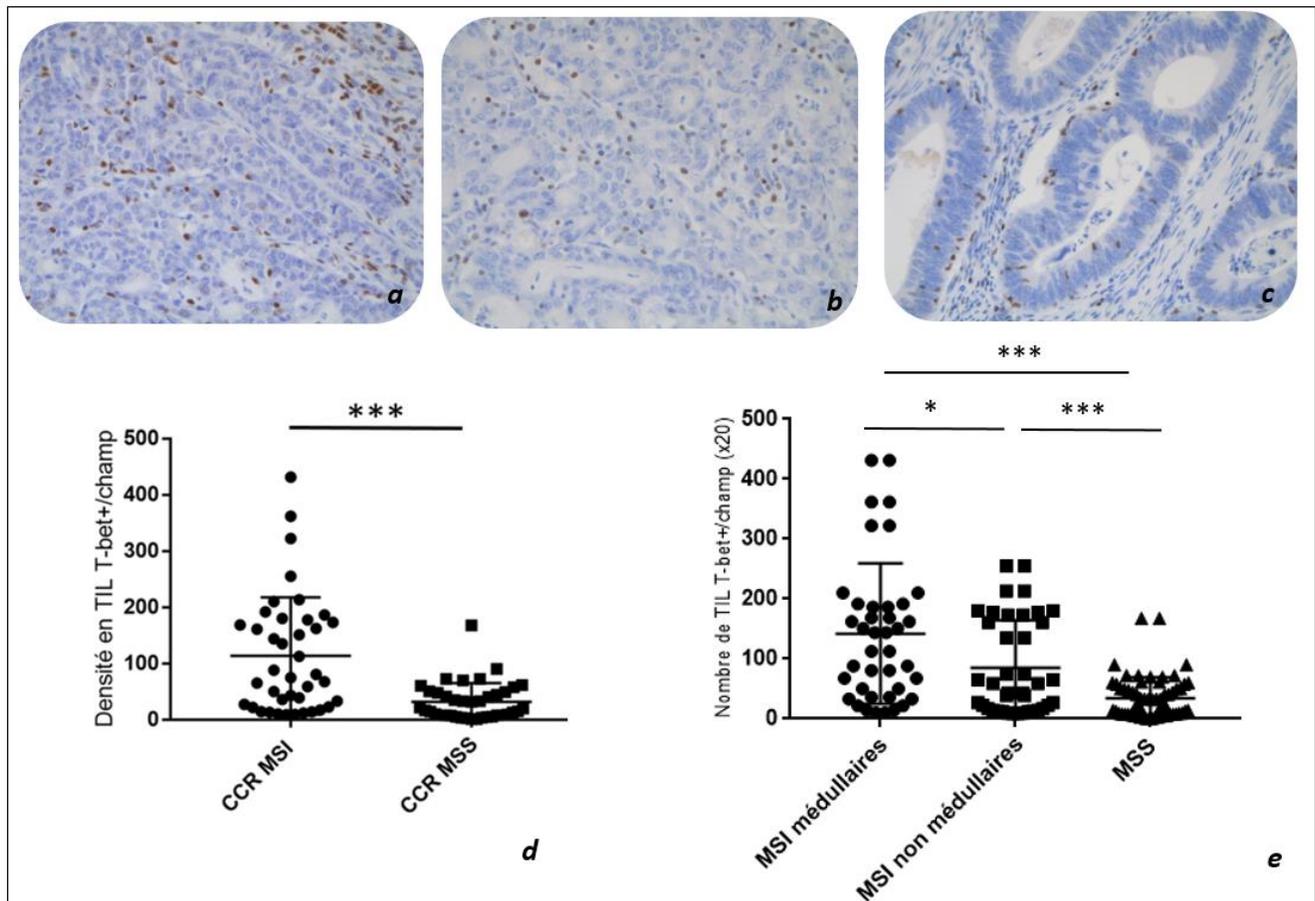


Figure 29: Profil d'expression de PD-1 par les TIL dans les différents groupes de CCR (x 20)

a : CCR MSI médullaire, b : CCR MSI non médullaire, c : CCR MSS ; d et e : densité en TIL PD-1+ selon les groupes de CCR

IV.2 – Densité en TIL T-bet+

La densité en TIL T-bet+ était significativement plus élevée dans les CCR MSI (moyenne 113,6/champ, +/- 104,2) que dans les CCR MSS (moyenne 31,8/champ, +/- 33,2) ($p < 0,0001$). Le CCR MSS de sous-type médullaire avait une des densités les plus élevées (90 TIL T-bet+/champ versus 31,8/champ en moyenne. Plus précisément, dans les CCR MSI, leur densité était significativement plus élevée dans le sous-type médullaire (moyenne 142,2/champ, +/- 117,2) par rapport aux non médullaires (moyenne 85/champ, +/- 79,4) ($p = 0,01$) (figure 30).



IV.3 – La densité en TIL T-bet+ était corrélée à la densité en TIL P-D1+.

De manière intéressante, nous avons mis en évidence une corrélation significative entre le nombre de TIL T-bet+ et le nombre de TIL PD-1+ dans la cohorte globale ($r = 0.598$, $p < 0,0001$) (figure 31), la densité en TIL T-bet+ étant inférieure à la densité en TIL PD-1+.

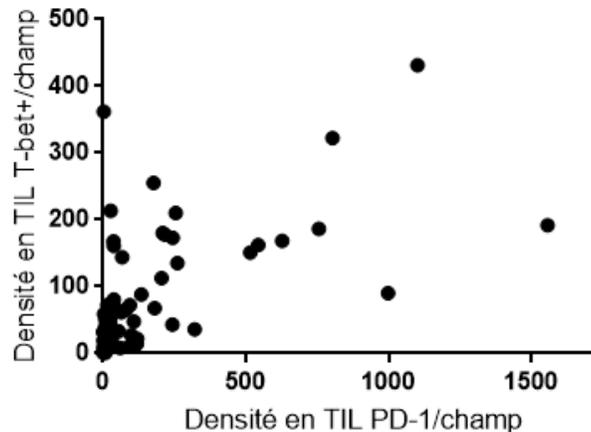


Figure 31 : Corrélation entre la densité en TIL T-bet+ et PD-1+ dans les CCR ($r = 0,598$)

Cette corrélation reste significative dans les différents groupes de CCR ($p = 0,0005$, $r = 0,527$ dans les CCR MSI ; $p = 0,001$, $r = 0,54$ dans les CCR MSI médullaires ; $p = 0,018$, $r = 0,52$ dans les CCR MSI non médullaires et $p = 0,0007$, $r = 0,518$, dans les CCR MSS).

IV.4 – La densité en TIL T-bet+ et PD-1+ était associée à l'expression de PD-L1.

PD-L1 étant l'un des ligands du récepteur PD-1 exprimé par certains lymphocytes T, nous avons corrélié l'expression de PD-L1 avec la densité en TIL PD-1+ dans chaque groupe de CCR (figure 32). La densité en TIL PD-1+ était significativement plus élevée dans les CCR PD-L1+ dans la cohorte globale, que ce soit une expression de PD-L1 par les cellules du stroma et/ou par les cellules tumorales (206 TIL PD-1+/champ +/- 328 dans les CCR PD-L1+ versus 30 TIL PD1+/champ +/- 53 dans les CCR PD-L1- ; $p < 0,0001$), par les cellules tumorales uniquement (378/champs +/- 555 dans les CCR PD-L1+ versus 30/champ +/- 53 dans les PD-L1- ; $p = 0,0013$), ou par les cellules du stroma uniquement (151/champs dans les CCR PD-L1+ +/- 246 versus 30/champ +/- 53 dans

les PD-L1- ; $p = 0,0075$). De plus, il existait une corrélation significative entre la densité en TIL PD-1+ et l'expression globale de PD-L1 ($r=0,49$ et $p<0,0001$).

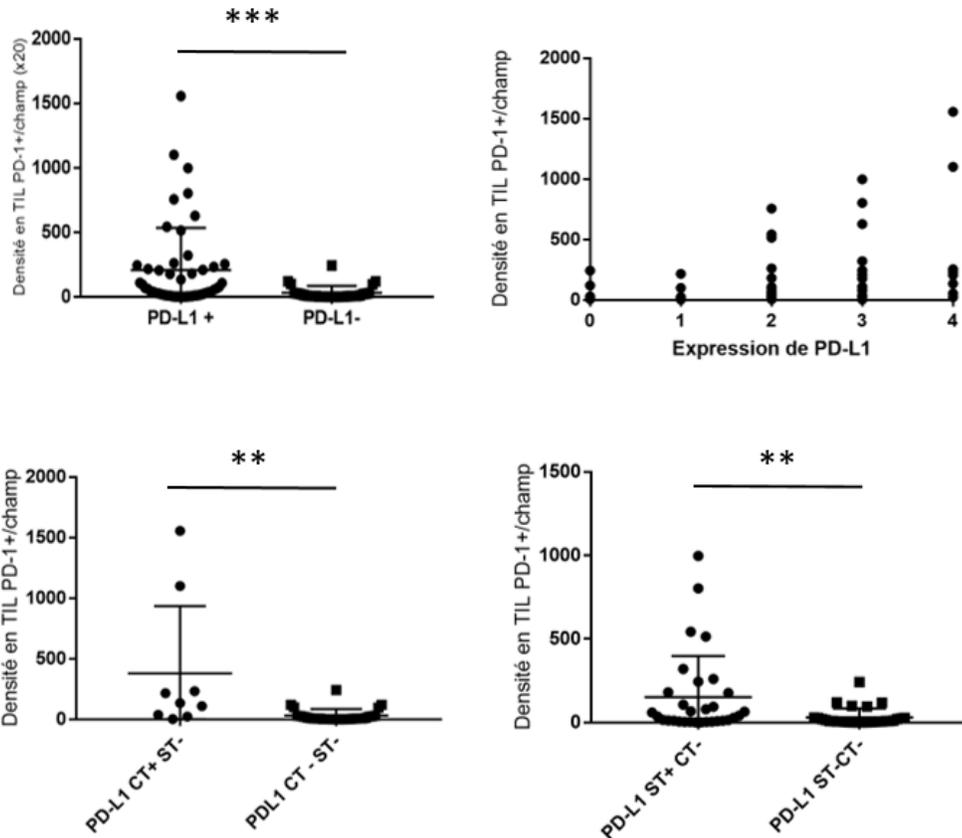


Figure 32: Densité en TIL PD-1+ en fonction de l'expression de PD-L1 (globale, par les cellules tumorales uniquement ou le stroma uniquement)

Cette corrélation est également observée de manière significative dans les CCR MSS ($p = 0,0061$; $r = 0,431$) et semble également exister dans les MSI ($p = 0,06$; $r = 0,28$).

L'expression de PD-L1 pouvant être induite par l'IFN γ , sécrétée par les lymphocytes T T-bet+ (Th1 et Tc1), nous avons également analysé la relation entre l'expression de PD-L1 et la densité en TIL T-bet+. La densité en TIL T-bet+ était significativement plus élevée dans les CCR PD-L1+ par rapport aux CCR PD-L1- dans la cohorte globale, que ce soit une expression de PD-L1 par les cellules tumorales et/ou le stroma (107/champ +/- 96 dans les CCR PD-L1+ versus 17/champ +/- 14 dans les CCR PD-L1-; $p<0,0001$), par les cellules tumorales uniquement (174/champ +/- 151 dans les CCR PD-L1+ versus 17 +/- 15 dans les CCR PD-L1-; $p<0,0001$) ou par les cellules du stroma

uniquement (81/champ +/- 75 dans les CCR PD-L1 ST+ contre 17 +/- 15 dans les CCR PD-L1 ST- ; $p < 0,0001$).

De plus, il existait une corrélation significative entre la densité en TIL T-bet+ et l'expression de PD-L1 globale ($r = 0.66$ et $p < 0.0001$) (figure 33).

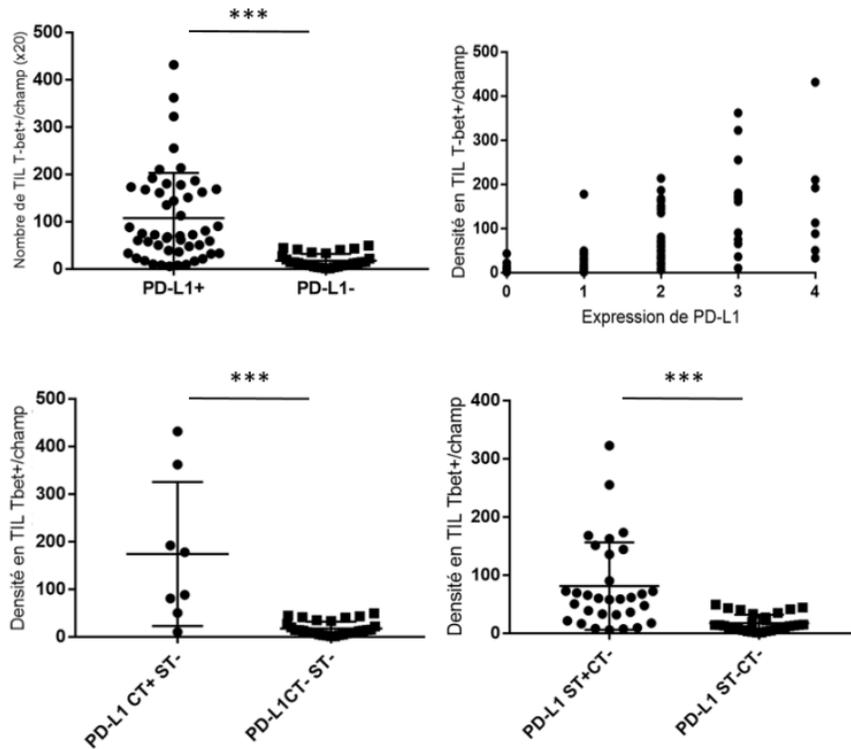


Figure 33 : Densité en TIL T-bet+ en fonction de l'expression de PD-L1 globale, par le stroma et/ou les cellules tumorales, par les cellules tumorales (CT) et par le stroma (ST).

Cette corrélation persiste dans les sous-groupes CCR MSI ($r = 0.52$, $p = 0.005$) et MSS ($r = 0.61$, $p < 0.001$).

L'expression d'IDO-1 pouvant être induite par l'IFN γ , nous avons également analysé la relation entre l'expression d'IDO-1 et la densité en TIL T-bet+. Bien que n'ayant pas retrouvé de relation statistiquement significative, les CCR IDO-1+ semblent être plus riches en TIL T-bet+ (91/champ+/-108) par rapport aux CCR IDO-1- (62/champ+/-68) ($p = 0,26$).

DISCUSSION

Cette étude rétrospective portant sur 80 CCR, est l'une des premières ayant analysé de manière assez exhaustive en immunohistochimie sur coupes entières, la fréquence et le profil d'expression de deux molécules immunorégulatrices - le ligand PD-L1 et l'enzyme IDO-1 – dans les CCR MSI connus pour être associés à un riche microenvironnement immunitaire, en les comparant aux CCR de type MSS, en fonction des différentes variantes histologiques de la classification OMS. Nous montrons que : 1) l'expression de PD-L1 est fréquente dans les CCR, mais très hétérogène d'une tumeur à l'autre et sein d'une même tumeur, retrouvée dans plus de 60% des CCR, 2) l'expression de PD-L1 est retrouvée préférentiellement dans les CCR MSI (78%), et notamment dans le sous-type médullaire (90%), 3) cette expression est corrélée à un infiltrat riche en TIL PD-1+ et en TIL T-bet+, 4) IDO-1 est exprimé dans plus de 40% des CCR, quel que soit leur statut microsatellitaire.

Nous rapportons dans cette étude, une expression de PD-L1 dans 62% des CCR. Il s'agit d'une expression aberrante puisque nous ne la retrouvons pas dans la muqueuse colique normale, en accord avec la plupart des études (53,77,137–139). Dans la littérature, les données sur l'expression de PD-L1 en immunohistochimie dans les CCR sont très variables, le plus souvent parcellaires, et parfois discordantes entre les études. Dans les CCR en général, la fréquence rapportée varie de 5% à 89%. Cette variabilité et ces discordances sont vraisemblablement liées à des différences en termes de méthodologie et d'interprétation des immunomarquages. En effet, il n'y a pas de consensus actuel pour tester l'expression de PD-L1 sur coupes tissulaires. Différents anticorps, certains étant reconnus comme peu performants pour l'immunohistochimie, différents scores (précisant ou non le type de cellule évalué, le niveau d'intensité de l'immunomarquage, le marquage membranaire ou cytoplasmique, le pourcentage de cellule considéré) sont utilisés en fonction des études, et les études les plus récentes incluant un nombre significatif de patients ont été réalisées sur Tissue Micro-arrays (TMA), ne permettant pas d'apprécier l'éventuelle hétérogénéité d'expression de PD-L1 dans les CCR. Hors, cette hétérogénéité d'expression a été rapportée dans les cancers du poumon et le mélanome

notamment (5,6). Notre étude est la première à avoir analysé dans une cohorte significative de CCR, de type médullaire notamment, l'expression de PD-L1 sur coupes entières afin de prendre en compte cette hétérogénéité d'expression. Seule une étude avait également analysé le profil d'expression de PD-L1 à partir de coupes entières, dans une cohorte de 87 patients et rapportait 21% de CCR PD-L1+ en prenant en compte uniquement les cellules tumorales et sans préciser le seuil de positivité (111). Nous avons utilisé un anticorps monoclonal commercialisé depuis 2014 (clone E1L3N, Cell Signaling Technology), validé lors de certains essais cliniques pour l'immunohistochimie sur coupes de tissus formolés et inclus en paraffine (140), mais pas encore considéré comme test « compagnon ». Nous avons considéré un seuil de >5% de cellules tumorales PD-L1+ avec un marquage membranaire, ce type d'expression membranaire permettant une interaction avec son récepteur (62) et ce seuil ayant été associé à une réponse thérapeutique significative dans des essais cliniques (83,141). Notre étude sur coupes entières permet de retrouver une hétérogénéité de PD-L1 d'une tumeur à l'autre et au sein d'une même tumeur avec une expression focale (41%) ou diffuse (21%). L'expression de PD-L1 est observée essentiellement sur les cellules du stroma de nature macrophagique CD163+ et est moins fréquente sur les cellules tumorales. Cette expression par les cellules tumorales et/ou les cellules du stroma est assez souvent retrouvée à l'interface cellules tumorales/stroma, avec des cellules macrophagiques PD-L1+ encorbellant les îlots tumoraux, ou des foyers de cellules tumorales PD-L1+ à la lisière du stroma. Ce profil d'expression, soit focal, soit diffus, a déjà été rapporté dans le mélanome et le cancer du poumon (142,143) et en partie dans le CCR (105,112,131) et suggère des interactions particulières entre cellules tumorales et cellules immunitaires.

Nous montrons une expression préférentielle de PD-L1 dans les CCR MSI (78%) par rapport aux CCR MSS (46%). Cette expression préférentielle de PD-L1 dans les CCR MSI a été rapportée dans quatre études récentes (54,105,111,112) avec des pourcentages cependant moins élevés (12,5 ; 18 ; 38 ; 75%). Néanmoins, les fréquences sont difficiles à comparer car les cellules étudiées et les scores utilisés sont différents. Deux études récentes sur TMA ont étudié l'expression de PD-L1 à la fois par les cellules tumorales et les cellules du stroma, sans rapporter toutefois l'expression globale observée (132,144).

De manière intéressante, nous retrouvons une expression significative de PD-L1 dans les CCR MSS (46%). Dans la littérature, l'expression rapportée est plus faible, oscillant entre 2 et 10% (112,132). Dans notre étude, il s'agit d'une expression par les cellules du stroma uniquement. Ce résultat est surprenant compte-tenu de l'absence de réponse rapportée dans ce groupe de cancer (105), dans un essai, incluant cependant, peu de CCR MSS. Parmi les CCR MSS ayant été testés (4/21), aucun n'exprimait PD-L1. Nos résultats laissent donc à penser qu'un nombre significatif de cancers MSS pourrait être éligible aux immunothérapies anti PD-1/PD-L1 sauf si l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales est nécessaire pour induire une réponse objective. En effet, pour certains auteurs, l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales semble nécessaire (55), pour d'autres, l'expression par les cellules du stroma pourrait être suffisante (88). Les résultats des essais incluant notamment davantage de CCR MSS permettront peut-être de répondre à cette question.

Contrairement à d'autres types de tumeurs (mélanome, cancer du poumon...), nous montrons que l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales est peu fréquente (24%). Seuls 10% des CCR présentent une expression diffuse par les cellules tumorales (score 4). Ce profil d'expression caractérise préférentiellement les CCR MSI (46%), en accord avec études récentes publiées pendant la réalisation de notre propre étude, mais avec des fréquences plus faibles de 18% et 22% respectivement dans les études de Lee et al et Rosenbaum et al (112,145). En outre, nous décrivons ce profil d'expression surtout dans les CCR MSI de sous-type médullaire (62%) comme le rapportent également ces deux études. La fréquence d'expression rapportée de PD-L1 dans les adénocarcinomes médullaires est variable avec parfois des résultats contradictoires. En effet, Friedman et al ne rapportaient pas de différence d'expression entre des CCR médullaires (18%) et des CCR MSI bien différenciés (23%) (étude sur TMA)(132). Ces discordances pourraient être expliquées par l'absence de critère précis pour définir les adénocarcinomes médullaires dans l'actuelle classification OMS, et bon nombre d'études ne précise notamment pas le volume de cette composante médullaire pour définir ce sous-type histologique.

Ce profil d'expression particulier de PD-L1, spécifique aux CCR MSI de type médullaire, pose la question de son origine. Elle pourrait s'expliquer par le micro-environnement immunitaire

particulièrement riche en TIL T-bet+, potentielle source d'IFN γ , une cytokine de type Th1 connue pour induire l'expression de PD-L1. D'ailleurs, nous montrons une densité significativement plus élevée en TIL T-bet+ dans les CCR médullaires par rapport aux autres CCR MSI non médullaires ou MSS et une corrélation significative ($r=0.52$, $p=0.005$) entre l'expression de PD-L1 et la densité en TIL T-bet+, notamment dans le groupe des CCR MSI. Ces résultats sont en accord avec une signature moléculaire IFN γ retrouvée dans les adénocarcinomes médullaires (132). Cette immunogénicité accrue des CCR MSI médullaires pourrait être liée à un taux de mutations frameshift plus élevé dans cette variante histologique que dans les autres CCR MSI, responsable de la synthèse d'une quantité plus importante de néoantigènes, reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques, ce qui reste à démontrer. Ce lien entre le taux de mutations « frameshift » et l'immunogénicité a été montré dans les CCR MSI (34,146), dans d'autres tumeurs MSI et dans des cancers du poumon non à petites cellules (105,147). Certaines études montrent également que l'expression aberrante de PD-L1 peut être induite par des anomalies oncogéniques de la cellule tumorale elle-même (148), selon le concept de la résistance immunitaire innée. Dans ce cas, l'expression de PD-L1 est décrite comme diffuse (82,149), profil d'expression observé uniquement dans les adénocarcinomes médullaires dans notre étude. L'expression de PD-L1 peut, dans ce cas, être induite suite à la délétion de PTEN dans les glioblastomes (65), à l'activation de la voie ALK dans les cancers du poumon (150) ou encore de la voie C-myc dans certains modèles animaux (151). L'origine de cette expression particulière de PD-L1 dans les CCR MSI médullaires mériterait donc d'être approfondie dans les études futures en corrélant les caractéristiques immunitaires au profil moléculaire de ces tumeurs dans une étude multicentrique étant donné la rareté de celle-ci.

D'autre part, nous montrons que cette expression de PD-L1 est corrélée de manière significative à la densité en TIL PD-1+ ($r=0.49$, $p<0.0001$). La densité en TIL PD-1+ est, comme l'expression de PD-L1, significativement plus élevée dans les CCR MSI que dans les CCR MSS, et particulièrement dans les CCR MSI médullaires. Cette richesse en TIL PD-1+ dans les CCR MSI médullaires a également été rapportée par Friedman et al (132). D'un point de vue fonctionnel, ces lymphocytes PD-1+ pourraient être épuisés (« exhausted »)(152,153), participant donc à l'échappement de la tumeur à la réponse immunitaire anti-tumorale, l'expression de PD-1 sur les

lymphocytes T Th1 et Tc1 survenant physiologiquement après l'étape d'activation initiale afin de réguler la réponse immunitaire effectrice. D'ailleurs, nous montrons une corrélation significative entre la densité en TIL PD-1+ et la densité en TIL T-bet+ à la fois dans la cohorte globale et dans les 3 groupes de CCR, T-bet étant le facteur de transcription induisant la différenciation des T en Th1 et en Tc1 (154). Des études fonctionnelles, sur explants après isolement de ces TIL, permettraient de vérifier si ces lymphocytes T-bet+ sont PD-1+ et donc incapables effectivement de produire de l'IFN γ .

L'ensemble de nos résultats suggèrent donc que le groupe des CCR MSI est hétérogène, au moins d'un point de vue « immunitaire » avec une surexpression préférentielle de PD-L1, PD-1 et T-bet dans les CCR MSI médullaires par rapport aux CCR MSI non médullaires, avec un profil d'expression singulier de PD-L1 par les cellules tumorales retrouvé presque exclusivement dans les CCR médullaires (57% versus des 5% dans les MSI non médullaires, pour le score 3). De manière intéressante, un CCR MSS médullaire exprimait PD-L1+ de manière très significative mais uniquement par les cellules du stroma (score 3), et était l'un des plus riches en TIL T-bet + et TIL PD-1+ parmi les CCR MSS. Ce constat pose le problème de savoir si ce type de CCR médullaire MSS se comporte de la même façon que sa contrepartie MSI, et que finalement, seules les caractéristiques morphologiques (à savoir le caractère médullaire) de la tumeur déterminent le profil d'expression de PD-L1 et non le statut microsatellitaire. Cette variante histologique, qu'elle soit MSI ou MSS, rejoindrait les CCR dits « immunogènes » caractérisés par un « immunoscore » élevé (4,155).

Les mécanismes immunorégulateurs mis en place par la tumeur pour échapper à la réponse anti-tumorale peuvent faire également intervenir des voies métaboliques comme l'expression aberrante d'IDO-1. Nous mettons en évidence une expression aberrante d'IDO-1, essentiellement par les cellules tumorales, dans 42% des CCR, en accord avec l'étude de Brandacher et al (156). Elle était toutefois observée dans les cellules épithéliales de la muqueuse péritumorale, normale morphologiquement mais vraisemblablement subnormale d'un point de moléculaire. L'expression dans les CCR était plus homogène que celle de PD-L1. Friedman et al

ont récemment rapporté une expression préférentielle d'IDO-1 dans les médullaires par rapport aux autres CCR MSI ou MSS que nous ne retrouvons pas. Cette différence peut peut-être s'expliquer par le fait qu'ils ont étudié un nombre plus conséquent de médullaires. IDO-1 est connue pour être induite par l'IFN γ . Cependant, nous n'avons pas mis en évidence de corrélation entre l'expression d'IDO-1 et la densité en TIL T-bet+. Cela peut supposer l'implication d'un autre mécanisme d'induction de l'expression d'IDO-1, soit oncogénique, soit cytokinique autre.

En conclusion, notre étude, bien qu'ayant porté sur un nombre limité de cas, a permis d'étudier de manière assez exhaustive, la fréquence et le profil d'expression de deux molécules immunorégulatrices que sont PD-L1 et IDO-1. Nous mettons en évidence une expression préférentielle de PD-L1 et PD-1 dans les CCR avec un immunoscore élevé, notamment les adénocarcinomes médullaires, qu'ils soient MSI ou MSS. Nos résultats suggèrent que les immunothérapies ciblant l'axe PD-L1 /PD-1 pourraient être particulièrement efficace dans ces CCR. L'expression concomitante d'IDO-1 dans une proportion significative de CCR peut supposer une réponse aux inhibiteurs d'IDO-1, éventuellement en combinaison avec des anti PD-1 ou PD-L1 dans certains cas.

ANNEXES

Tis : intra-épithéliale ou intramuqueuse T1 : sous-muqueuse T2 : musculéuse T3 : sous-séreuse T4a : pénétration du péritoine viscéral T4b : envahissement d'un organe de voisinage
N0 : pas de métastase ganglionnaire N1a : 1 ganglion envahi N1b : 2-3 ganglions envahis N1c : dépôts tumoraux « satellites » dans la sous-séreuse, ou dans le tissu péri-colique ou péri-rectal non péritonisé, dans le cadre d'une absence de ganglions lymphatiques métastatiques N2a : 4-6 ganglions envahis N2b : > 7 ganglions envahis
M0 : pas de métastase M1a : métastases à distance confinées à un organe M1b : métastases atteignant plus d'un site métastatique ou atteinte du péritoine

Stade 0	pTis N0 M0
Stade I	pT1-2 N0 M0
Stade IIA	pT3 N0 M0
Stade IIB	pT4a N0 M0
Stade IIC	pT4b N0 M0
Stade IIIA	pT1-T2 N1/N1c M0 et pT1 N2a M0
Stade IIIB	pT3-T4a N1N1cM0, pT2 T3N2aM0, pT1 T2N2bM0
Stade IIIC	p T4a N2a M0; p T3,T4a N2b M0; pT4b N1-N2M0
Stade IVA	tout T, Tout N, M1a
Stade IVB	tout T, tout N, M1b

Tableau 1 : Classification pTNM et stade (7ème version, UICC)

Carcinomas	
Adenocarcinoma	8140/3
Cribriform comedo-type adenocarcinoma	8201/3*
Medullary carcinoma	8510/3
Micropapillary carcinoma	8265/3*
Mucinous adenocarcinoma	8480/3
Serrated adenocarcinoma	8213/3*
Signet ring cell carcinoma	8490/3
Adenosquamous carcinoma	8560/3
Spindle cell carcinoma	8032/3
Squamous cell carcinoma	8070/3
Undifferentiated carcinoma	8020/3

Tableau 2 : Classification des CCR de l'OMS 2010 : différents types histologiques de CCR

FRANCE	
Nivolumab (OPDIVO) : AMM du 19/06/2015 via procédure centralisée Pembrolizumab (KEYTRUDA) : AMM du 17/07/2015 via procédure centralisée	
Mélanome	- Nivolumab : monothérapie ou en association à l'ipilimumab dans le traitement des patients adultes atteints d'un mélanome avancé (non résecable ou métastatique) - Pembrolizumab : monothérapie dans le traitement des patients adultes atteints d'un mélanome avancé (non résecable ou métastatique).
Rein	- Nivolumab : monothérapie dans le traitement de patients adultes atteints d'un carcinome à cellules rénales avancé après un traitement antérieur.
Poumon	- Nivolumab : monothérapie dans le traitement des patients adultes atteints d'un cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) localement avancé ou métastatique après une chimiothérapie antérieure.
USA	
Mélanome	- Nivolumab : monothérapie dans le traitement de patients avec mélanome avancé (non résecable ou métastatique) et progression de la maladie après traitement par ipilimumab, et en cas de mutation de BRAF V600 mutation après traitement par inhibiteur de BRAF. (2014) - Nivolumab : combinaison avec l'ipilimumab dans le traitement de patients avec mélanome avancé (non résecable ou métastatique), BRAF non mutés. (2015) - Pembrolizumab : monothérapie dans le traitement de patients avec mélanome avancé (non résecable ou métastatique), en première ligne. (2015)
Rein	- Nivolumab : monothérapie dans le traitement de patients adultes atteints d'un carcinome à cellules rénales avancé/métastatique, après avoir un traitement anti-angiogénique. (2015)
Poumon	- Nivolumab : monothérapie dans le traitement des patients atteints de CBNPC métastatiques de type épidermoïde, progressant pendant ou après chimiothérapie à base de platine. Les patients avec mutations EGFR ou ALK doivent avoir progressé sous un traitement adapté pour recevoir le nivolumab. (2015) - Pembrolizumab : monothérapie dans le traitement des patients atteints de CBNPC métastatiques, dont les tumeurs expriment PD-L1, avec progression de la maladie pendant ou après chimiothérapie à base de platine. L'expression de PD-L1 doit être recherché avec un test validé. (2015)
Lymphome	- Nivolumab : monothérapie dans le traitement de patients atteints de lymphome d'Hodgkin classique, échappant à une greffe de cellules souches autologues et à un traitement par brentuximab vedotin (Adcetris). (2016)
Vessie	- Atezolizumab (avec test IHC compagnon Ventana PD-L1 (SP142)) : monothérapie dans le traitement des patients atteint de carcinome urothélial de vessie localement avancé ou métastatique dont la maladie a progressé pendant ou après une chimiothérapie à base de platine en situation métastatique ou dont la maladie s'est aggravée dans les 12 mois suivant une chimiothérapie à base de platine administrée avant intervention chirurgicale (traitement néoadjuvant) ou après intervention chirurgicale (traitement adjuvant). (2016)
CCR	- Pembrolizumab : monothérapie dans le traitement de patients atteints de CCR métastatiques MSI-H (2015)

Tableau 3 : Indication des immunothérapies en France et aux USA

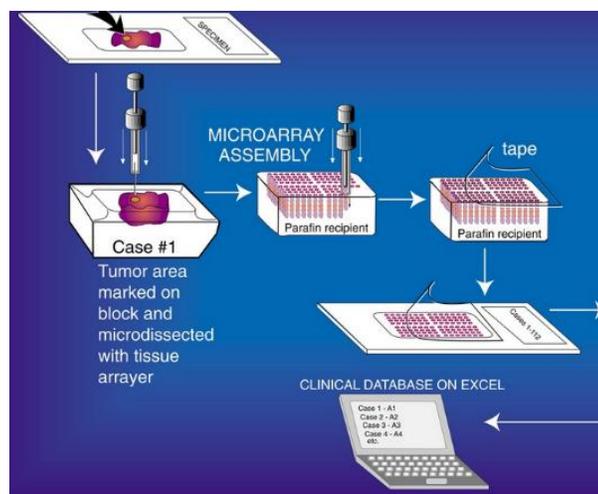


Figure 1 : Représentation des TissueMicroArrays, utilisés dans certaines études

(source Internet : openspecimenatlassian.net)

Auteur (Réf.)		Nombre de CCR (+IHC si différent)	Clone	TMA	Seuil de positivité	Marquage M/C	Intensité	Analyse des cellules tumorales (CT)	Analyse des cellules du stroma (ST)	Expression par les cellules tumorales	Expression par les cellules du stroma	Expression par la muqueuse colique normale
Dong 2002(53)	Etude	19	5H1	Non	10% de tumeur	M et C	X	NR	NR	53% des CCR PD-L1+, sans précision sur la nature des cellules		Absence
Brahmer 2010 (102)	Essai anti PD-1	14 (0 IHC)	5H1	Non	5%	M	N	X	N	Pas d'analyse IHC de CCR		
Topalian 2012 (83)	Essai anti PD-1	19 (7IHC)	5H1	Non	5%	M	N	X	N	1 CCR/7 (5% des CT)		
Hua 2012(137)	Etude	102	NR	X	Intensité >1	M et C	X seule	X	Non	33 CCR (score>1) Association avec diminution de l'infiltrat T et augmentation T reg dans CCR		Absence, 3 cas d'expression faible
Song 2013(148)	Etude	404	Abcam HK, China	X	Quantitatif	M et C	NR	NR	NR	« Index d'expression » de 0 à 15.9 (médiane : 2.33)		
Droeser 2013(157)	Etude	1420 1197 MSS 223 MSI	27A2 Ab820 58	X	Intensité	NR	X	X	X	30% des CCR : 37% des CCR MSS, 29% des CCR MSI, Expression inversement corrélée avec statut MSI	2,5% des CCR	Présence
Shi 2013(138)	Etude	143	Abcam 58810	Non	Intensité ++/+++	M et C	X	NR	NR	44,8 % des CCR PD-L1+, sans précision sur la nature des cellules		Absence, 11 % cas péritumorale PD-L1+
Lipson 2013(103)	Essai anti PD-1	1	5H1	Non	NR	M	N	X	X	1 CCR : rares cellules tumorales	1CCR : macrophages et TIL avec TIL PD-1+	
Zhu J. 2014(158)	Etude	101	2H11	Non	NR*	NR *	NR*	NR*	NR*	54,5% des CCR (supposé par CT)		Absence
Zhu H. 2014(139)	Etude	120 Festonnés	Abcam	Non	Grade ≥ 4	C	X	X	Non	25% des CCR		
Zhao 2014(159)	Etude	56 CCR dont 33 rectums	MIH5	Non	Score > 4 : High	M et C	X	X	Non	48,2% CCR : expression forte de PD-L1		8%: muqueuse adjacente faiblement positive
Wu 2014(77)	Etude	49 (T et N+)(18IHC)	27A2	Non	NR (4 grades)	NR	NR	NR	NR	14 CCR avec score >1, sans précision sur la nature des cellules ni seuil		Absence
Herbst 2014(88)	Essai anti PD-L1	14 (1 IHC)	SP142	Non	NR	M	NR	X	X	Pas d'expression	Un CCR score 3 c'est à dire >10% des cellules du stroma	
Gatalica 2014(111)	Etude	60 MSI 27 MSS	AF156	Non	NR	M et C	X	X	Considérées comme témoin	21% de CCR, 13% CCR MSS, 38% de CCR MSI Corrélation MSI et expression		
Taube 2014(55)	Essai anti PD-1	8	5H1	Non	5%	M	X	X	X	1/8 CCR	4/8 CCR	
Le 2015(105)	Essai anti PD-1	11 MSI 21 MSS	NR	Non	5%	M	NR	X	X	3 CCR MSI (10% des cellules tumorales) 0 CCR MSS (+ 1 MSI non CCR) Corrélation MSI et expression	8 CCR MSI, 4 MSI non CCR	
Llosa 2015(131)	Etude	11MSI 14 MSS	5H1	Non	Quantitatif	NR	Non	X	X	Aucun CCR	Cellules myéloïdes, TIL IE et FI : Pas de précision sur nombre	
Friedmann 2016 (132)	Etude	105 Méd 47 PD 22 MSI BD 30 MSS BD	EPR11 61	X	Intensité ++/+++	NR	X	X	X	Méd. : Environ 38% >25% de CT PD-L1+ PD: Environ 35% >25% de CT PD-L1+ MSI BD : Environ 50 % >25% de CT PD-L1+ MSS BD : Environ 38% >25% de CT PD-L1+	Evaluation quantitative, Plus de TIL PD-L1+ dans les médullaires	
Rosenbaum 2016(145)	Etude	181(54MSI) T et M+	E1L3N	X	5%	M	Quelque soit	X	Non	9% CCR (16 cas : 4 MSS et 12 MSI, correspondant à des médullaires)		
Masugi 2016(160)	Etude	823 (793 IHC)	MIH1	X +10 lames	NR 5 scores	M et C	X seule	X (somme C + M)	X (présence, absence)	731 (89%) CCR Expression inversement corrélée avec le statut MSI, et nombre de T reg	44 CCR (5%)	
Kim 2016(144)	Etude	208 MSI	E1L3N	X	5%, Intensité ++/+++	M et C	X	X	X	12,5% des CCR MSI	29,2% des CCR MSI	
Inaguma 2016(54)	Etude	424CCR MSS 82 CCR MSI (478 IHC)	E1L3N	X	5%	NR	NR	X	X	13% des CCR ; 44,7 % des CCR MSI, et 6,8% des MSS, Corrélation MSI et expression	NR	
LH Lee 2016(112)	Etude	394 CCR dont 68 MSI	E1L3N	X	1% CT	M et C	X	X	X	5% CCR :18% CCR MSI et 2% MSS Corrélation MSI et expression	NR	

Tableau 4 : Etudes et essais avec analyse de l'expression de PD-L1 dans les CCR (M et C : membranaire et cytoplasmique, ST : Stroma, CT : cellules tumorales ; N+ et M+ =métastase ganglionnaire et à distance; * = pas de détail, référence citée Sun et al, 2007 dans l'estomac, seuil de 10% pour cellules tumorales (quantitatif) avec marquage C et M.

	Nombre CCR	Etude PD-1	Résultats PD-1	Relation PD-1 et PD-L1	PD-L1 et PD-1 et caractéristiques clinicopathologiques
Hua 2012	102	Oui Cytométrie en flux	PD-1 par les lymphocytes T CD4 et CD8 Foxp3 – et T CD4 CD8 Foxp3+, mais plus importante dans les T CD4 CD8 foxp3 : rôle négatif sur CD8, et augmentation T reg		
Song 2013	404	Non			PD-L1 régulée par IFN γ et PTEN de façon indépendante. PD-L1 : associé avec métastase à distance, TNM, expression de PTEN Quand perte de PTEN : pas de corrélation PD-L1 et clinique (méta, stade, OS)
Droeser 2013	1420	Oui IHC (Clone : NR)	5% CCR MSS avec peu de CD8+ PD-1+	Pas d'expression de PD-1 dans CCR MSS PD-L1+ (Corrélation PD-L1 avec nombreux CD8+)	Univarié : PD-L1 dans CCR MSS associé à : T précoce, absence de N+ et d'invasion vasculaire, tumeur de faible grade.
Shi 2013	143	Non			PD-L1 associé avec TNM et différenciation (tendance) : augmentation de PD-L1 entre bien diff et peu diff, et entre les 1 à 4. Pas d'association avec âge, sexe, localisation, statut N
Lipson 2013	1	Oui IHC (Clone: M3)	CCR répondant au traitement : PD-L1+ par le stroma, avec nombreux CD3+ PD-1+		
Zhu J. 2014	101	Non			Pas de corrélation avec localisation, différenciation, M, N, mucineux, PD-L1 inversement corrélée à l'expression de PTEN
Zhu H. 2014	120 serrated	Non			
Zhao 2014	56 CCR	Non			Association avec T, N. Pas d'association avec âge, sexe, localisation, différenciation - Association avec densité Treg
Wu 2014	49 (T et N+)	Oui Cytométrie (Clone MIH3)	Expression de PD-1 uprégulée par les CD8 à la fois dans tumeurs et N- ; CD8+ PD-1+ produisent cytokines et perforines dans les N- où PD-L1 pas exprimé, mais moins efficaces que T CD8 PD-1+ de la tumeur, où PD-L1 est surexprimé (et dans N+) : Effet régulation négative de PD-1 sur les CD8 dans la tumeur, pas dans N-	Expression de PD-L1 associée à la fonction des CD8 PD-1+ dans la tumeur	
Gatalica 2014	60 MSI 27 MSS	Oui IHC (Clone NAT105)	50% des CCR TIL PD-1+ ; 77% des CCR MSI avec TIL PD-1+ et 39% de CCR MSS avec TIL PD-1+	12% CCR PD-L1+ / TIL PD-1+ 32% MSI, 4 % MSS	Expression de PD-L1 ET PD-1 inversement corrélées avec le stade du CCR
Taube 2014	8	Oui IHC (Clone M3)	Association densité en TIL PD-1 et expression de PD-L par CT e/o ST (divers cancers, pas de détail dans CCR) TIL-PD-1 : association borderline avec réponse clinique		
Llosa 2015	8 MSI, 14 MSS	Oui IHC (Clone : M3) +expression gènes	Gene PD-1 plus exprimé dans CCR MSI (celui PD-L1 dans TIL IE et stroma) Expression de PD-1 plus élevée dans MSI par TIL IE, Stroma, FI		
Friedmann 2016	105 Méd. 47 PD 22 MSI BD 30 MSS BD	Oui IHC (Clone NAT 105) + expression gènes	- Nombre de PD-1 stroma plus élevé dans MSI bien différencié ; TIL IE PD-1 et PD-L1 plus élevés dans médullaires qu'autres groupes -Expression gène PD-L1 uprégulée dans médullaire par rapport aux autres CCR, sf les MSI ; celle de PD-1 uprégulée dans les médullaire par rapport aux autres CCR		Pas de différence d'expression de PD-L1 entre le groupe médullaire et les autres
Rosenbaum 2016	181 (54MSI) T et M	Non			PD-L1 associé à tumeur de plus grande taille, nombre de TIL T-bet+, faible différenciation, nombre de TIL CD8+, phénotype médullaire, statut MSI, mutation BRAF, à moins de mutation KRAS Multivariée : CD8, phénotype médullaire : prédictifs d'expression de PD-L1
Masuyi 2016	823	Oui IHC	Densité en lymphocytes PD-1+ : absent 29%, très faible 24%, faible 18%, intermédiaire 13%, fort 16% CCR		Association inverse avec densité en T reg (indépendamment de facteurs de confusion), MSI, mucine extracellulaire. Pas d'association avec T CD3, CD8 ou CD45RO+ Pas d'association expression par stroma et critères clinicopathologiques et moléculaires.
Kim 2016	208 MSI	Non			PD-L1 par CT : associé à âge avancé, femme, différenciation non mucineuse, tumor budding, stade avancé, CIMP, méthylation promoteur MLH1, mutation BRAF (pas associé aux médullaires) PD-L1 par ST : associé à un infiltrat inflammatoire et réaction « crohn » like, à st de plus précoce, pas au contingent mucineux, ni CIMP, ni hérité
LH Lee 2016		Oui IHC IE et stroma Clone NAT 105	19% CCR avec TIL PD-1 "High" : 50% des MSI, 13% des MSS	Correlation PD-1/PD-L1 Co-expression: 68% CCR PD-L1+ / PD-1+, 98% PD-L1 « low » / TIL « low » PD-1	PD-L1 associé à sexe féminin ; PD-1 à stade plus précoce, et moins de N ; PD-L1 et TIL PD-1 : associé à colon droit, nombreux TIL, infiltrat péri-tumoral, âge plus jeune, et morphologie médullaire (16cas : 6 PD-L1+, 11 PD-1+)

Tableau 5 : Expression dans les CCR de PD-1, relation avec PD-L1, et avec la clinique (IE : intra épithéliaux)

BIBLIOGRAPHIE

1. Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet Lond Engl*. 26 avr 2014;383(9927):1490-502.
2. Institut National Du Cancer - Accueil [Internet]. [cité 29 juin 2016]. Disponible sur: <http://www.e-cancer.fr/>
3. Galon J, Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Berger A, Lagorce C, et al. Towards the introduction of the « Immunoscore » in the classification of malignant tumours. *J Pathol*. janv 2014;232(2):199-209.
4. Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Maby P, Angelova M, Tougeron D, et al. Integrative Analyses of Colorectal Cancer Show Immunoscore Is a Stronger Predictor of Patient Survival Than Microsatellite Instability. *Immunity*. 15 mars 2016;44(3):698-711.
5. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects - Fleming - *Journal of Gastrointestinal Oncology* [Internet]. [cité 3 avr 2016]. Disponible sur: <http://jgo.amegroups.com/article/view/410/html>
6. Compton CC. Pathology report in colon cancer: what is prognostically important? *Dig Dis Basel Switz*. 1999;17(2):67-79.
7. Nagtegaal ID, Huguenin N. The Increasing Relevance of Tumour Histology in Determining Oncological Outcomes in Colorectal Cancer [Internet]. [cité 22 juill 2016]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4550646/>
8. Pyo J-S, Sohn JH, Kang G. Medullary carcinoma in the colorectum: a systematic review and meta-analysis. *Hum Pathol*. juill 2016;53:91-6.
9. Lanza G, Gafà R, Matteuzzi M, Santini A. Medullary-type poorly differentiated adenocarcinoma of the large bowel: a distinct clinicopathologic entity characterized by microsatellite instability and improved survival. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. août 1999;17(8):2429-38.
10. Alexander J, Watanabe T, Wu TT, Rashid A, Li S, Hamilton SR. Histopathological identification of colon cancer with microsatellite instability. *Am J Pathol*. févr 2001;158(2):527-35.
11. Knox R, Luey N, Sioson L. Medullary Colorectal Carcinoma Revisited: A Clinical and Pathological Study of 102 Cases - Springer [Internet]. [cité 29 juin 2016]. Disponible sur: <http://link.springer.com/article/10.1245%2Fs10434-014-4355-5>
12. Hinoi T, Tani M, Lucas PC, Caca K, Dunn RL, Macri E, et al. Loss of CDX2 Expression and Microsatellite Instability Are Prominent Features of Large Cell Minimally Differentiated Carcinomas of the Colon. *Am J Pathol*. déc 2001;159(6):2239-48.
13. Wick MR, Vitsky JL, Ritter JH, Swanson PE, Mills SE. Sporadic medullary carcinoma of the colon: a clinicopathologic comparison with nonhereditary poorly differentiated enteric-type adenocarcinoma and neuroendocrine colorectal carcinoma. *Am J Clin Pathol*. janv 2005;123(1):56-65.

14. Winn B, Tavares R, Fanion J. Differentiating the undifferentiated: immunohistochemical profile of medullary carcinoma of the colon with an emphasis on intestinal differentiation. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 28 juill 2016]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18992917>
15. Fiehn A-MK, Grauslund M, Glenthøj A, Melchior LC, Vainer B, Willemoe GL. Medullary carcinoma of the colon: can the undifferentiated be differentiated? *Virchows Arch Int J Pathol.* janv 2015;466(1):13-20.
16. Ye J, Zhou Y, Weiser MR, Gönen M, Zhang L, Samdani T, et al. Immunohistochemical detection of ARID1A in colorectal carcinoma: loss of staining is associated with sporadic microsatellite unstable tumors with medullary histology and high TNM stage. *Hum Pathol.* déc 2014;45(12):2430-6.
17. Tougeron D. Carcinogénèse colorectale, donnée fondamentales. EMC.
18. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1 juin 1990;61(5):759-67.
19. Gerdes H, Chen Q, Elahi AH, Sircar A, Goldberg E, Winawer D, et al. Recurrent deletions involving chromosomes 1, 5, 17, and 18 in colorectal carcinoma: possible role in biological and clinical behavior of tumors. *Anticancer Res.* févr 1995;15(1):13-24.
20. Issa J-P. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer.* déc 2004;4(12):988-93.
21. Martin A, Scharff MD. AID and mismatch repair in antibody diversification. *Nat Rev Immunol.* août 2002;2(8):605-14.
22. Jascur T, Boland CR. Structure and function of the components of the human DNA mismatch repair system. *Int J Cancer.* 1 nov 2006;119(9):2030-5.
23. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst.* 18 févr 2004;96(4):261-8.
24. Thésaurus national de cancerologie digestive. [cité 25 juill 2016]. Disponible sur: <http://www.tncd.org/>
25. Niedzwiecki D, Bertagnolli MM, Warren RS, Compton CC, Kemeny NE, Benson AB, et al. Documenting the Natural History of Patients With Resected Stage II Adenocarcinoma of the Colon After Random Assignment to Adjuvant Treatment With Edrecolomab or Observation: Results From CALGB 9581. *J Clin Oncol.* 8 oct 2011;29(23):3146-52.
26. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, Thibodeau SN, Labianca R, Hamilton SR, et al. Defective Mismatch Repair As a Predictive Marker for Lack of Efficacy of Fluorouracil-Based Adjuvant Therapy in Colon Cancer. *J Clin Oncol.* 10 juill 2010;28(20):3219-26.
27. Kim ST, Lee J, Park SH, Park JO, Lim HY, Kang WK, et al. Clinical impact of microsatellite instability in colon cancer following adjuvant FOLFOX therapy. *Cancer Chemother Pharmacol.* sept 2010;66(4):659-67.

28. Des Guetz G, Lecaille C, Mariani P, Bennamoun M, Uzzan B, Nicolas P, et al. Prognostic impact of microsatellite instability in colorectal cancer patients treated with adjuvant FOLFOX. *Anticancer Res.* oct 2010;30(10):4297-301.
29. Tougeron D, Mouillet G, Trouilloud I, Lecomte T, Coriat R, Aparicio T, et al. Efficacy of Adjuvant Chemotherapy in Colon Cancer With Microsatellite Instability: A Large Multicenter AGEO Study. *J Natl Cancer Inst.* juill 2016;108(7).
30. Boland CR, Goel A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* juin 2010;138(6):2073-2087.e3.
31. Dudley JC, Lin M-T, Le DT, Eshleman JR. Microsatellite Instability as a Biomarker for PD-1 Blockade. *Am Assoc Cancer Res.* 15 févr 2016;22(4):813-20.
32. Mohan HM, Ryan E, Balasubramanian I, Kennelly R, Geraghty R, Sclafani F, et al. Microsatellite instability is associated with reduced disease specific survival in stage III colon cancer. *Eur J Surg Oncol J Eur Soc Surg Oncol Br Assoc Surg Oncol.* 22 juin 2016;
33. Buckowitz A, Knaebel H-P, Benner A, Bläker H, Gebert J, Kienle P, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer is associated with local lymphocyte infiltration and low frequency of distant metastases. *Br J Cancer.* 9 mai 2005;92(9):1746-53.
34. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med [Internet].* 12 oct 2015 [cité 14 juill 2016];advance online publication. Disponible sur: <http://www.nature.com/nm/journal/vaop/ncurrent/full/nm.3967.html>
35. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science.* 25 mars 2011;331(6024):1565-70.
36. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases — elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol.* avr 2014;27:16-25.
37. Ward JP, Gubin MM, Schreiber RD. The Role of Neoantigens in Naturally Occurring and Therapeutically Induced Immune Responses to Cancer. *Adv Immunol.* 2016;130:25-74.
38. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, et al. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature.* 26 avr 2001;410(6832):1107-11.
39. Desbois M, Champiat S, Chaput N. [Breaking immune tolerance in cancer]. *Bull Cancer (Paris).* janv 2015;102(1):34-52.
40. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science.* 15 janv 2010;327(5963):291-5.
41. Kim JM, Chen DS. Immune escape to PD-L1/PD-1 blockade: seven steps to success (or failure). *Ann Oncol.* 20 mai 2016;mdw217.

42. Chen L, Flies D. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 10 août 2016]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23470321>
43. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*. 1 sept 2008;112(5):1557-69.
44. Rousseau B, Champiat S, Loirat D, Arrondeau J, Lemoine N, Soria J-C. [Immunotherapies and targeted therapies in medical oncology]. *Bull Cancer (Paris)*. 1 janv 2014;101(1):31-9.
45. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*. 25 juill 2013;39(1):1-10.
46. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell*. 13 avr 2015;27(4):450-61.
47. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*. nov 1992;11(11):3887-95.
48. Nishimura H, Agata Y, Kawasaki A, Sato M, Imamura S, Minato N, et al. Developmentally regulated expression of the PD-1 protein on the surface of double-negative(CD4⁻ CD8⁻) thymocytes. *Int Immunol*. 1996;8(5):773-80.
49. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:677-704.
50. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:515-48.
51. Thibult M-L, Mamessier E, Gertner-Dardenne J, Pastor S, Just-Landi S, Xerri L, et al. PD-1 is a novel regulator of human B-cell activation. *Int Immunol*. févr 2013;25(2):129-37.
52. Terme M, Ullrich E, Aymeric L, Meinhardt K, Desbois M, Delahaye N, et al. IL-18 induces PD-1-dependent immunosuppression in cancer. *Cancer Res*. 15 août 2011;71(16):5393-9.
53. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*. août 2002;8(8):793-800.
54. Inaguma S, Wang Z, Lasota J, Sarlomo-Rikala M, McCue PA, Ikeda H, et al. Comprehensive Immunohistochemical Study of Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1): Analysis in 5536 Cases Revealed Consistent Expression in Trophoblastic Tumors. *Am J Surg Pathol*. août 2016;40(8):1133-42.
55. Taube JM, Klein A, Brahmer JR, Xu H, Pan X, Kim JH, et al. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1 oct 2014;20(19):5064-74.
56. Curiel TJ, Wei S, Dong H, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat Med*. mai 2003;9(5):562-7.

57. Saudemont A, Jouy N, Hetuin D, Quesnel B. NK cells that are activated by CXCL10 can kill dormant tumor cells that resist CTL-mediated lysis and can express B7-H1 that stimulates T cells. *Blood*. 15 mars 2005;105(6):2428-35.
58. Thompson RH, Kuntz SM, Leibovich BC, Dong H, Lohse CM, Webster WS, et al. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Res*. 1 avr 2006;66(7):3381-5.
59. Toyokawa G, Takada K, Haratake N, Takamori S, Akamine T, Katsura M, et al. Favorable Disease-free Survival Associated with Programmed Death Ligand 1 Expression in Patients with Surgically Resected Small-cell Lung Cancer. *Anticancer Res*. août 2016;36(8):4329-36.
60. Konishi J, Yamazaki K, Azuma M, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Nishimura M. B7-H1 Expression on Non-Small Cell Lung Cancer Cells and Its Relationship with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Their PD-1 Expression. *Am Assoc Cancer Res*. 1 août 2004;10(15):5094-100.
61. Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med*. 28 mars 2012;4(127):127ra37.
62. Topalian SL, Taube JM, Anders RA, Pardoll DM. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. mai 2016;16(5):275-87.
63. Scheel AH, Ansén S, Schultheis AM, Scheffler M, Fischer RN, Michels S, et al. PD-L1 expression in non-small cell lung cancer: Correlations with genetic alterations. *Oncoimmunology*. mai 2016;5(5):e1131379.
64. Thompson ED, Zahurak M, Murphy A, Cornish T, Cuka N, Abdelfatah E, et al. Patterns of PD-L1 expression and CD8 T cell infiltration in gastric adenocarcinomas and associated immune stroma. *Gut*. 22 janv 2016;
65. Parsa AT, Waldron JS, Panner A, Crane CA, Parney IF, Barry JJ, et al. Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nat Med*. janv 2007;13(1):84-8.
66. Spranger S, Spaapen RM, Zha Y, Williams J, Meng Y, Ha TT, et al. Up-Regulation of PD-L1, IDO, and Tregs in the Melanoma Tumor Microenvironment Is Driven by CD8+ T Cells. *Sci Transl Med*. 28 août 2013;5(200):200ra116.
67. Ostrand-Rosenberg S, Horn LA, Alvarez JA. Novel strategies for inhibiting PD-1 pathway-mediated immune suppression while simultaneously delivering activating signals to tumor-reactive T cells. *Cancer Immunol Immunother* CII. oct 2015;64(10):1287-93.
68. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. avr 2012;12(4):252-64.
69. Rosenwald A, Wright G, Leroy K, Yu X, Gaulard P, Gascoyne RD, et al. Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med*. 15 sept 2003;198(6):851-62.

70. Mo Z, Liu J, Zhang Q, Chen Z, Mei J, Liu L, et al. Expression of PD-1, PD-L1 and PD-L2 is associated with differentiation status and histological type of endometrial cancer. *Oncol Lett.* août 2016;12(2):944-50.
71. Honda T, Egen JG, Lämmermann T, Kastenmüller W, Torabi-Parizi P, Germain RN. Tuning of Antigen Sensitivity by TCRT Cell Receptor-Dependent Negative Feedback Controls T Cell Effector Function in Inflamed Tissues. *Immunity.* 20 févr 2014;40(2):235-47.
72. Dustin ML. How T Cells Lose Their Touch. *Immunity.* 20 févr 2014;40(2):169-71.
73. Ostrand-Rosenberg S, Horn LA, Haile ST. The programmed death-1 immune-suppressive pathway: barrier to antitumor immunity. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 oct 2014;193(8):3835-41.
74. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 Pathway in Tolerance and Autoimmunity. *Immunol Rev.* juill 2010;236:219-42.
75. Ohaegbulam KC, Assal A, Lazar-Molnar E, Yao Y, Zang X. Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. *Trends Mol Med.* janv 2015;21(1):24-33.
76. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *J Exp Med.* 2 oct 2000;192(7):1027-34.
77. Wu X, Zhang H, Xing Q, Cui J, Li J, Li Y, et al. PD-1(+) CD8(+) T cells are exhausted in tumours and functional in draining lymph nodes of colorectal cancer patients. *Br J Cancer.* 23 sept 2014;111(7):1391-9.
78. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature.* 9 févr 2006;439(7077):682-7.
79. Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol.* juin 2008;8(6):467-77.
80. Azuma T, Yao S, Zhu G, Flies AS, Flies SJ, Chen L. B7-H1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells. *Blood.* 1 avr 2008;111(7):3635-43.
81. Hirano F, Kaneko K, Tamura H, Dong H, Wang S, Ichikawa M, et al. Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Res.* 1 févr 2005;65(3):1089-96.
82. Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol.* 2007;8(3):239-45.
83. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med.* 28 juin 2012;366(26):2443-54.
84. McDermott J, Jimeno A. Pembrolizumab: PD-1 inhibition as a therapeutic strategy in cancer. *Drugs Today Barc Spain* 1998. janv 2015;51(1):7-20.

85. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQM, Hwu W-J, Topalian SL, Hwu P, et al. Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *N Engl J Med*. 28 juin 2012;366(26):2455-65.
86. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crinò L, Eberhardt WEE, Poddubskaya E, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 9 juill 2015;373(2):123-35.
87. Hamid O, Robert C, Daud A, Hodi FS, Hwu W-J, Kefford R, et al. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med*. 11 juill 2013;369(2):134-44.
88. Herbst RS, Soria J-C, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*. 27 nov 2014;515(7528):563-7.
89. Robert C, Ribas A, Wolchok JD, Hodi FS, Hamid O, Kefford R, et al. Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *Lancet Lond Engl*. 20 sept 2014;384(9948):1109-17.
90. Powles T, Eder JP, Fine GD, Braithel FS, Loriot Y, Cruz C, et al. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature*. 27 nov 2014;515(7528):558-62.
91. Smyth EC, Cunningham D. Encouraging results for PD-1 inhibition in gastric cancer. *Lancet Oncol*. juin 2016;17(6):682-3.
92. Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, Halwani A, Scott EC, Gutierrez M, et al. PD-1 Blockade with Nivolumab in Relapsed or Refractory Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med*. 22 janv 2015;372(4):311-9.
93. Lipson EJ, Forde PM, Hammers H-J, Emens LA, Taube JM, Topalian SL. Antagonists of PD-1 and PD-L1 in Cancer Treatment. *Semin Oncol*. 1 août 2015;42(4):587-600.
94. Grosso J, Horak CE, Inzunza D, Cardona DM, Simon JS, Gupta AK, et al. Association of tumor PD-L1 expression and immune biomarkers with clinical activity in patients (pts) with advanced solid tumors treated with nivolumab (anti-PD-1; BMS-936558; ONO-4538). *ASCO Meet Abstr*. 20 mai 2013;31(15_suppl):3016.
95. Sunshine J, Taube JM. PD-1/PD-L1 inhibitors. *Curr Opin Pharmacol*. août 2015;23:32-8.
96. Mahoney KM, Rennert PD, Freeman GJ. Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets. *Nat Rev Drug Discov*. août 2015;14(8):561-84.
97. Thompson RH, Dong H, Lohse CM, Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, et al. PD-1 is expressed by tumor-infiltrating immune cells and is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 mars 2007;13(6):1757-61.
98. Nakanishi J, Wada Y, Matsumoto K, Azuma M, Kikuchi K, Ueda S. Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers. *Cancer Immunol Immunother*. 22 déc 2006;56(8):1173-82.

99. Ohigashi Y, Sho M, Yamada Y, Tsurui Y, Hamada K, Ikeda N, et al. Clinical Significance of Programmed Death-1 Ligand-1 and Programmed Death-1 Ligand-2 Expression in Human Esophageal Cancer. *Am Assoc Cancer Res.* 15 avr 2005;11(8):2947-53.
100. Heeren AM, Punt S, Bleeker MC, Gaarenstroom KN, van der Velden J, Kenter GG, et al. Prognostic effect of different PD-L1 expression patterns in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix. *Mod Pathol.* juill 2016;29(7):753-63.
101. Mischinger J, Froehlich E, Griesbacher A, Pummer K, Mannweiler S, Zigeuner R, et al. Prognostic relevance of B7H1 and B7H3 protein expressions in metastatic clear cell renal cell carcinoma. *ASCO Meet Abstr.* 20 mai 2010;28(15_suppl):e15074.
102. Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, Powderly JD, Picus J, Sharfman WH, et al. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 juill 2010;28(19):3167-75.
103. Lipson EJ, Sharfman WH, Drake CG, Wollner I, Taube JM, Anders RA, et al. Durable cancer regression off-treatment and effective reinduction therapy with an anti-PD-1 antibody. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 janv 2013;19(2):462-8.
104. Tabernero J, Powderly JD. Clinical activity, safety and biomarkers of MPDL3280A, an engineered PD-L1 antibody in patients with locally advanced or metastatic colorectal cancer (CRC), gastric cancer (GC), squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) and other tumors. *Poster Asco 2013.*
105. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med.* 25 juin 2015;372(26):2509-20.
106. Bendell JC, Powderly JD. Safety and efficacy of MPDL3280A (anti-PDL1) in combination with bevacizumab (bev) and/or FOLFOX in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC). *J Clin Oncol [Internet].* [cité 8 juill 2016]; Disponible sur: <http://meetinglibrary.asco.org/content/140258-158>
107. NCT02060188 Clinical Trial [Internet]. National Cancer Institute. [cité 14 juill 2016]. Disponible sur: <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/clinical-trials/search/view?cdrid=758063>
108. NCT02460198 Clinical Trial [Internet]. National Cancer Institute. [cité 14 juill 2016]. Disponible sur: <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/clinical-trials/search/view?cdrid=772895>
109. NCT02227667. Evaluate the Efficacy of MEDI4736 in Immunological Subsets of Advanced Colorectal Cancer - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cité 27 juill 2016]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02227667>
110. NCT02563002 Clinical Trial [Internet]. National Cancer Institute. [cité 27 juill 2016]. Disponible sur: <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/clinical-trials/search/view?cdrid=778093>

111. Gatalica Z, Snyder C, Maney T, Ghazalpour A, Holterman DA, Xiao N, et al. Programmed Cell Death 1 (PD-1) and Its Ligand (PD-L1) in Common Cancers and Their Correlation with Molecular Cancer Type. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 12 janv 2014;23(12):2965-70.
112. Lee LH, Cavalcanti MS, Segal NH, Hechtman JF, Weiser MR, Smith JJ, et al. Patterns and prognostic relevance of PD-1 and PD-L1 expression in colorectal carcinoma. *Mod Pathol* [Internet]. 22 juill 2016 [cité 11 août 2016]; Disponible sur: <http://www.nature.com.gate2.inist.fr/modpathol/journal/vaop/ncurrent/full/modpathol2016139a.html>
113. Santhanam S, Alvarado DM, Ciorba MA. Therapeutic targeting of inflammation and tryptophan metabolism in colon and gastrointestinal cancer. *Transl Res.* 1 janv 2016;167(1):67-79.
114. Théate I, Baren N van, Pilotte L, Moulin P, Larrieu P, Renauld J-C, et al. Extensive Profiling of the Expression of the Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 Protein in Normal and Tumoral Human Tissues. *Cancer Immunol Res.* 2 janv 2015;3(2):161-72.
115. Prendergast GC, Smith C, Thomas S, Mandik-Nayak L, Laury-Kleintop L, Metz R, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase pathways of pathogenic inflammation and immune escape in cancer. *Cancer Immunol Immunother Cll.* juill 2014;63(7):721-35.
116. Munn DH, Mellor AL. IDO in the Tumor Microenvironment: Inflammation, Counter-Regulation, and Tolerance. *Trends Immunol.* mars 2016;37(3):193-207.
117. Gao Y-F, Peng R-Q, Li J, Ding Y, Zhang X, Wu X-J, et al. The paradoxical patterns of expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in colon cancer. *J Transl Med.* 2009;7:71.
118. Taylor MW, Feng GS. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* août 1991;5(11):2516-22.
119. Jacquemier J, Bertucci F, Finetti P, Esterni B, Charafe-Jauffret E, Thibult M-L, et al. High expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in the tumour is associated with medullary features and favourable outcome in basal-like breast carcinoma. *Int J Cancer.* 1 janv 2012;130(1):96-104.
120. Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J Clin Invest.* 1 mai 2007;117(5):1147-54.
121. Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener DR, Vacca C, et al. Tryptophan catabolism generates autoimmune-preventive regulatory T cells. *Transpl Immunol.* déc 2006;17(1):58-60.
122. Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science.* 21 août 1998;281(5380):1191-3.
123. Lee GK, Park HJ, Macleod M. Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division [Internet]. [cité 21 août 2016]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1782830/>
124. Moon YW, Hajjar J, Hwu P, Naing A. Targeting the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway in cancer. *J Immunother Cancer.* 2015;3:51.

125. Löb S, Königsrainer A, Rammensee H-G, Opelz G, Terness P. Inhibitors of indoleamine-2,3-dioxygenase for cancer therapy: can we see the wood for the trees? *Nat Rev Cancer*. juin 2009;9(6):445-52.
126. Vacchelli E, Aranda F, Eggermont A, Sautès-Fridman C, Tartour E, Kennedy EP, et al. Trial watch: IDO inhibitors in cancer therapy. *Oncoimmunology* [Internet]. 15 déc 2014 [cité 22 août 2016];3(10). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4292223/>
127. NewLink Genetics Presents Clinical Data for IDO Pathway Inhibitor Indoximod Combinations at American Society of Clinical Oncology (ASCO) Annual Meeting (NASDAQ:NLNK) [Internet]. [cité 22 août 2016]. Disponible sur: <http://investors.linkp.com/releasedetail.cfm?releaseid=974350>
128. Liu X, Shin N, Koblisch HK, Yang G, Wang Q, Wang K, et al. Selective inhibition of IDO1 effectively regulates mediators of antitumor immunity. *Blood*. 29 avr 2010;115(17):3520-30.
129. Ferdinande L, Decaestecker C, Verset L, Mathieu A, Moles Lopez X, Negulescu A-M, et al. Clinicopathological significance of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 expression in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 3 janv 2012;106(1):141-7.
130. Brandacher G, Perathoner A, Ladurner R, Schneeberger S, Obrist P, Winkler C, et al. Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 févr 2006;12(4):1144-51.
131. Llosa NJ, Cruise M, Tam A, Wicks EC, Hechenbleikner EM, Taube JM, et al. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov*. janv 2015;5(1):43-51.
132. Friedman K, Brodsky AS, Lu S, Wood S, Gill AJ, Lombardo K, et al. Medullary carcinoma of the colon: a distinct morphology reveals a distinctive immunoregulatory microenvironment. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. mai 2016;29(5):528-41.
133. Puccetti P, Fallarino F, Italiano A, Soubeyran I, MacGrogan G, Debled M, et al. Accumulation of an Endogenous Tryptophan-Derived Metabolite in Colorectal and Breast Cancers. *PLoS ONE* [Internet]. 16 avr 2015 [cité 29 juin 2016];10(4). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4400104/>
134. Takamatsu M, Hirata A, Ohtaki H, Hoshi M, Ando T, Ito H, et al. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 expression alters immune response in colon tumor microenvironment in mice. *Cancer Sci*. août 2015;106(8):1008-15.
135. Beatty G. Phase I study of the safety, pharmacokinetics (PK), and pharmacodynamics (PD) of the oral inhibitor of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO1) INCB024360 in patients (pts) with advanced malignancies. *J Clin Oncol* [Internet]. [cité 23 août 2016]; Disponible sur: <http://meetinglibrary.asco.org/content/115661-132>
136. Abiko K, Matsumura N, Hamanishi J, Horikawa N, Murakami R, Yamaguchi K, et al. IFN- γ from lymphocytes induces PD-L1 expression and promotes progression of ovarian cancer. *Br J Cancer*. 28 avr 2015;112(9):1501-9.

137. Hua D, Sun J, Mao Y, Chen L-J, Wu Y-Y, Zhang X-G. B7-H1 expression is associated with expansion of regulatory T cells in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol WJG*. 7 mars 2012;18(9):971-8.
138. Shi S-J, Wang L-J, Wang G-D, Guo Z-Y, Wei M, Meng Y-L, et al. B7-H1 expression is associated with poor prognosis in colorectal carcinoma and regulates the proliferation and invasion of HCT116 colorectal cancer cells. *PloS One*. 2013;8(10):e76012.
139. Zhu H, Qin H, Huang Z, Li S, Zhu X, He J, et al. Clinical significance of programmed death ligand-1 (PD-L1) in colorectal serrated adenocarcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(8):9351-9.
140. Dauffenbach LM, Sia GC, Cash PA, Girees SK, Zheng J, Lim RS, et al. Abstract 3396: Optimization of an assay for the detection of PD-L1 by immunohistochemistry in formalin-fixed, paraffin-embedded human tissue and cell lines. *Cancer Res*. 1 août 2015;75(15 Supplement):3396-3396.
141. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer — NEJM [Internet]. [cité 23 août 2016]. Disponible sur: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1507643#t=article>
142. Madore J, Vilain RE, Menzies AM, Kakavand H, Wilmott JS, Hyman J, et al. PD-L1 expression in melanoma shows marked heterogeneity within and between patients: implications for anti-PD-1/PD-L1 clinical trials. *Pigment Cell Melanoma Res*. mai 2015;28(3):245-53.
143. Passiglia F, Bronte G, Bazan V, Natoli C, Rizzo S, Galvano A, et al. PD-L1 expression as predictive biomarker in patients with NSCLC: a pooled analysis. *Oncotarget*. 12 avr 2016;7(15):19738-47.
144. Kim JH, Park HE, Cho N-Y, Lee HS, Kang GH. Characterisation of PD-L1-positive subsets of microsatellite-unstable colorectal cancers. *Br J Cancer* [Internet]. 7 déc 2016 [cité 16 juill 2016]; Disponible sur: <http://www.nature.com.gate2.inist.fr/bjc/journal/vaop/ncurrent/full/bjc2016211a.html>
145. Rosenbaum MW, Bledsoe JR, Morales-Oyarvide V, Huynh TG, Mino-Kenudson M. PD-L1 expression in colorectal cancer is associated with microsatellite instability, BRAF mutation, medullary morphology and cytotoxic tumor-infiltrating lymphocytes. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 20 mai 2016;
146. Maby P, Tougeron D, Hamieh M, Mlecnik B, Kora H, Bindea G, et al. Correlation between Density of CD8+ T-cell Infiltrate in Microsatellite Unstable Colorectal Cancers and Frameshift Mutations: A Rationale for Personalized Immunotherapy. *Cancer Res*. 1 sept 2015;75(17):3446-55.
147. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, et al. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*. 3 avr 2015;348(6230):124-8.
148. Song M, Chen D, Lu B, Wang C, Zhang J, Huang L, et al. PTEN Loss Increases PD-L1 Protein Expression and Affects the Correlation between PD-L1 Expression and Clinical Parameters in Colorectal Cancer. *PLoS ONE* [Internet]. 13 juin 2013 [cité 10 juill 2016];8(6). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3681867/>

149. Patel SP, Kurzrock R. PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Am Assoc Cancer Res.* 1 avr 2015;14(4):847-56.
150. Marzec M, Zhang Q, Goradia A, Raghunath PN, Liu X, Paessler M, et al. Oncogenic kinase NPM/ALK induces through STAT3 expression of immunosuppressive protein CD274 (PD-L1, B7-H1). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 30 déc 2008;105(52):20852-7.
151. Casey SC, Tong L, Li Y, Do R, Walz S, Fitzgerald KN, et al. MYC regulates the antitumor immune response through CD47 and PD-L1. *Science.* 8 avr 2016;352(6282):227-31.
152. Simon S, Vignard V, Florenceau L, Dreno B, Khammari A, Lang F, et al. PD-1 expression conditions T cell avidity within an antigen-specific repertoire. *Oncoimmunology.* 2016;5(1):e1104448.
153. Badoual C, Hans S, Merillon N, Van Ryswick C, Ravel P, Benhamouda N, et al. PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer. *Cancer Res.* 1 janv 2013;73(1):128-38.
154. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. Pillars article: A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell.* 2000. 100: 655-669. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 avr 2015;194(7):2961-75.
155. Housseau F, Llosa NJ. Immune checkpoint blockade in microsatellite instable colorectal cancers: Back to the clinic. *Oncoimmunology.* 3 juin 2015;4(6):e1008858.
156. Brandacher G, Perathoner A, Ladurner R, Schneeberger S, Obrist P, Winkler C, et al. Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 févr 2006;12(4):1144-51.
157. Droeser RA, Hirt C, Viehl CT, Frey DM, Nebiker C, Huber X, et al. Clinical impact of programmed cell death ligand 1 expression in colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 1 juin 2013;49(9):2233-42.
158. Zhu J, Chen L, Zou L, Yang P, Wu R, Mao Y, et al. MiR-20b, -21, and -130b inhibit PTEN expression resulting in B7-H1 over-expression in advanced colorectal cancer. *Hum Immunol.* avr 2014;75(4):348-53.
159. Zhao L, Li C, Zhang R, Xue H, Zhang F, Zhang F, et al. B7-H1 and B7-H4 expression in colorectal carcinoma: correlation with tumor FOXP3(+) regulatory T-cell infiltration. *Acta Histochem.* sept 2014;116(7):1163-8.
160. Masugi Y, Nishihara R, Yang J, Mima K, da Silva A, Shi Y, et al. Tumour CD274 (PD-L1) expression and T cells in colorectal cancer. *Gut.* 5 mai 2016;

Vu, le Président du Jury,
(tampon et signature)

Vu, le Directeur de Thèse,
(tampon et signature)

Vu, le Doyen de la Faculté,
(tampon et signature)

NOM : OTT

PRENOM : EVA

Titre de Thèse :

LES ADENOCARCINOMES COLORECTAUX MSI DE TYPE MEDULLAIRE SE CARACTERISENT PAR UN MICROENVIRONNEMENT IMMUNITAIRE PARTICULIER : UNE CIBLE DE CHOIX POUR LES IMMUNOTHERAPIES VISANT L'AXE PD-1/PD-L1.

RESUME

Les objectifs de l'étude étaient de préciser l'expression de PD-L1 et IDO-1, par les cellules tumorales et le stroma, en immunohistochimie, dans une cohorte de 80 cancers colorectaux (CCR), MSS et MSI (Microsatellite Instability), dont 21 adénocarcinomes médullaires, et de corrélérer cette expression avec la densité en lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL) PD-1 et T-bet+. L'expression de PD-L1 est fréquente, hétérogène, retrouvée dans 62% des CCR, préférentiellement dans les CCR MSI (78%), et dans le sous-type médullaire (90%). Elle est corrélée à un infiltrat riche en TIL PD-1+ et T-bet+. IDO-1 est exprimé dans 40% des CCR quel que soit le statut microsatellitaire. Les CCR MSI, en particulier de sous type médullaire, semblent être une cible pour les immunothérapies bloquant l'axe PD-1/PD-L1, éventuellement en association avec des inhibiteurs d'IDO-1.

MOTS-CLES

ADENOCARCINOME MEDULLAIRE, PD-1, PD-L1, IDO-1, IMMUNOTHERAPIE, CANCER COLO-RECTAL, T-BET, MSI, MSS