

Année 2022

N°: MM212022

## MEMOIRE DE MASTER

MASTER DE «**Biotechnologie Médicale**»

OPTION: «**Biomédicale**»

Intitulé :

**Corrélation entre l'expression de PDL-1 /Statut de réparation des mésappariements de base et l'expression des lymphocytes infiltrant les tumeurs CD4 et CD8 dans l'adénocarcinome colorectal infiltrant**

Soutenu par :

**IMANE EL OUTMADI**

Le 15 Juillet 2022

Devant le jury composé de :

Pr. **OUADGHIRI Mouna**

Pr. **RAIS Hanane**

Pr. **LOUATI Sara**

PES à la FMP de Rabat

PES à la FMP de Marrakech

PES à la FMP de Rabat

Présidente

Encadrante

Examinatrice



## *Avant-propos*

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de fin de formation pour l'obtention du diplôme du 2<sup>ème</sup> cycle universitaire (Master) de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, Université Mohammed V, en Biotechnologie médicale.

Ce travail d'une durée de 4 mois (Mars-Juillet 2022), a été réalisé au service d'anatomie pathologique de l'Hôpital Arrazi au Centre Hospitalier Universitaire Mohammed VI de Marrakech, sous l'encadrement de :

Professeur Hanane RAIS : Professeur de l'enseignement supérieur en Anatomie pathologique et pathologie moléculaire à la Faculté de médecine et de pharmacie de Marrakech, Chef du service d'Anatomie pathologique de l'Hôpital Arrazi et responsable de l'unité de Biopathologie au Centre Hospitalier Universitaire Mohammed VI de Marrakech.

Docteur Souad SELLAMI : Docteur Scientifique responsable de la plateforme d'immunohistochimie et biologie moléculaire au sein du service d'Anatomie Pathologique de l'Hôpital Arrazi au Centre Hospitalier Universitaire Mohammed VI de Marrakech.

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

*Bismillâhi-rahmâni-rahîm*

Au Nom de Dieu le Miséricordieux,  
le Très Miséricordieux

## **DEDICACES**

### ***A mon très cher Père*** **Mr EL OUTMADI ESSAID**

*A mon magnifique père, Je te dédie ce travail en témoignage de tout ce que je ressens pour toi, qu'aucun mot ne le saurait exprimer. Merci pour ton soutien, ton amour et tes encouragements qui ont été pour moi un grand réconfort. Les mots ne sauraient exprimer l'entendu de l'affection que j'ai pour toi papa ainsi que ma gratitude. Tu t'es tant sacrifié pour nous et rien de ce que l'on fera ne te rendra justice. Tu es et tu seras toujours un exemple pour moi .J'en suis très fière d'avoir un père comme toi. En ce jour, j'espère réaliser l'un de tes rêves. Aucune dédicace ne saurait exprimer mes respects, ma reconnaissance et mon profond amour. Puisse Dieu te préserver et te procurer santé et bonheur.*

*Ta fille qui t'aime beaucoup.*

### ***A ma très chère mère*** **Mme MAJID HAFIDA**

*A mon idole : ma maman, source inépuisable de tendresse, de patience et de sacrifice. Je ne trouverai jamais les mots pour traduire tout ce que je ressens envers une mère aussi merveilleuse dont j'ai la fierté d'être la fille. Tu m'as toujours donné de ton temps, de ton énergie, de ta liberté, de ton cœur et de ton amour. Ta droiture, humanisme, sérieux et bonté me serviront d'exemple dans la vie. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours tout au long de ma vie. Quoique je puisse dire et écrire, je ne pourrais exprimer ma grande affection et ma profonde reconnaissance. Ta force et ton courage seront toujours ma plus grande inspiration. Tu étais toujours là à mes côtés pour me réconforter, essuyer mes larmes, soulager mes peines et partager mes joies. En ce jour j'espère réaliser chère mère l'un de tes rêves, sachant que tout ce que je pourrais faire ou dire ne pourrait égaler ce que tu m'as donné. Tu es et resteras à jamais, le soleil qui illumine ma vie.*

*Je t'aime énormément maman.*

*"و قل رب ارحمهما كما ربياني صغيرا"*

***A mes très chères sœurs***

***IBTISSAM ET KENZA***

*Je vous aime énormément et je suis tellement heureuse de vous avoir comme sœurs. Je suis fière de vous. Puisse Dieu vous garder et vous mener vers une vie pleine de joie et de réussite. Je vous souhaite ce qu'il y a de meilleur. Puisse nous rester unis dans la tendresse et fidèles à l'éducation que nous avons reçue. J'implore Dieu qu'il vous apporte tout le bonheur et vous aide à réaliser tous vos rêves.*

***A mes chers tantes et oncles,***

***A mes chers cousines et cousins,***

*J'aurai aimé pouvoir citer chacun par son nom. Merci pour votre soutien, vos encouragements et votre sincère amour.*

***A tous ceux que j'ai omis involontairement de citer.***

***A tous mes enseignants tout au long de mes études.***

## **REMERCIEMENTS**

*En tout premier lieu, je remercie le bon Dieu, tout puissant, de m'avoir donné la force pour poursuivre mon chemin, ainsi que l'audace pour dépasser toutes les difficultés.*

*Ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'intervention, consciente, d'un grand nombre de personnes.*

*Je souhaite adresser mes remerciements,*

***A Pr.IBRAHIMI Azeddine**, Directeur et chef du laboratoire MedBiotech à la Faculté de Médecine et de Pharmacie à Rabat. Nous avons eu la chance de bénéficier de votre expérience, votre sympathie et votre simplicité exemplaire. Que votre sérieux, votre compétence et votre rigueur au travail soient pour nous un exemple à suivre.*

***Au corps pédagogique de notre Master « Biotechnologie Médicale »**, je tiens à vous exprimer mes remerciements les plus sincères.*

***A Madame RAIS Hanane**, Professeur en anatomie pathologie et chef du service d'anatomie pathologie du CHU Mohammed VI. Merci tout d'abord professeur d'avoir accepté de m'encadrer puis pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire d'anatomie pathologique. Votre compétence, votre dynamisme et votre rigueur ont suscité en moi une grande admiration. Veuillez croire, professeur, à l'expression de ma profonde reconnaissance et de mon grand respect.*

***A Docteur ESSELAMI Souad** qui, en toute discrétion, m'a toujours accompagné et ouvert sa porte, afin de répondre à toutes mes questions et m'a soutenu lors des moments de doute. Ainsi, pour le temps qu'elle m'a consacré à la conduite de cette recherche. Vos qualités professionnelles et humaines me servent d'exemple. Veuillez accepter, dans ce travail l'assurance de mon estime et mon profond respect.*

***A Pr.OUADGHIRI Mouna**, coordinatrice du Master. Veuillez trouver ici, chère professeur, ma gratitude et le témoignage de mon respect le plus profond. Je vous remercie chaleureusement pour le temps que vous m'avez consacré et d'avoir accepté de présider le jury.*

***A Pr.LOUATI Sara**, je voudrais exprimer ma plus profonde reconnaissance et remerciements, pour l'intérêt que vous portez à l'égard de ce travail et d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

## Résumé

**Contexte :** L'adénocarcinome colorectal représente un problème sanitaire mondial. C'est le troisième cancer le plus fréquent dans le monde après le cancer du poumon et le cancer du sein. L'expression du PD-L1 par les cellules tumorales régule négativement la fonction et la persistance des LT, ce qui induit une anergie et une régression de ces lymphocytes. Le développement des anti-checkpoints immunitaires a permis d'améliorer les traitements des cancers aux stades avancés avec moins d'effets indésirables. Cependant, dans l'adénocarcinome colorectal, il manque des études fournissant des analyses détaillées de la protéine PDL1 et des lymphocytes infiltrant les tumeurs. Nous avons essayé à travers ce travail d'étudier la corrélation entre l'expression du PD-L1 et le profil MMR ainsi que l'expression des LT CD8 et CD4 dans l'adénocarcinome colorectal.

**Matériel et méthodes :** Cette étude prospective descriptive a été réalisée au service d'anatomie pathologique du CHU Mohammed VI de Marrakech sur 30 cas d'adénocarcinome colorectal. Les protéines MMR, PDL-1, CD8 et CD4 ont fait l'objet de l'étude immunohistochimique réalisée sur des coupes de tissus fixés au formol et inclus en paraffine.

**Résultats et discussion :** L'expression du PD-L1 a été détectée dans 56,6% des cas étudiés. Le statut dMMR n'était présent que dans deux cas d'adénocarcinome colorectal, qui présentaient une faible expression du PD-L1 mais le rôle prédictif du statut MMR n'est pas assez justificatif étant donné le nombre limité de cas. Dans notre étude aucune corrélation n'a été observée entre l'expression du PD-L1 et CD8 /CD4. Les études ont montré que la combinaison de l'évaluation de CD8 + et de PD-L1 semble être plus efficace que celle de CD8 + ou PD-L1 seule en tant que marqueur prédictif de la réponse aux inhibiteurs des check points immunitaires.

**Conclusion:** Combiner PD-L1 et statut MMR ou LT CD8+ peut constituer un biomarqueur prédictif plus utile dans l'adénocarcinome colorectal que le PD-L1 seul. Ce point mérite une étude approfondie avec une large cohorte.

**Mots-clés :** Adénocarcinome colorectal, CD4, CD8, Immunohistochimie, Immunothérapie, PDL1, PD1, TILs, MMR.



## *Abstract*

**Background:** Colorectal adenocarcinoma is a global health problem. It is the third most common cancer in the world after lung cancer and breast cancer. PD-L1 expression by tumor cells negatively regulates the function and persistence of T cells, which induces anergy, and regression of these lymphocytes. The development of anti-immune checkpoints has made it possible to improve the treatment of advanced-stage cancers with fewer adverse effects. However, in colorectal adenocarcinoma, studies providing detailed analyzes of the PDL1 protein and tumor-infiltrating lymphocytes are lacking. We have tried through this work to study the correlation between the expression of PD-L1 and the MMR status as well as the expression of LT CD8 and CD4 in colorectal adenocarcinoma.

**Material and methods:** This descriptive prospective study was carried out in the pathological anatomy service of the CHU Mohammed VI in Marrakech on 30 cases of colorectal adenocarcinoma. The MMR, PDL-1, CD8 and CD4 proteins were the subject of the immunohistochemical study performed on formalin-fixed and paraffin-embedded tissue sections.

**Results and discussion:** The expression of PD-L1 was detected in 56.6% of the cases studied. The dMMR status was present in only two cases of colorectal adenocarcinoma, which had low PD-L1 expression but the predictive role of MMR status is not strong enough given the limited number of cases. In our study, no correlation was observed between the expression of PD-L1 and CD8/CD4. Studies have shown that the combination of CD8+ and PD-L1 assessment appears to be more effective than either CD8+ or PD-L1 alone as a predictive marker of response to immune checkpoint inhibitors.

**Conclusion and perspectives:** Combining PD-L1 and MMR or CD8+ T cell status may be a more useful predictive biomarker in colorectal adenocarcinoma than PD-L1 alone. This point deserves an in-depth study with a large cohort.

**Keywords:** Colorectal adenocarcinoma, CD4, CD8, Immunohistochemistry, Immunotherapy, PDL1, PD1, TILs, MMR.

## ملخص

**السياق:** يمثل سرطان القولون والمستقيم مشكلة صحية عالمية، فهو ثالث أكثر أنواع السرطانات شيوعًا في العالم بعد سرطان الرئة وسرطان الثدي. تعبير الخلايا السرطانية عن PD-L1 ينظم بشكل سلبي وظيفة واستمرار LT، مما يؤدي إلى الحساسية والانحدار لهذه الخلايا الليمفاوية. لقد أتاح تطوير نقاط التفتيش المضادة للمناعة تحسين علاج السرطانات في مراحل متقدمة مع تأثيرات ضارة أقل. ومع ذلك، في سرطان القولون والمستقيم، تفتقر الدراسات التي تقدم تحليلات مفصلة لبروتين PDL1 والخلايا الليمفاوية المتسللة إلى الورم. لقد حاولنا من خلال هذا العمل دراسة العلاقة بين التعبير عن PD-L1 وحالة MMR وكذلك CD4/CD8 LT في سرطان القولون والمستقيم.

**المواد والطرق:** أجريت هذه الدراسة الوصفية المستقبلية في مختبر التشريح المرضي في المركز الاستشفائي الجامعي محمد السادس بمراكش على 30 حالة من حالات سرطان القولون والمستقيم. كانت بروتينات MMR و PD-L1 و CD8 و CD4 موضوع الدراسة الصبغة النسيجية المناعية و التي تم إجراؤها على أقسام الأنسجة الثابتة بالفورمالين والمدمجة بالبارافين.

**النتائج والمناقشة:** تم الكشف عن تعبير PD-L1 في 56.6% من الحالات المدروسة. كانت حالة dMMR موجودة في حالتين فقط من حالات سرطان القولون والمستقيم، والتي كان لها تعبير منخفض عن PD-L1 ولكن الدور التنبئي لحالة MMR ليس قويًا بما يكفي نظرًا للعدد المحدود من الحالات. في دراستنا، لم يلاحظ أي ارتباط بين التعبير عن PD-L1 و CD8 / CD4. أظهرت الدراسات أن الجمع بين تقييم CD8 + و PD-L1 يبدو أكثر فعالية من CD8 + أو PD-L1 وحده كعلامة تنبؤية للاستجابة لمثبطات نقطة التفتيش المناعية.

**الخلاصة ووجهات النظر:** قد يكون الجمع بين حالة PD-L1 و MMR أو CD8 + LT علامة حيوية تنبؤية أكثر فائدة في سرطان القولون والمستقيم من PD-L1 وحده. هذه النقطة تستحق دراسة متعمقة مع مجموعة كبيرة.

**الكلمات المفتاحية:** سرطان غدي القولون والمستقيم، CD4، CD8، الكيمياء الهيستولوجية المناعية، العلاج المناعي.

MMR ؛ TILs ؛ PD1 ؛ PDL1

## Liste des figures

|   |    |
|---|----|
| Figure 1 : Anatomie du gros intestin.....   | 4  |
| Figure 2 : Histologie de la paroi du colon.....   | 5  |
| Figure 3 : Schéma thérapeutique des cancers colorectaux de stade II.....  | 10 |
| Figure 4 : Schéma thérapeutique des cancers colorectaux métastatiques.....  | 10 |
| Figure 5 : Le couple PD-1/PD-L1 et l'échappement immunitaire anti-tumoral.....  | 11 |
| Figure 6 : Expression du couple PDL1/PD1 dans différents types cellulaires.....   | 13 |
| Figure 7 : Immuno-échappement des cellules tumorales.....   | 14 |
| Figure 8 : Le couple PD-1/PD-L1 et l'approche anti-PD-1 / PD-L1.....  | 16 |
| Figure 9 : Mode d'action des anti-PD-1/PD-L1.....   | 16 |
| Figure 10 : Processus de réalisation du diagnostic anatomie pathologique.....   | 21 |
| Figure 11 : Automate de circulation.....  | 22 |
| Figure 12 : Unité d'enrobage.....   | 23 |
| Figure 13 : Réalisation des coupes au microtome.....  | 23 |
| Figure 14 : Automate AutoStainer.....   | 24 |
| Figure 15 : Étapes de sélection tumorale et préparation des TMAs.....   | 25 |
| Figure 16 : Lames blanches pour immunohistochimie.....  | 27 |
| Figure 17 : Appareil d'immunohistochimie Dako OMNIS.....  | 27 |
| Figure 18 : Etuve « BINDER ».....   | 28 |
| Figure 19 : Anticorps pour le marquage des protéines MMR.....   | 29 |
| Figure 20 : Anticorps anti CD4 et anti CD8 pour marquage des TILs.....  | 30 |
| Figure 21 : Anticorps pour marquage de PDL1.....  | 32 |
| Figure 22 : Contre coloration des lames.....  | 32 |
| Figure 23 : Etapes de l'étude immunohistochimique réalisée au sein du service d'anatomie pathologique, CHU Marrakech.....       | 36 |
| Figure 24 : Répartition des patients en fonction de l'âge.....  | 38 |
| Figure 25 : Répartition des patients en fonction du sexe.....   | 39 |
| Figure 26 : Répartition de la différenciation d'adénocarcinome colorectal.....  | 39 |
| Figure 27 : Répartition des cas en fonction du profil MMR.....  | 40 |
| Figure 28 : Exemple de marquage immunohistochimique des protéines MMR d'un des deux cas du CCR avec profil dMMR(IHCx100).....   | 41 |
| Figure 29 : Exemple de marquage immunohistochimique des protéines MMR d'un des cas du CCR avec profil pMMR(IHCx40,IHCx200)..... | 41 |
| Figure 30 : Exemple de marquage immunohistochimique des CD4 et CD8 d'un des cas du CCR (IHCx200).....                           | 43 |
| Figure 31 : Résultats de l'expression de la protéine PDL1.....  | 44 |
| Figure 32 : Exemple de marquage immunohistochimique de PDL1 de quelques cas du CCR (IHCx200 et IHCx100).....                    | 45 |

## *Liste des tableaux*

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Tableau 1  | : Caractéristiques des patients.....  | 20 |
| Tableau 2  | : Marqueurs des TILs.....   | 30 |
| Tableau 3  | : Marqueurs des protéines MMR.....  | 31 |
| Tableau 4  | : Marqueur de la protéine PDL1.....   | 31 |
| Tableau 5  | : Protocole d'immunohistochimie pour la révélation des protéines utilisées..... | 33 |
| Tableau 6  | : Données des cas dMMR.....   | 41 |
| Tableau 7  | : Expression des TILs CD4 et CD8.....   | 42 |
| Tableau 8  | : Expression de PDL1 dans la population étudiée.....                            | 44 |
| Tableau 9  | : Corrélation entre profil MMR , PDL1 et TILs CD4 /CD8.....                     | 46 |
| Tableau 10 | : Résultats de l'étude et les caractéristiques cliniques des patients.....      | 55 |

## *Liste d'abréviations*

|       |  |
|-------|--|
| ADN   | : Acide désoxyribonucléique .                |
| Ac    | : Anticorps.                                 |
| CCR   | : Cancer colorectal.                         |
| CHU   | : Centre hospitalier universitaire.          |
| CMH   | : Complexe majeur d'histocompatibilité       |
| CPAs  | : Cellules présentatrices d'antigènes        |
| CTL   | : Lymphocyte T cytotoxique                   |
| dMMR  | : Deficient MMR                              |
| FasL  | : Fas ligand                                 |
| FFPE  | : Fixés au formol et inclus en paraffine     |
| HE    | : Hématoxyline et l'éosine                   |
| HNPCC | :Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer) |
| IHC   | : Immunohistochimie                          |
| ICI   | : Immune checkpoint inhibitors               |
| LT    | : Lymphocyte T                               |
| MICA  | : MHC class I polypeptide-related sequence A |
| MICB  | : MHC class I polypeptide-related sequence B |
| MLH1  | : MutL Homolog 1                             |
| MMR   | : Mismatch repair                            |
| MSS   | : Microsatellites stables                    |
| MSI   | : Microsatellites instables                  |
| MSH2  | : MutS Homolog 2                             |
| MSH6  | : MutS Homolog 6                             |
| NK    | : Natural Killer                             |
| OMS   | : Organisation mondiale de santé             |
| PD1   | : Programmed Death protein 1                 |
| PDL1  | : Programmed death-ligand 1                  |
| pMMR  | : Proficient MMR                             |
| PMS2  | : Postmeiotic Segregation Increased 2        |
| RER   | :Replication ERror                           |
| TCR   | : T-cell Receptor                            |
| TILs  | : Lymphocytes infiltrant les tumeurs         |
| TMA   | : Tissus micro-array                         |
| TNM   | : tumor , nodes , and metastases             |
| Tregs | : Lymphocytes T régulateurs                  |
| ULBPs | : UL16 binding protein                       |

# Table des matières

|  |    |
|--|----|
| A. Introduction.....   | 1  |
| Revue bibliographique.....                                   | 3  |
| I. Cancer colorectal.....                                    | 3  |
| 1. Epidémiologie et étiologie.....                           | 3  |
| 2. Anatomie et histologie du colon.....                      | 4  |
| 3. Diagnostic et traitement du cancer colorectal.....        | 6  |
| II. Evaluation du statut MMR.....                            | 7  |
| 1. Mécanisme de réparation des mésappariements de l'ADN..... | 8  |
| 2. Statut MMR et phénotype MSI.....                          | 8  |
| III. Expression de la protéine PDL-1.....                    | 11 |
| 1. Protéine PDL-1 « B7-H1 ».....                             | 11 |
| 2. Expression de PDL-1.....                                  | 12 |
| IV. Immunothérapie.....                                      | 13 |
| 1. Immuno-échappement des cellules tumorales.....            | 13 |
| 2. Immunothérapie anti-checkpoints.....                      | 15 |
| V. Objectif et but de l'étude.....                           | 17 |
| B. Matériels et méthodes.....                                | 18 |
| I. Population d'études.....                                  | 19 |
| 1. Type et durée d'étude.....                                | 19 |
| 2. Critères d'inclusion.....                                 | 19 |
| 3. Critères d'exclusion.....                                 | 19 |
| 4. Sources de données.....                                   | 19 |
| 5. Paramètres recueillis.....                                | 20 |
| 6. Méthodes d'analyse des données.....                       | 20 |

|      |   |    |
|------|---|----|
| II.  | Méthodes et matériels d'études.....   | 21 |
| 1.   | Circuit du prélèvement tissulaire destiné à l'étude.....                              | 21 |
| 1.1. | La fixation.....  | 22 |
| 1.2. | L'enrobage.....   | 22 |
| 1.3. | Microtomie et coloration des lames.....   | 23 |
| 2.   | Préparation des Tissus Micro-Array « TMA ».....                                       | 24 |
| 3.   | Etude immunohistochimique.....  | 26 |
| 3.1. | Protocole IHC pour le marquage des TILs CD4 et CD8.....                               | 29 |
| 3.2. | Protocole IHC pour le marquage des protéines MMR.....                                 | 30 |
| 3.3. | Protocole IHC pour le marquage de PDL-1.....  | 31 |
| C.   | Résultats.....  | 37 |
| I.   | Données démographiques des cas étudiés.....   | 38 |
| 1.   | Age.....  | 38 |
| 2.   | Sexe.....   | 38 |
| 3.   | Différenciation tumorale.....   | 39 |
| II.  | Résultats de l'étude immunohistochimique.....   | 40 |
| 1.   | Résultats de l'expression des protéines MMR.....                                      | 40 |
| 2.   | Résultats de l'expression des TILs CD4 et CD8.....                                    | 42 |
| 3.   | Résultats de l'expression de la protéine PDL-1.....                                   | 43 |
| III. | Résultats de l'analyse de la corrélation de PDL-1 avec les différentes protéines..... | 45 |
| 1.   | PDL-1 et protéines MMR.....   | 45 |
| 2.   | PDL-1 et TILs CD4 /CD8.....   | 46 |
| D.   | Discussion.....   | 47 |
| E.   | Conclusion et perspectives.....   | 51 |
| F.   | Références bibliographiques.....  | 56 |



# **INTRODUCTION**



Selon l'OMS : l'adénocarcinome colorectal est une tumeur épithéliale maligne développée au dépend du gros intestin et présentant une différenciation glandulaire ou mucineuse. <sup>[1]</sup>

Le cancer colorectal « CCR » représente un problème sanitaire mondial <sup>[2]</sup>. C'est le troisième cancer le plus fréquent dans le monde après le cancer du poumon et le cancer du sein, et la quatrième cause de décès et son incidence continue à augmenter chaque année. <sup>[3]</sup>

En 2020, plus de 1,9 million de personnes ont été nouvellement diagnostiquées avec un CCR et environ 935 000 personnes sont décédées du CCR en France. <sup>[4]</sup>

Dans 80 % des cas, les cancers du côlon se développent à partir d'une tumeur bénigne, c'est-à-dire non cancéreuse, appelée adénome ou polype adénomateux.

Le diagnostic positif des adénocarcinomes colorectaux, est basé essentiellement sur la coloscopie avec l'étude anatomopathologique. Le traitement de première ligne du cancer du côlon implique une chirurgie et éventuellement une chimiothérapie adjuvante. <sup>[3]</sup>

Environ 15 % des cancers colorectaux (CCR) présentent un défaut du système de réparation de bases qui entraîne des non-réparations des erreurs de l'ADN polymérase se traduisant par un phénotype microsatellite instable (MSI). Cela est à cause d'une altération du système Mismatch Repair (MMR). Les tumeurs ayant le phénotype MSI sont déficientes pour le système MMR (dMMR) ; les autres tumeurs sont proficientes pour le système MMR (pMMR) et présentent un phénotype microsatellite stable (MSS). <sup>[5]</sup>

Plusieurs études ont montré que les patients avec une tumeur dMMR avaient un meilleur pronostic que les patients avec une tumeur à microsatellites stables pMMR. <sup>[6]</sup>

Ces dernières années, des fonctionnalités additives axées sur le microenvironnement tumoral ont attiré une attention croissante car ils ont montré un potentiel pour prédire le pronostic ou la réponse à la thérapie ou même servir de cibles thérapeutiques. <sup>[7-8]</sup> De plus, les lymphocytes infiltrant les tumeurs « TILs » font également un objet de recherche populaire dans divers cancers et l'augmentation de leur expression dans le CCR est un prédicteur indépendant de meilleur pronostic. <sup>[9]</sup>

De nos jours, l'immunothérapie anticancéreuse a révolutionné le traitement du cancer et représente une avancée majeure dans les méthodes de traitement actuelles. La réponse immunitaire anti-tumorale, principalement adaptative, repose sur l'activation des lymphocytes T-CD8 cytotoxiques (CTL) à travers la reconnaissance de néoantigènes exprimés à la surface des cellules tumorales. <sup>[10]</sup>

La protéine de mort cellulaire programmée 1 (PD-1, Programmed Death 1) et son ligand (PD-L1, Programmed Death-Ligand 1) sont des suppresseurs clés de la réponse immunitaire cytotoxique. <sup>[11]</sup>

La protéine PD-L1 (Programmed Death Ligand-1) est une protéine transmembranaire exprimée à la surface des cellules tumorales ainsi qu'à la surface d'un grand nombre de cellules immunosuppressives du micro-environnement tumoral (lymphocytes T CD4 et CD8, régulateurs, B, cellules NK, cellules dendritiques et monocytes). Elle est capable de se lier au récepteur de mort cellulaire programmée (PD-1 ou Programmed Death Receptor 1) exprimé à la surface des lymphocytes. Ainsi, il est admis que l'expression tumorale de PD-L1 constitue un mécanisme d'échappement majeur des cancers à la réponse immunitaire adaptative antitumorale. <sup>[10]</sup> Ces dernières années, PD-L1 et PD-1 ont fait l'objet d'un examen méticuleux en tant que cibles potentielles pour le traitement du cancer.

L'expression de PD-L1 est régulée positivement dans le cancer du poumon <sup>[12]</sup>, le cancer du sein <sup>[13]</sup>, le cancer du pancréas <sup>[14]</sup>, le carcinome hépatocellulaire <sup>[15]</sup>, le mélanome <sup>[16]</sup> et d'autres tissus. Il y a actuellement un manque de recherche systématique sur le cancer colorectal.

Par conséquent, cette étude a recueilli 30 échantillons tissulaire de patients présentant un CCR, dans le but d'évaluer l'expression de PDL1 en corrélation avec le profil MMR et l'expression des lymphocytes infiltrant les tumeurs « TILs » CD4 et CD8 dans le stroma par une étude immunohistochimique.

## **I. Cancer colorectal :**

### **1. Epidémiologie et étiologie :**

Les cancers du côlon sont des tumeurs qui naissent à partir de la prolifération d'un clone de cellules de l'épithélium et représente environ 15 % de l'ensemble des cancers. Le cancer colorectal atteint le gros intestin ou le rectum .Ils touchent plus fréquemment le sexe masculin que le sexe féminin et affecte le côlon, dans 60 % des cas et, dans 40 % des cas, le rectum. <sup>[17]</sup> L'adénocarcinome est la forme la plus fréquente des cancers touchant le côlon et le rectum (95 %).

Selon une étude réalisée à l'Institut National d'Oncologie à Rabat, le Cancer colorectal occuperait la première place parmi les cancers gastro-intestinaux au Maroc (40,3%). L'incidence du CCR a augmenté au cours de la dernière décennie dans les pays développés, mais les données épidémiologiques ne sont pas disponibles pour le Maroc en raison de l'absence d'un registre national du cancer. <sup>[18]</sup>

Les cancers colorectaux sont sporadiques dans 80 % des cas, et 20% sont liés à une prédisposition génétique.

Son incidence varie d'un pays à l'autre du fait des différences dans le mode de vie des populations, le type d'alimentation et la prédisposition héréditaire. Les principaux facteurs de risque du cancer colorectal sont l'âge (plus de 40ans), les maladies inflammatoires de l'intestin, un antécédent personnel ou familial d'adénome ou de cancer colorectal, une prédisposition génétique, la consommation excessive de viande rouge, de charcuterie ou d'alcool, le tabagisme ainsi que l'obésité. <sup>[19]</sup>

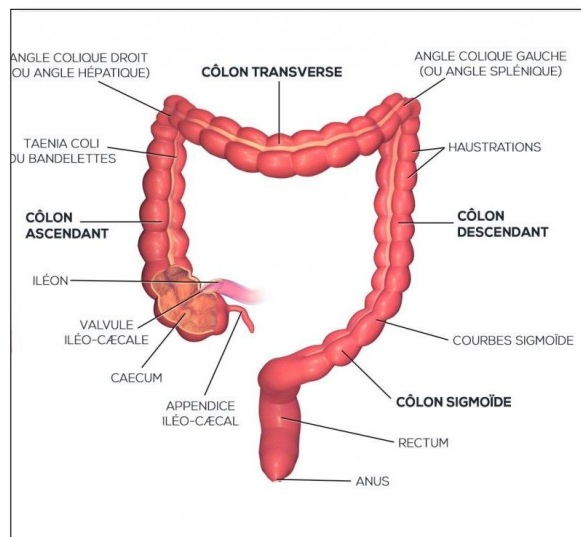
## 2. Anatomie et histologie du colon :

### ○ Anatomie du colon:

Le côlon est la partie du tractus digestif située entre l'intestin grêle et le rectum, il forme avec le caecum le gros intestin.

Le côlon a pour fonctions principales d'absorber l'eau et le sel des aliments et de fabriquer les matières fécales et de les acheminer vers le rectum.

Il mesure en moyenne chez l'adulte 1,5 mètres de longueur, un diamètre de 8 cm et subdivisé en quatre segments se faisant suite : le colon droit ou colon ascendant, le colon transverse, le colon gauche appelé aussi le colon descendant puis le colon sigmoïde. [20]



*Figure 1 : Anatomie du gros intestin. [20]*

### ○ Histologie du colon:

En microscopie optique, la paroi du côlon est formée de cinq couches différentes : La muqueuse, la musculaire muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse. [21]

L'adénocarcinome prend naissance dans les cellules qui produisent du mucus « cellules glandulaires » le long du revêtement interne du côlon ou du rectum, c'est-à-dire la muqueuse. On parle d'adénocarcinome colorectal infiltrant lorsque les cellules tumorales dépassent la musculaire muqueuse. Pour déterminer le stade du cancer, les médecins s'appuient le plus souvent sur un système international de classification appelé TNM (Tumor, Node, Mestastasis).

- T : profondeur de la tumeur dans la paroi du colon ou du rectum.
- N : présence ou absence de cellules tumorales dans les ganglions lymphatiques.
- M : présence ou absence de métastases dans d'autres organes.

Il existe 5 stades d'évolution du cancer colorectal :

- le stade 0 qui correspond à une tumeur dite *in situ*, le cancer est seulement à la surface de la paroi du colon ou du rectum.
- le stade 1 qui correspond à une tumeur de petite taille, le cancer pénètre dans la paroi mais il ne l'a pas traversée d'un bord à l'autre.
- le stade 2 qui correspond à un volume local plus important, le cancer traverse complètement la paroi du colon ou du rectum.
- le stade 3 qui correspond à un envahissement des ganglions lymphatiques ou des tissus avoisinants.
- le stade 4 qui correspond à une extension plus large dans d'autres organes. Ce sont des métastases. [22]

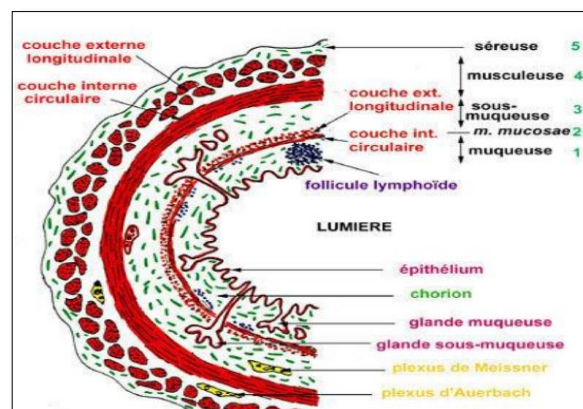


Figure 2 : Histologie de la paroi du côlon.<sup>[23]</sup>

### 3. Diagnostic et traitement du cancer colorectal :

Dans 80 % des cas, les cancers colorectaux se développent à partir d'une tumeur bénigne. Elle est appelée polype adénomateux ou adénome. Ces adénomes sont très fréquentes et restent généralement sans gravité, mais 2 à 3 % d'entre elles se développent, grossissent et finissent par se transformer en cancer.

Un certain nombre d'examen doivent être effectués pour confirmer le diagnostic de cancer du côlon et en évaluer le stade. L'ensemble de ces examens sont appelés : bilan diagnostique. Il comporte :

- ✓ Le bilan initial, qui a pour but de confirmer la présence d'un cancer, de le localiser et de définir de quel type de cancer il s'agit.
- ✓ Le bilan d'extension, qui a pour objectif de compléter le diagnostic. Il consiste à évaluer l'étendue et la propagation du cancer. C'est ce qui permet de définir le stade du cancer. <sup>[22]</sup>

Lorsqu'un médecin suspecte la présence d'un CCR (par exemple après un test révélant la présence de traces de sang dans les selles), il prescrit un examen endoscopique du rectum et du côlon : la coloscopie. La coloscopie consiste à visualiser la paroi du colon et du rectum à l'aide d'une sonde endoscopique souple, un ensemble de fibres optiques capables d'éclairer et de filmer ces organes qui est introduit par l'anus du patient. Cet examen se fait sous anesthésie générale et nécessite que le côlon soit vidé de son contenu.

Le traitement dépend essentiellement du siège de la tumeur et de la classification TNM fournis par l'anatomo-pathologiste et de l'état général du patient.

Différentes modalités de traitement du cancer colorectal peuvent être utilisées à tour de rôle ou en association. Les plus utilisées (standard), à travers le monde, sont les suivantes :

- **La chirurgie** représente le principal traitement des cancers colorectaux. L'intervention consiste à retirer le segment du côlon concerné.
- **La radiothérapie** est principalement utilisée dans le cancer du rectum. Elle survient généralement avant la chirurgie et est souvent associée à une chimiothérapie. Elle a principalement pour objectif de diminuer le risque de récurrence locale.

- Après la chirurgie, **une chimiothérapie** complémentaire peut être proposée si la tumeur a envahi les ganglions de voisinage. Ce traitement consiste à administrer par voie orale ou veineuse des médicaments dans le but de réduire ou stabiliser la tumeur. Le médicament de référence est le 5-fluorouracile ou 5FU.
- **Les thérapies ciblées** sont des médicaments anticancéreux qui bloquent un mécanisme précis de la cellule tumorale. [24]

## II. Evaluation du statut MMR :

Dans le cancer colorectal, une anomalie moléculaire se révèle être d'un intérêt important à la fois pour le choix de certains traitements, l'orientation vers un apaisement thérapeutique ou encore l'amélioration du suivi des patients à risque, il s'agit du phénotype MSI qui représente environ 15 % des CCR. L'instabilité des séquences répétées en tandem du génome, nommées microsatellites, est une conséquence de l'inactivation fonctionnelle d'un système de réparation des erreurs produites au cours de la réplication de l'ADN, c'est le système MMR (*mismatch repair*). Elle signe un phénotype tumoral fréquent appelé MSI, qui a été mis en évidence il y a un peu plus de 20 ans. [25] L'origine de ce déficit est soit somatique (cas le plus fréquent, environ 80% des CCR MSI), soit héréditaire dans le cadre du syndrome HNPCC (Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer) également appelé syndrome de Lynch. En effet, le syndrome HNPCC est lié à une mutation constitutionnelle d'un des gènes codant pour des protéines (MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2) impliquées dans la réparation des erreurs de mésappariements de l'ADN (protéines du système MMR). Lors d'un dysfonctionnement de ce système, l'accumulation des anomalies entraîne une instabilité du génome, en particulier au niveau des microsatellites.

## **1 . Mécanisme de réparation des mésappariements de l'ADN :**

Il est aujourd'hui admis, que la préservation de l'intégrité du génome n'est possible que grâce à l'existence de systèmes multiples intervenant dans des processus complexes de réplication, de réparation et de recombinaison de la molécule d'ADN. Pour prévenir de tels effets délétères et préserver l'intégrité du génome, les cellules possèdent de multiples mécanismes pour réparer les dommages causés à l'ADN et ainsi prévenir les mutations. Le système de réparation des erreurs de réplication de l'ADN (système MMR, mismatch repair), indispensable à la cellule, en est une illustration.

Les mésappariements d'ADN susceptibles d'être réparés par le système MMR sont, dans la plupart des cas, la conséquence d'erreurs commises par l'ADN polymérase lors du processus de réplication. <sup>[26]</sup>L'existence d'un processus MMR post-réplicatif permet d'augmenter la fidélité de la réplication.

L'instabilité microsatellitaire est la conséquence d'une défaillance du système de réparation des mésappariements de l'ADN qui surviennent au cours de la réplication : c'est le système MMR, dont les principaux gènes codants sont les gènes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* et *PMS2*. Lorsque le système MMR ne fonctionne plus, les mutations s'accumulent dans le génome qui devient « hypermuté ».

La réparation d'un mésappariement se fait généralement en trois étapes :

- a) La détection des lésions ou du mésappariement,
- b) La reconnaissance et le clivage du brin lésé,
- c) La reconstitution de l'intégrité de l'ADN par ligation et resynthèse. <sup>[27]</sup>

## **2 . Statut MMR et phénotype MSI :**

Il existe plusieurs méthodes de détection d'un phénotype MSI: la biologie moléculaire, le séquençage à haut débit, mais la méthode la plus simple et la plus utilisée, est l'immunohistochimie.



La biologie moléculaire et l'immunohistochimie sont équivalentes pour le dépistage de ce statut dans le cancer colorectal. En revanche, il n'y a pas de recommandation dans d'autres sites tumoraux.

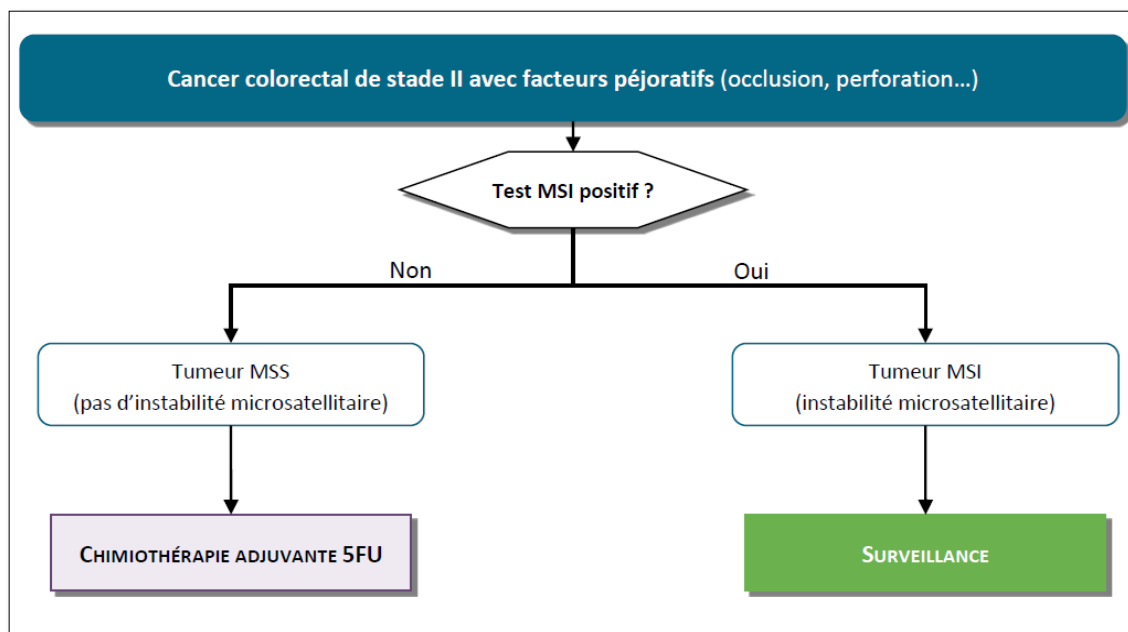
Le système MMR est constitué principalement de 4 protéines: MLH1, MSH2, PMS2 et MSH6. Celles-ci fonctionnent en tandem (MLH1-PMS2 et MSH2-MSH6).

En immunohistochimie, l'instabilité microsatellitaire s'accompagne d'une perte d'expression de protéine(s) du système MMR. On parle de tumeur dMMR (déficient MMR). Le phénotype MSS, se traduit par l'expression des quatre protéines du système MMR, et la tumeur est dite pMMR (proficient MMR).<sup>[28,29]</sup>

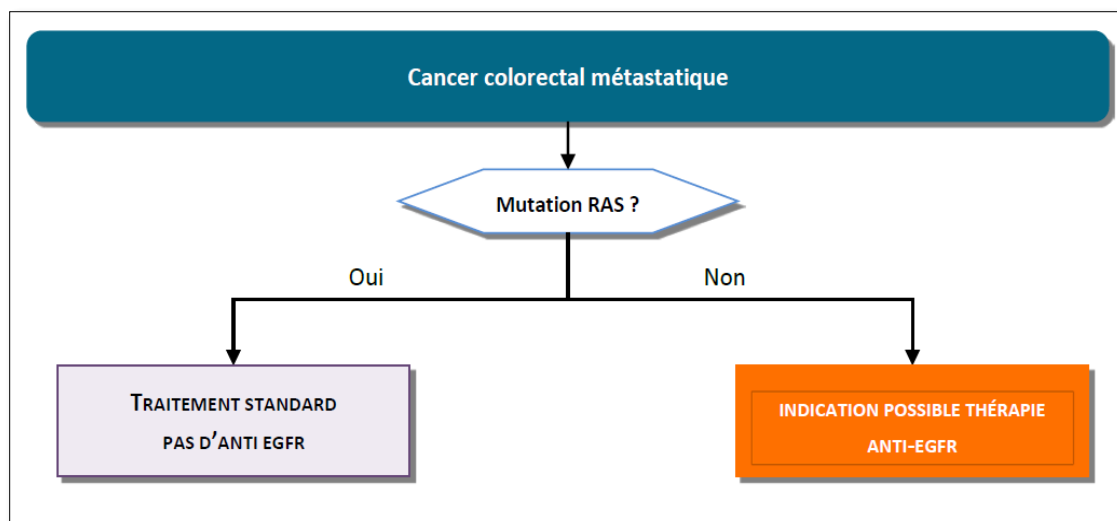
Le phénotype MSI ou RER (Replication ERror) constitue un indicateur du syndrome HNPCC (l'absence de MSI est en nette défaveur d'un syndrome de Lynch). Cependant, le résultat de ce test tumoral ne suffit pas à lui seul pour confirmer le syndrome HNPCC (existence de cancers colorectaux sporadiques MSI) et une évaluation oncogénétique doit être pratiquée.

La recherche de l'instabilité des microsatellites est réalisée pour dépister les patients susceptibles d'être atteints d'un syndrome de Lynch ou à but thérapeutique dans les cas de CCR de stade II résistants à la chimiothérapie type 5FU.

Certaines de ces thérapies ont été couramment utilisées pour traiter les CCR métastatiques, ce qui est le cas par exemple avec des médicaments ciblant les récepteurs des facteurs de croissance épidermique (EGFR). L'exemple le plus connu dans le domaine du traitement des CCR métastatiques est celui de la protéine RAS. Le gène *RAS*, codant pour cette protéine, est connu comme étant un oncogène depuis le début des années 1980.<sup>[30,31]</sup> Ce n'est qu'en 2008 que le lien entre présence d'une mutation somatique sur les codons 12 ou 13 et résistance aux traitements anti-EGFR (cetuximab ou panitumumab) a été établi.<sup>[32]</sup>



*Figure 3: Schéma thérapeutique des cancers colorectaux de stade II.*<sup>[33]</sup>



*Figure 4 : Schéma thérapeutique des cancers colorectaux métastatiques.*<sup>[33]</sup>

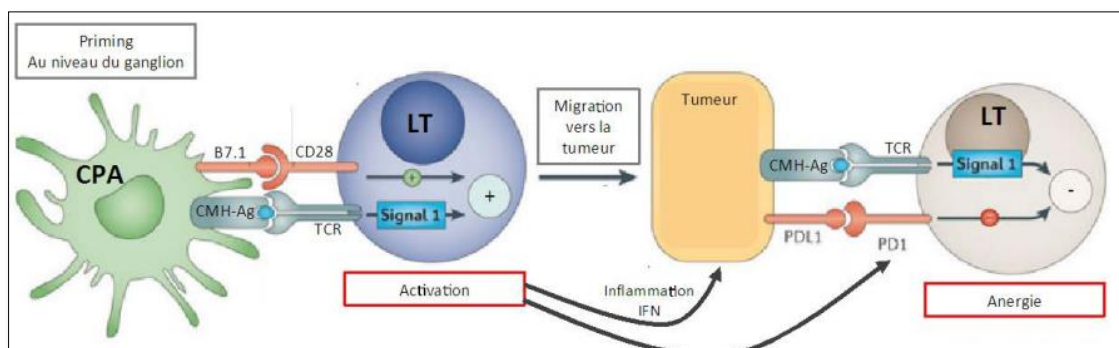
### III. Expression de la protéine PDL1:

#### 1. Protéine PDL1 « B7-H1 » :

PD-L1 (Programmed death-ligand 1) ou CD274, également connu comme B7-H1, est une protéine transmembranaire composée de 288 acides aminés et codée par le gène *CD274* présent sur les chromosomes 9 chez l'Homme. PDL1 est exprimée à la surface des cellules tumorales ainsi qu'à la surface d'un grand nombre de cellules immunitaires : les lymphocytes T CD4 et CD8, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les LB, cellules NK, cellules dendritiques et macrophages, et capable de se lier au récepteur de mort cellulaire programmée (PD-1 ou Programmed Death Receptor 1). [34]

Le ligand de mort cellulaire programmée 1 (PD-L1) est une molécule immunorégulatrice clé qui, lors de l'interaction avec son récepteur PD-1 exprimée par les lymphocytes T activés, déclenche un signal inhibant transitoirement ou définitivement les capacités cytotoxiques des lymphocytes T CD8+). Ainsi, il est admis que l'expression tumorale de PD-L1 constitue un mécanisme d'échappement majeur des cancers à la réponse immunitaire adaptative antitumorale. [35] PD-L1 joue aussi un rôle majeur dans la suppression du système immunitaire lors de la grossesse, d'allogreffes de tissus, de maladie auto-immune etc.

De manière schématique, l'axe PD-1/PD-L1 forme, au sein de la tumeur et du micro-environnement tumoral, un couple moléculaire responsable de la transduction d'un signal inhibiteur bloquant la cascade de signalisation déclenchée en aval du TCR.



*Figure 5 : Le couple PD-1/PD-L1 et l'échappement immunitaire anti-tumoral [36]*

## 2. Expression de PDL1 :

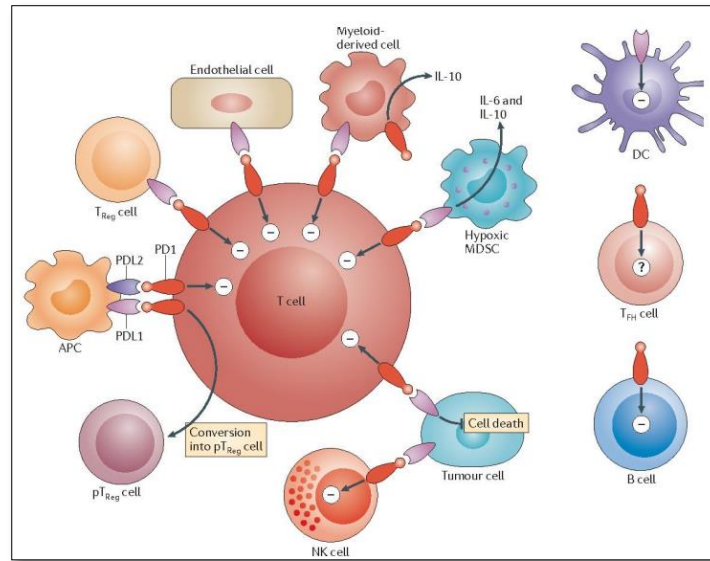
PD-L1 exprimé dans divers types de cellules immunitaires peut aussi affecter l'immunité anti-tumorale. Par exemple, l'expression de PD-L1 par les cellules non-tumorales comme les MDSC (myeloid-derived suppressor cells) et les Treg est également susceptible d'être un médiateur important du dysfonctionnement des LT. PD-L1 exprimé sur les MDSC induit la production d'IL-10 par ces cellules, ce qui supprime la prolifération des LT CD8+, ainsi que la production d'IFN- $\gamma$  et de médiateurs cytotoxiques tels que le Granzyme B. PD-L1 exprimé par les APC a un rôle dans l'induction de Treg périphérique (pTreg) et dans le maintien de la fonction suppressive des cellules pTreg.<sup>[37]</sup>

L'augmentation de l'expression de PD-L1 a été démontrée dans de nombreux types de cancers (par exemple, le mélanome (40%-100%), le CBNPC (35%-95%)...).

De plus, des niveaux élevés de PD-L1 sont liés à un mauvais pronostic dans le cancer du sein, le cancer rénal, le cancer ovarien etc. Il a été aussi montré que l'expression de PD-L1 peut augmenter la résistance des cellules tumorales aux traitements.<sup>[38]</sup>

L'importance de l'expression de PD-L1 sur des tumeurs solides en tant que biomarqueur pronostic a été rapportée dans de nombreuses études, dont beaucoup ont noté l'association entre l'expression de PD-L1 dans les tissus tumoraux et un mauvais pronostic, bien que cette association varie selon le type de la tumeur.

La détermination des taux de PD-L1 dans les tumeurs peut donc aider les médecins pour identifier les patients les plus susceptibles de bénéficier d'une thérapie anti – PD-1 / PD-L1.



*Figure 6 : Expression du couple PDL1/PD1 dans différents types cellulaires* [39]

#### IV. Immunothérapie :

##### 1 . Immuno-échappement des cellules tumorales :

Les cellules du système immunitaire peuvent avoir la Capacité de reconnaître, infiltrer et éliminer certaines cellules cancéreuses ; pourtant, quelques-unes de ces dernières échappent à la surveillance immunitaire et à la mort induite par le système immunitaire. L'immunosurveillance implique les cellules du système immunitaire adaptatif comme les CTL (Cytotoxic T Lymphocytes) et les Lymphocytes T helper.

Plusieurs stratégies amplifiées lors de la progression tumorale empêchent la reconnaissance des cellules cancéreuses par le système immunitaire, et permettent l'acquisition d'un phénotype malin et agressif. Aussi les tumeurs peuvent également développer des mécanismes de résistance à l'apoptose induite par les cellules de l'immunité, et sécréter des molécules immuno-suppressives engendrant un défaut d'activation lymphocytaire.<sup>[40,41]</sup>

La reconnaissance du complexe CMH-antigène par le TCR (T-cell Receptor) nécessite une quantité suffisante d'antigène.

L'acquisition lors de la croissance tumorale de mutations favorisant la perte ou la diminution de l'expression d'antigènes tumoraux rend les cellules malignes indétectables par les LT CD8+ spécifiques.<sup>[42]</sup> Ce mécanisme, aussi appelé « Antigenic drift », permet donc l'immuno-échappement des cellules cancéreuses.

Les tumeurs peuvent également devenir invisibles pour les cellules de l'immunité innée en perdant l'expression de ligands activateurs des cellules NK.

Une perte totale d'expression des molécules CMH-I à la surface des cellules cancéreuses induirait donc leur destruction par les NK. Le plus souvent, cette perte d'expression est partielle et caractérisée par une diminution de la présentation d'un ou plusieurs épitopes dominants, ce qui permet de conserver l'aptitude des cellules cancéreuses à stimuler les récepteurs inhibiteurs des NK, et en conséquence, empêcher leur activation.<sup>[43]</sup>

Les cellules cancéreuses utilisent divers moyens pour ne pas être reconnus par les cellules du système immunitaire, comme :

- La libération de cytokines inhibitrices (comme, l'IL-10 et le TGF- $\beta$ )
- L'expression de molécules inhibitrices (comme PDL-1)
- La perte des ligands solubles pour les récepteurs activateurs des cellules NK comme ULBPs (UL16 binding proteins), MICA (MHC class I polypeptide-related sequence A), MICB (MHC class I polypeptide-related sequence B), et FasL (Fas ligand).<sup>[44]</sup>

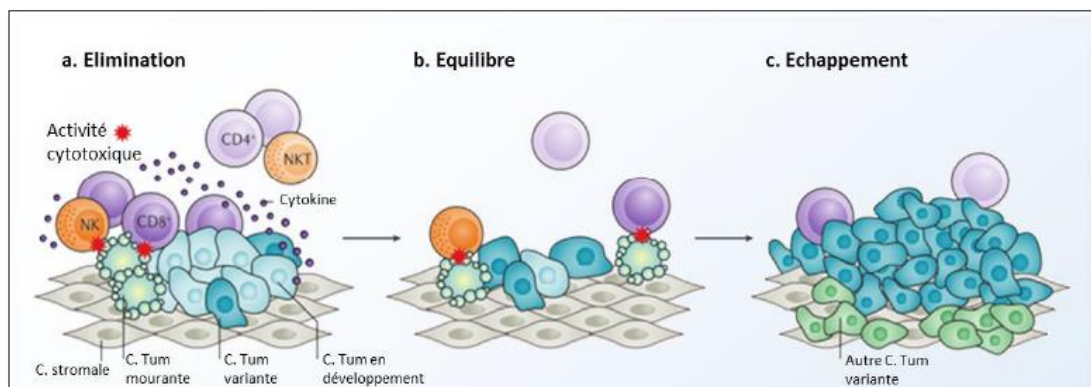


Figure 7 : Immuno-échappement des cellules tumorales.<sup>[45]</sup>

## 2. Immunothérapie anti-checkpoints :

L'immunothérapie représente désormais un des piliers de la prise en charge du cancer. Elle représente une avancée majeure et est au cœur de tous les congrès internationaux, notamment avec l'arrivée des inhibiteurs de points de contrôle (checkpoint) immunitaire (ICI, immune checkpoint inhibitors).

Le prix Nobel de physiologie ou de médecine 2018 a été rapporté par deux chercheurs en immunothérapie du cancer, James P. Allison, PhD, du MD Anderson Cancer Center de l'Université du Texas, et au Dr Tasuku Honjo de l'Université de Kyoto, au Japon. Allison et Honjo ont été honorés pour leurs travaux visant à découvrir des moyens d'activer le système immunitaire pour lutter contre le cancer, une avancée décisive dans le développement de nouveaux traitements contre le cancer. Allison a étudié la protéine CTLA-4 et Honjo a découvert PD-1, une autre protéine présente à la surface de certains lymphocytes T. <sup>[46]</sup>

Les ICI sont des anticorps thérapeutiques monoclonaux dirigés contre les points de contrôle du système immunitaire. Actuellement, les anti-checkpoint qui sont utilisés en cancérologie ciblent des récepteurs inhibiteurs présents à la surface des lymphocytes (PD1) ou leur ligand (PD-L1). Les inhibiteurs des points de contrôle immunitaire vont bloquer les mécanismes de frein mis en jeu par la cellule tumorale et réactiver le système immunitaire pour lui permettre de lutter contre les cellules tumorales.

Les médicaments qui ciblent la PD-1 comprennent Keytruda (pembrolizumab) et Opdivo (nivolumab), tandis que les médicaments qui ciblent la PD-L1 comprennent l'azéolizumab (Tecentriq), l'avelumab (Bavencio) et le durvalumab (Imfinzi).Après leurs résultats spectaculaires dans le mélanome métastatique, suivi des cancers du poumon inopérables, les cancers du rein et urothéliaux, certains cancers gastro-intestinaux, certains lymphomes, plus d'une centaine d'essais cliniques sont actuellement en cours et l'utilisation des ICI est devenue l'une des stratégies thérapeutiques la plus prometteuse en oncologie. <sup>[47]</sup> Ces immunothérapies sont le plus souvent prescrites en cas d'échec d'un traitement antérieur (par exemple une chimiothérapie).

Elles sont parfois autorisées en première ligne, seules ou en association, dans certaines indications. De manière générale, l'immunothérapie anti-PD1 ou anti-PDL1 est mieux tolérée que la chimiothérapie.

L'immunothérapie marque donc un changement majeur dans le traitement du cancer : on ne cherche plus à détruire directement les cellules tumorales mais à donner des armes au système immunitaire pour lui permettre de lutter contre la maladie. [48]

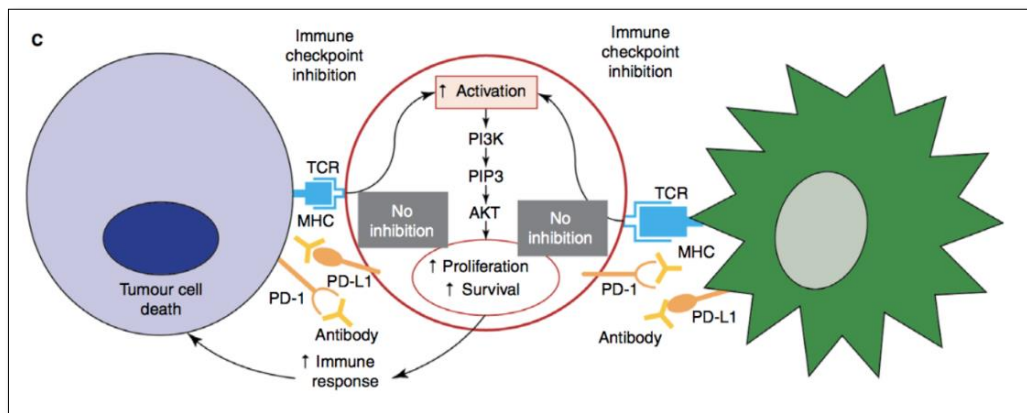


Figure 8 : Le couple PD-1/PD-L1 et l'approche anti-PD-1 / PD-L1. [49]

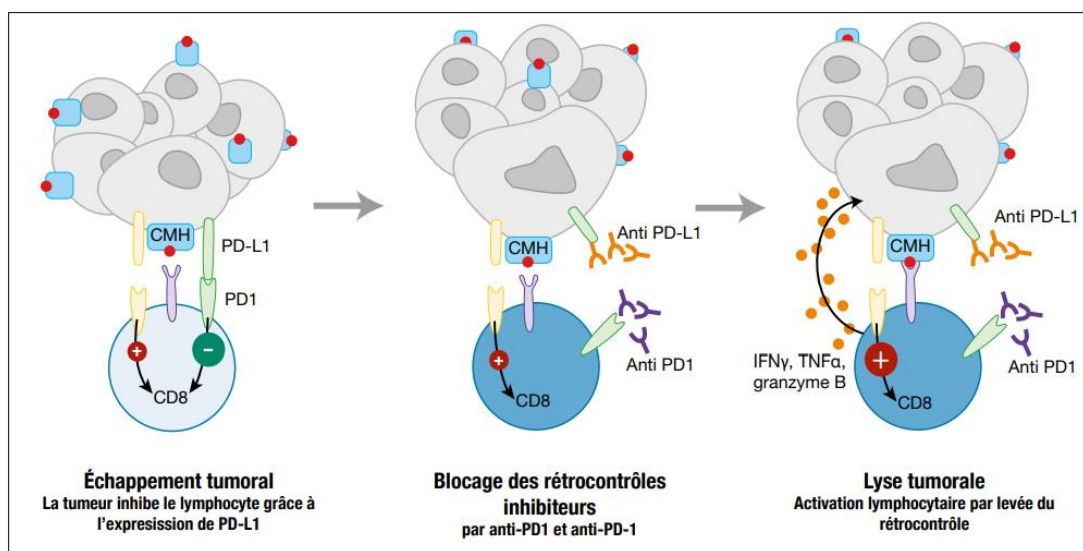


Figure 9 : Mode d'action des anti-PD-1/PD-L1. [48]



## **V. Objectif et but de l'étude :**

La liaison du PD-1 à son ligand PD-L1 supprime l'activation, la prolifération ainsi que la sécrétion des cytokines cytotoxiques des lymphocytes T, induisant une anergie et entraînant l'inhibition de la réponse immunitaire et l'échappement des cellules tumorales.

Actuellement, il y a un manque de recherche systématique sur l'expression de la protéine PDL1 dans le cancer colorectal, mais son expression est régulé positivement dans plusieurs tissus comme : cancer du poumon, le cancer du sein, le cancer du pancréas, le mélanome etc.

Le présent travail, recueillant une série de 30 cas d'adénocarcinome colorectal, est réalisé au sein du service d'anatomie pathologique du centre hospitalier universitaire Mohammed VI de Marrakech.

Notre premier objectif de cet étude est d'évaluer l'expression de PDL1 dans des tissus tumoraux du colon, afin d'analyser la corrélation entre l'expression du PD-L1 et le statut MMR par une étude immunohistochimique, et de comparer les résultats aux données de la littérature.

Ainsi nous avons exploré le degré d'expression des TILs CD4 et CD8 dans l'adénocarcinome colorectal afin d'étudier la corrélation entre l'expression du PD-L1 et celle de CD8 et CD4, faisant office de notre deuxième objectif.



## **MATÉRIELS ET MÉTHODES**

## **I. Population d'étude :**

### **1. Type et durée d'étude :**

Il s'agit d'une étude prospective menée au service d'anatomie pathologique du CHU Mohammed VI de Marrakech portant sur 30 cas d'adénocarcinome colorectal infiltrant sur une période de 4 mois.

### **2. Critères d'inclusion :**

- ✓ Patients présentant un adénocarcinome colorectal confirmé à l'étude anatomopathologique.
- ✓ Prélèvements tissulaires, uniquement des pièces opératoires, parvenus au service à l'état frais ou fixé au Formol.
- ✓ Prélèvements internes provenant des différents services du CHU Mohammed VI de Marrakech et externes reçus de laboratoires d'anatomie pathologique du secteur libéral sur lesquels une étude d'immunohistochimie à la recherche d'une instabilité micro-satellitaire a été demandée.

### **3. Critères d'exclusion :**

- ✓ Biopsies de tumeur.
- ✓ Epuisement du matériel tumoral inclus en paraffine.
- ✓ La non-conformité des prélèvements liés aux aléas de la phase pré-analytique (mauvaise fixation).

### **4. Sources des données :**

Les renseignements cliniques ont été recueillis en consultant les données relatives à chaque dossier à partir des fiches d'examens anatomo-pathologiques archivées, et à partir d'une requête via le logiciel DIAMIC du service d'anatomie pathologique du CHU Mohammed VI de Marrakech. (Annexe 1)

## 5. Paramètres recueillis :

Les paramètres suivants ont été recueillis grâce à une fiche d'exploitation : Tableau 1.

- ❖ L'âge ;
- ❖ Le sexe ;
- ❖ La nature du prélèvement ;
- ❖ Siège de prélèvement ;
- ❖ Type histologique.

## 6. Méthode d'analyse des données :

Les données ont été saisies et traitées sur Excel version 2013.

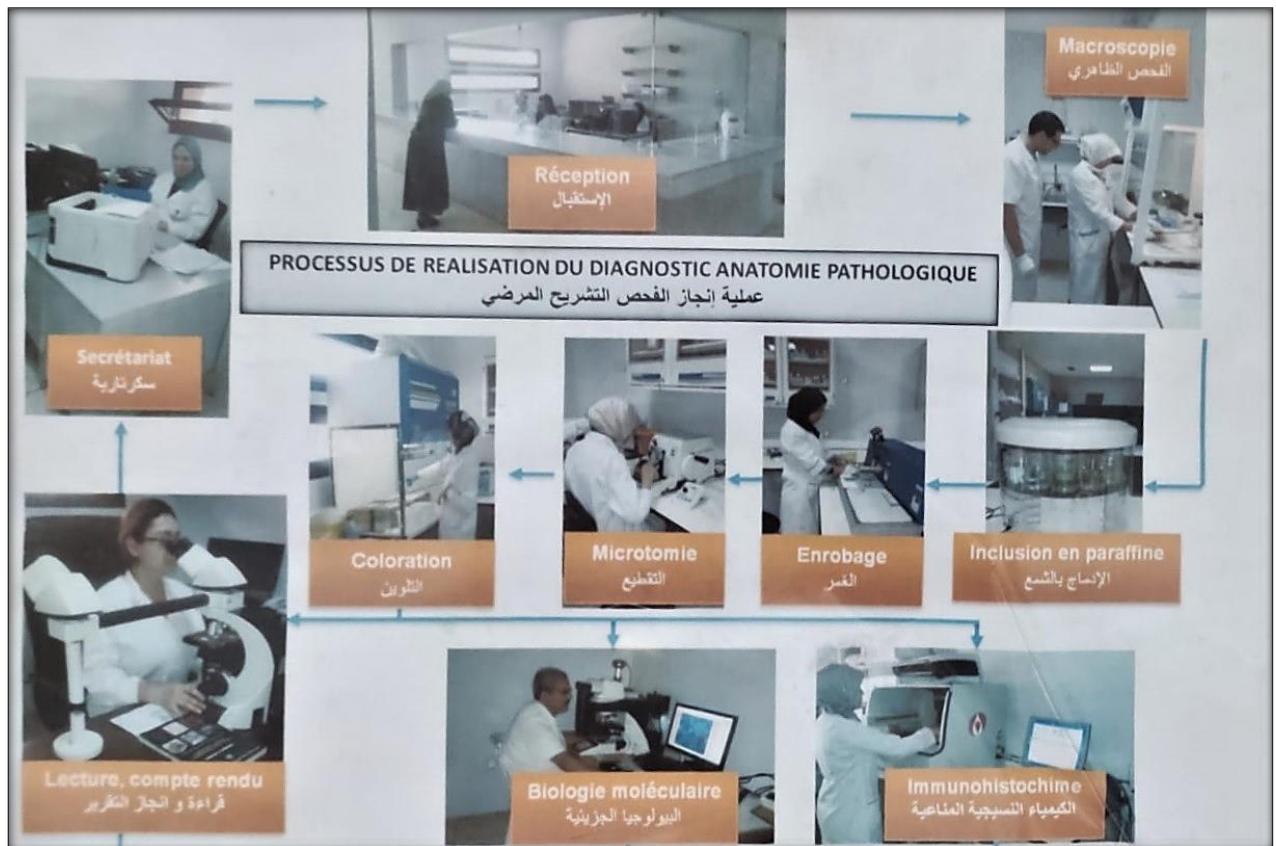
*Tableau 1 : Caractéristiques des patients.*

| Cas | Age | Sexe | Nature du prélèvement | Siège du prélèvement   | Type histologique                      |
|-----|-----|------|-----------------------|------------------------|--|
| 1   | 48  | M    | Pièce opératoire      | Hemicolectomie droite  | Adénocarcinome moyennement différencié |
| 2   | 44  | F    | Pièce opératoire      | Résection colique      | Adénocarcinome moyennement différencié |
| 3   | 37  | M    | Pièce opératoire      | Hemicolectomie gauche  | Adénocarcinome moyennement différencié |
| 4   | 60  | F    | Pièce opératoire      | Hemicolectomie gauche  | Adénocarcinome moyennement différencié |
| 5   | 57  | M    | Pièce opératoire      | Hemicolectomie gauche  | Adénocarcinome moyennement différencié |
| 6   | 51  | M    | Pièce opératoire      | Résection colique      | Adénocarcinome bien différencié        |
| 7   | 48  | M    | Pièce opératoire      | Résection sigmoïdienne | Adénocarcinome moyennement différencié |
| 8   | 56  | M    | Pièce opératoire      | Hemicolectomie droite  | Adénocarcinome moyennement différencié |
| 9   | 60  | F    | Pièce opératoire      | Résection sigmoïdienne | Adénocarcinome moyennement différencié |
| 10  | 58  | M    | Pièce opératoire      | Hemicolectomie gauche  | Adénocarcinome moyennement différencié |
| 11  | 55  | M    | Pièce opératoire      | Colectomie segmentaire | Adénocarcinome bien différencié        |
| 12  | 37  | M    | Pièce opératoire      | Résection sigmoïdienne | Adénocarcinome moyennement différencié |
| 13  | 67  | F    | Pièce opératoire      | Hemicolectomie droite  | Adénocarcinome moyennement différencié |
| 14  | 64  | F    | Pièce opératoire      | Hemicolectomie droite  | Adénocarcinome moyennement différencié |
| 15  | 58  | M    | Pièce opératoire      | Résection colorectale  | Adénocarcinome moyennement différencié |
| 16  | 58  | M    | Pièce opératoire      | Résection rectale      | Adénocarcinome moyennement différencié |
| 17  | 81  | M    | Pièce opératoire      | Hemicolectomie droite  | Adénocarcinome moyennement différencié |
| 18  | 70  | M    | Pièce opératoire      | Coloprotectomie        | Adénocarcinome mucineux                |
| 19  | 47  | F    | Pièce opératoire      | Colectomie segmentaire | Adénocarcinome mucineux                |
| 20  | 62  | F    | Pièce opératoire      | Résection rectale      | Adénocarcinome moyennement différencié |
| 21  | 43  | M    | Pièce opératoire      | Hemicolectomie droite  | Adénocarcinome peu différencié         |
| 22  | 44  | F    | Pièce opératoire      | Résection colorectale  | Adénocarcinome mucineux                |
| 23  | 60  | F    | Pièce opératoire      | Résection colorectale  | Adénocarcinome moyennement différencié |
| 24  | 62  | M    | Pièce opératoire      | Rectum                 | Adénocarcinome mucineux                |
| 25  | 64  | F    | Pièce opératoire      | Résection rectale      | Adénocarcinome moyennement différencié |
| 26  | 61  | M    | Pièce opératoire      | Résection rectale      | Adénocarcinome bien différencié        |
| 27  | 66  | F    | Pièce opératoire      | Hemicolectomie gauche  | Adénocarcinome mucineux                |
| 28  | 45  | M    | Pièce opératoire      | Colectomie segmentaire | Adénocarcinome peu différencié         |
| 29  | 56  | F    | Pièce opératoire      | Résection sigmoïdienne | Adénocarcinome mucineux                |
| 30  | 47  | M    | Pièce opératoire      | Hemicolectomie gauche  | Adénocarcinome moyennement différencié |

## II. Méthodes et matériels d'études :

### 1. Circuit du prélèvement tissulaire destiné à l'étude :

Un circuit standard est traversé par les prélèvements reçus au sein du service d'anatomie-pathologique du CHU Mohammed VI de Marrakech pour l'obtention d'un résultat histologique, immunohistochimique ou moléculaire.



*Figure 10 : Processus de réalisation du diagnostic anatomie pathologique.*

## 1.1. La fixation :

La phase pré-analytique conditionne la qualité de la technique immunohistochimique et donc la détection des protéines par IHC. Il est recommandé de réduire le plus possible la durée d'ischémie froide des prélèvements (<1H).

Généralement pour les pièces opératoires un retard de fixation supérieur à 1 heure diminue de manière significative la détection de marqueurs immunohistochimiques. Le meilleur fixateur recommandé est le formol tamponné à 4%. Les prélèvements doivent être fixés durant 6heures pour les biopsies et jusqu'à 48h pour les pièces opératoires, en utilisant un volume de fixateur suffisant.

## 1.2. L'enrobage :

Après que les pièces opératoires ont été inclus dans des cassettes et traités pendant 15h dans l'automate de circulation pour la déshydratation, elles vont ensuite être enrobées dans des moules d'aluminium et en paraffine en utilisant une plaque chauffante, formant après leur refroidissement des blocs.



*Figure 11 :Automate de circulation.*



*Figure 12 : Unité d'enrobage.*

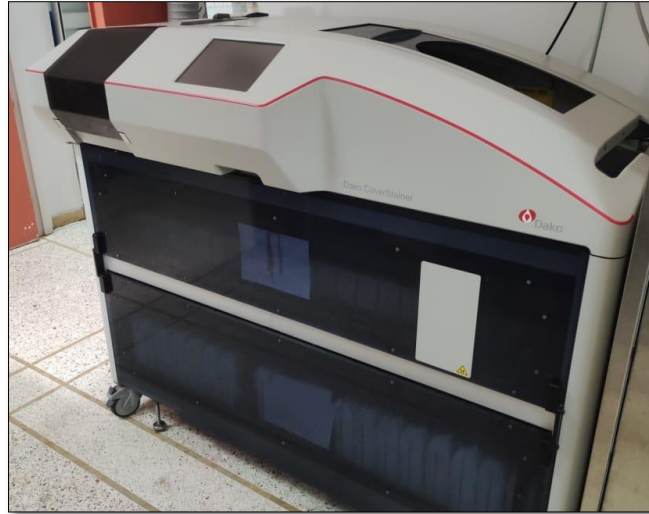
### **1.3. Microtomie et coloration des lames :**

Les blocs FFPE, sont coupés à l'aide d'un microtome permettant de créer de fines coupes de 3  $\mu\text{m}$  à 4  $\mu\text{m}$  du tissu étudié. Le ruban est par la suite étalé sur une lame blanche. L'évaluation de la quantité de cellules tumorales viables sur la coloration standard Hématéine éosine (HE) est une étape préalable indispensable à toute interprétation.



*Figure 13 : Réalisation des coupes au microtome.*





*Figure 14 : Automate AutoStainer.*

## **2. Préparation des Tissus Micro-Array « TMA » :**

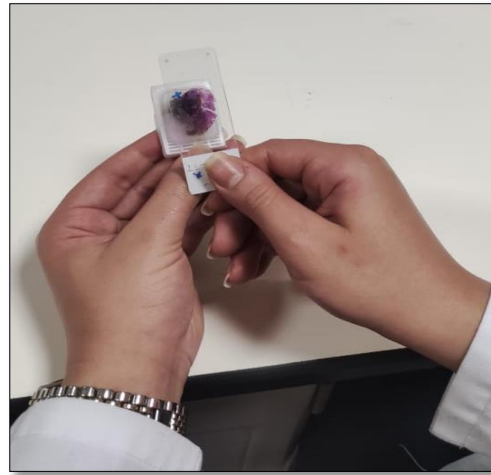
Les 30 blocs tissulaires ont été coupés au microtome, pour avoir des lames qui ont été par la suite colorées en HE par l'automate AutoStainer. Ensuite, les lames colorées ont été observé au microscope et confirmé par les spécialistes du service d'anatomie pathologique, pour la sélection tumorale. Après observation, on a entouré le foyer d'intérêt par un feutre permanent sur les lames histologiques. Par la suite, on a superposé les lames sur les blocs tissulaires dans le but de prélever à l'aide d'un panch les foyers d'intérêt et les monter dans des moules d'aluminium, pour réaliser des Tissus micro-array « TMAs ». En totalité, on a 30 cas d'adénocarcinome colorectal, chaque TMA comprend 10 cas séparés, donc on a préparé 3 blocs TMAs pour les 30 cas d'adénocarcinome colorectal.

On a utilisé le panch comme outil de préparation des blocs TMAs, parce qu'on a travaillé sur des pièces opératoires et non pas des biopsies (pas d'épuisement du matériel), et parce que la technique TMA nécessite beaucoup de temps pour la formation.





Sélection tumorale



Concordance avec le bloc tissulaire



Foyer entouré sur lame et bloc



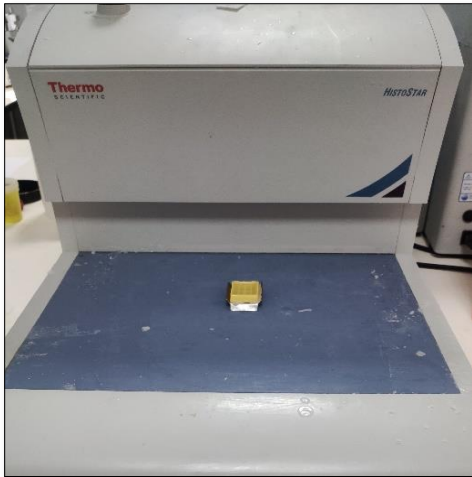
Décollement du foyer d'intérêt à l'aide d'un panch



Foyer tumoral décollé des 30 blocs tissulaires



Montage dans des moules d'aluminium et dans la paraffine



Refroidissement du bloc de TMA



TMA's après refroidissement

*Figure 15 : Étapes de sélection tumorale et préparation des TMA's.*

### **3. Etude immunohistochimique :**

L'appareil Dako OMNIS a permis d'effectuer la technique immunohistochimique (IHC) automatisée sur 21 coupes de tissus d'adénocarcinome colorectal. L'automatisation de la technique permet de la standardiser et d'avoir une paillasse de qualité.

La phase pré-analytique conditionne la qualité de la technique immunohistochimique et donc la détection des protéines par IHC. Il est recommandé de réduire le plus possible la durée d'ischémie froide des prélèvements. L'ischémie froide est définie comme le temps écoulé entre le moment où le prélèvement tissulaire est extrait du corps humain et sa mise au contact du fixateur. Généralement pour les pièces opératoires un retard de fixation supérieur à 1 heure diminue de manière significative la détection de marqueurs immunohistochimiques. Pour les biopsies il faut fixer le prélèvement immédiatement dans le fixateur (délai de quelques minutes). Le fixateur recommandé est le formol tamponné à 4%, les prélèvements doivent être fixés durant 6 heures pour les biopsies et jusqu' à 48h pour les pièces opératoires, en utilisant un volume de fixateur suffisant.

Pour chaque TMA on a préparé : 4 lames blanches pour l'étude du profil MMR avec les quatre anticorps, 1 lame pour l'étude de la protéine PDL1, 1 lame pour CD4 et 1 lame pour CD8. Donc on a préparé 7 lames blanches pour chaque bloc de TMA, pour avoir vers la fin 21 lames blanches des trois bloc de TMAs réalisés précédemment.



*Figure 16 : Lames blanches pour immunohistochimie.*

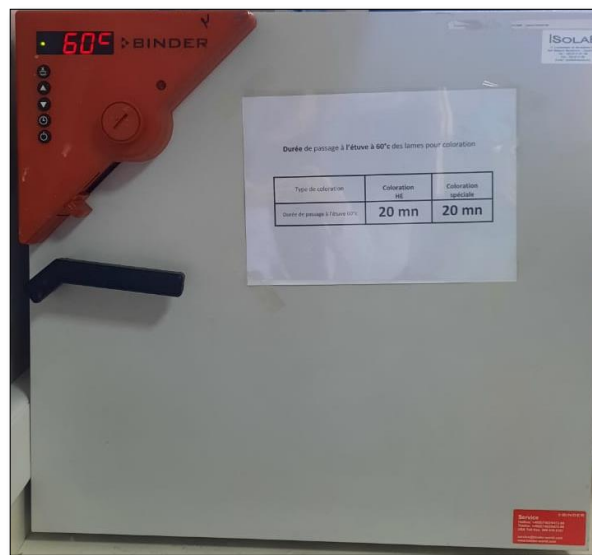


*Figure 17 : Automate d'immunohistochimie Dako OMNIS.*



*Figure 17: Automate d'immunohistochimie Dako OMNIS.*

L'immunohistochimie a été réalisée sur des coupes de paraffine de 4  $\mu\text{m}$ . Les lames ont été incubées toute une nuit dans l'étuve à 37°C pour la fixation des coupes.



*Figure 18 : Etuve « BINDER » .*

### 3.1. Protocole IHC pour le marquage des TILs CD4 et CD8:

Le même protocole a été suivi pour le typage des TILs CD4 et CD8 dans le microenvironnement tumoral.

Pour l'étude immunohistochimique, nous avons utilisé deux anticorps, commercialisé par Dako: CD4 et CD8. Pour chaque bloc de TMA, on a coupé au microtome 2 lames blanches, ce qui fait en total 6 lames blanches pour les trois TMAs.

La description des marqueurs ciblés et des protocoles d'immunohistochimie figurent dans le Tableau 5.

Pour CD8 et CD4, les tissus ont été incubés dans du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pendant 10 minutes pour bloquer les peroxydes endogènes. Après un premier rinçage par le Tampon de lavage, l'anticorps primaire a été appliqué sur les tissus pendant 30 minutes. Un deuxième rinçage qui consiste à laver deux fois les tissus par le tampon de lavage pendant 5 minutes est suivi par l'application de l'anticorps secondaire couplé à l'HRP pendant 20 minutes. Les tissus ont subi un troisième rinçage similaire au deuxième, puis le chromogène DAB sera ajouté pendant 10 minutes. Après un dernier rinçage par l'eau distillée, les coupes ont été contre-colorées par l'Hématoxyline de Mayer qui entraîne une coloration bleu clair à bleu foncé des noyaux cellulaires ce qui permet de visualiser le marquage immunohistochimique quand il existe. Finalement les tissus ont été déshydratés et montés pour l'observation.



*Figure 20 : Anticorps anti CD4 et anti CD8 pour marquage des TILs.*



*Tableau 2: Marqueurs des TILs*

| Marqueurs | Fabriquant | Clone   | Isotype     | Expression  |
|-----------|------------|---------|-------------|-------------|
| CD8       | Thermo     | C8/144B | IgG1, Kappa | Membranaire |
| CD4       | Thermo     | C4/144B | IgG1, Kappa | Membranaire |

### 3.2. Protocole IHC pour le marquage des protéines MMR :

Pour l'étude immunohistochimique du profil MMR des 30 cas, nous avons utilisé quatre anticorps : MLH-1, PMS2, MSH2 et MSH6. Pour chaque bloc de TMA, on a préparé quatre lames blanches, ce qui fait 12 lames en totalité pour la détermination du profil MMR. Les 12 lames blanches précédemment étuvées, ont été chargés dans l'automate Dako OMNIS avec les quatre anticorps appropriés.

Pour la révélation du statut MMR on a suivi le même protocole (Technique immunohistochimique légèrement modifiée : augmentation du temps d'incubation de l'anticorps et du DAB, l'ajout d'un Linker après incubation de l'anticorps primaire pendant 10minutes). Ceci est dû au fait que le test MMR se fait généralement sur des pièces opératoires qui sont souvent mal fixées (modifications recommandées par le fournisseur des anticorps (Dako)).



*Figure 19: Anticorps pour le marquage des protéines MMR.*

*Tableau 3: Marqueurs des protéines MMR*

| Marqueurs   | Fabriquant | Clone | Isotype | Expression |
|-------------|------------|-------|---------|------------|
| <b>MLH1</b> | Dako       | ES05  | IgG1    | Nucléaire  |
| <b>PMS2</b> | Dako       | EP51  | IgG1    | Nucléaire  |
| <b>MSH2</b> | Dako       | FE11  | IgG1    | Nucléaire  |
| <b>MSH6</b> | Dako       | EP49  | IgG1    | Nucléaire  |

### **3.3. Protocole IHC pour le marquage de la protéine PDL1:**

Pour la recherche de l'expression de PD-L1, nous avons utilisé un Kit validé, commercialisé par Dako. Ce Kit contient tous les réactifs (prêt à l'emploi) nécessaires pour la technique classique d'Immunohistochimie avec deux réactifs en plus (Linker et DAB Enhancer) pour optimiser et standardiser la technique. Le kit contient aussi des lignées témoins externes positifs et négatifs. Le Linker sert à amplifier l'intensité du signal et on l'ajoute après incubation de l'anticorps primaire pendant 30minutes. Le DAB Enhancer intensifie la coloration du DAB et produit un dépôt de coloration brun foncé et on l'ajoute après incubation du DAB pendant 5minutes.

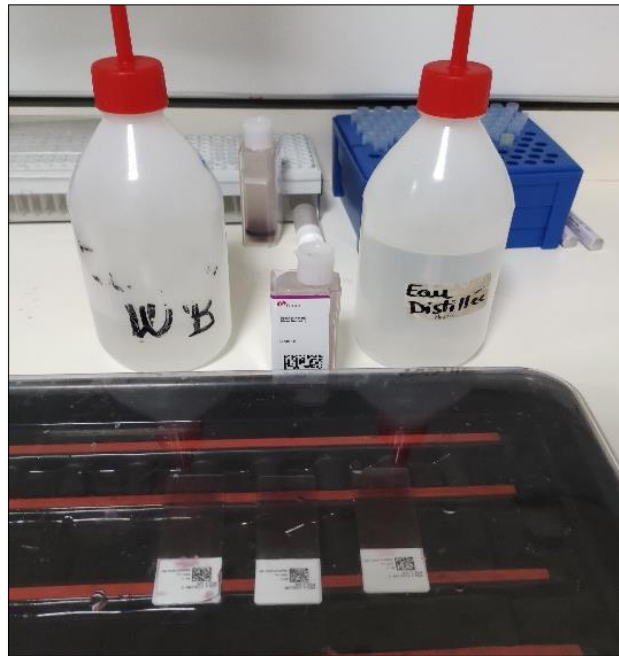
Après la technique immunohistochimique, on a procédé à une contre coloration des trois lames blanches des trois TMAs. Les lames ont été déposées dans une chambre humide, et rincées à l'eau distillée, ensuite elles ont été incubées dans l'hématoxyline pendant 5min, et finalement rincées au tampon « Wash Buffer ».

*Tableau 4: Marqueur de la protéine PDL1*

| Marqueurs    | Fabriquant | Clone | Isotype | Expression  |
|--------------|------------|-------|---------|-------------|
| <b>PDL-1</b> | Dako       | 22C3  | IgG1    | Membranaire |



*Figure 21 : Anticorps pour marquage de PDL1.*



*Figure 22 : Contre coloration des lames.*



*Tableau 5: Protocole d'immunohistochimie pour la révélation des protéines utilisées*

| Anticorps Primaire           | Prétraitement                  | Dilution                | Temps d'incubation | Réactif de visualisation     | Dilution        | Temps d'incubation | Révélation     |
|------------------------------|--------------------------------|-------------------------|--------------------|------------------------------|-----------------|--------------------|----------------|
| <b>Anti-MLH1</b>             | Tampon concentré (x50)<br>PH 9 | 1 :50<br>Dako           | 1H                 | Polymère HRP-conjugué (Dako) | Prêt à l'emploi | 30 min             | DAB (Kit Dako) |
| <b>Anti-PMS2</b>             | Tampon concentré (x50)<br>PH 9 | 1 :50<br>Dako           | 1H                 | Polymère HRP-conjugué (Dako) | Prêt à l'emploi | 30min              | DAB (Kit Dako) |
| <b>Anti-MSH2</b>             | Tampon concentré (x50)<br>PH 9 | 1 :50<br>Dako           | 1H                 | Polymère HRP-conjugué (Dako) | Prêt à l'emploi | 30min              | DAB (Kit Dako) |
| <b>Anti-MSH6</b>             | Tampon concentré (x50)<br>PH 9 | 1 :50<br>Dako           | 1H                 | Polymère HRP-conjugué (Dako) | Prêt à l'emploi | 30min              | DAB (Kit Dako) |
| <b>Anti-PDL-1</b>            | Tampon concentré (x50)<br>PH 9 | Prêt à l'emploi<br>Dako | 30min              | Polymère HRP-conjugué (Dako) | Prêt à l'emploi | 20min              | DAB (Kit Dako) |
| <b>Anti-CD8<br/>Anti-CD4</b> | Tampon concentré (x50)<br>PH 9 | 1 :50<br>Thermo         | 30min              | Polymère HRP-conjugué (Dako) | Prêt à l'emploi | 20min              | DAB (Kit Dako) |

Toutes les lames destinées à l'étude immunohistochimique de PDL1, du statut MMR et des TILs CD4 et CD8, ont été traitées comme suit :

- Les lames ont été montées dans des racs pour les introduire dans l'automate d'immunohistochimie Dako Omnis. (A)
- Les Ac ont été chargés dans l'automate d'IHC Dako OMNIS. (B)
- Les 21 lames ont été déchargées. (C)
- Contre coloration des 3 lames de PDL1.
- Déshydratation des lames dans des bains d'alcool et toluène. (D)
- Montage des lames pour observation au microscope. (E)



Montage dans les racs



Chargement des racs dans l'automate Dako OMNIS



Chargement des anticorps



C

Déchargement des lames



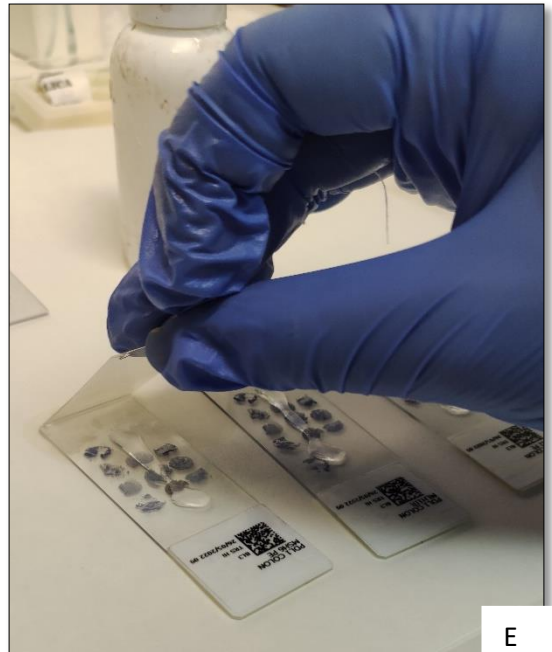
C

Lames déchargées



D

Unité de montage



E

Montage des lames



Visualisation au microscope

*Figure 23 : Etapes de l'étude immunohistochimique réalisée au sein du service d'anatomie pathologique, CHU Marrakech.*



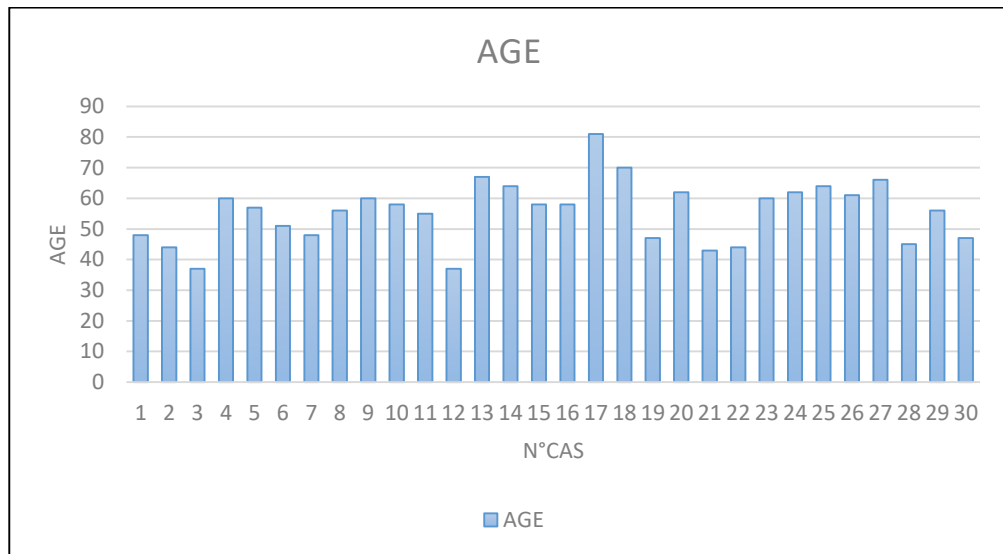
# **RÉSULTATS**

## I. Données démographiques des cas étudiés :

Les données démographiques et les caractéristiques cliniques des 30 cas de Cancer colorectal sont présentées en détail dans le Tableau 10 (Annexe 2).

### 1. Age :

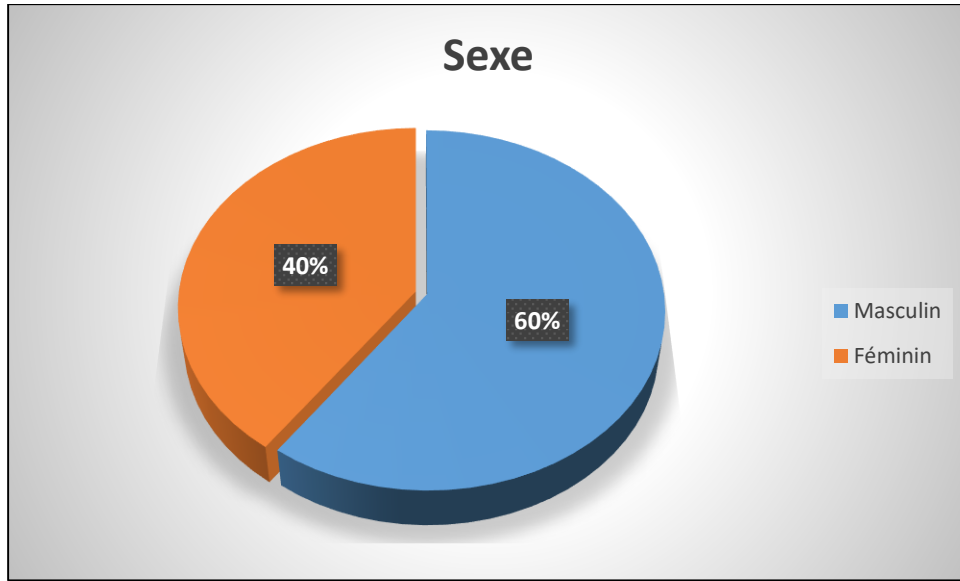
Dans notre série, La moyenne d'âge des patients atteints de cancer colorectal est de 55 ans, avec un intervalle allant de 37 ans à 81 ans.



*Figure 24 : Répartition des patients en fonction de l'âge.*

### 2. Sexe :

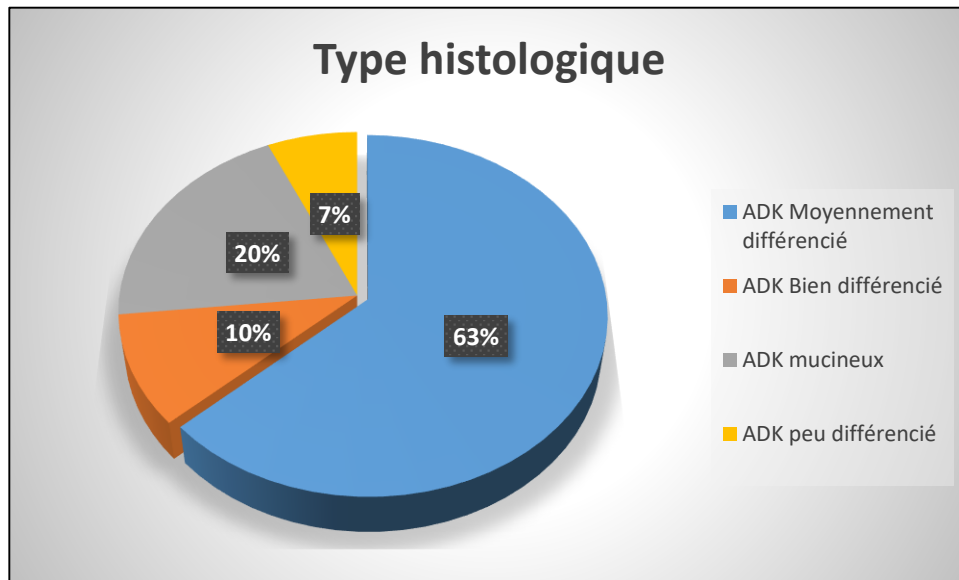
La population étudiée présente une prédominance masculine. Sur nos 30 cas de cancers colorectaux, 18 cas sont de sexe masculin et 12 cas sont de sexe féminin avec un ratio de 1,5.



*Figure 25: Répartition des patients en fonction du sexe.*

### 3. Différenciation tumorale :

Dans notre série, l'étude de la différenciation a révélé ce qui suit :



*Figure 26: Répartition de la différenciation d'adénocarcinome colorectal.*

Ainsi, l'adénocarcinome colorectal était le plus souvent moyennement différencié (63% des cas) et le moins souvent peu différencié (7% des cas).

## **II. Résultats de l'étude immunohistochimique :**

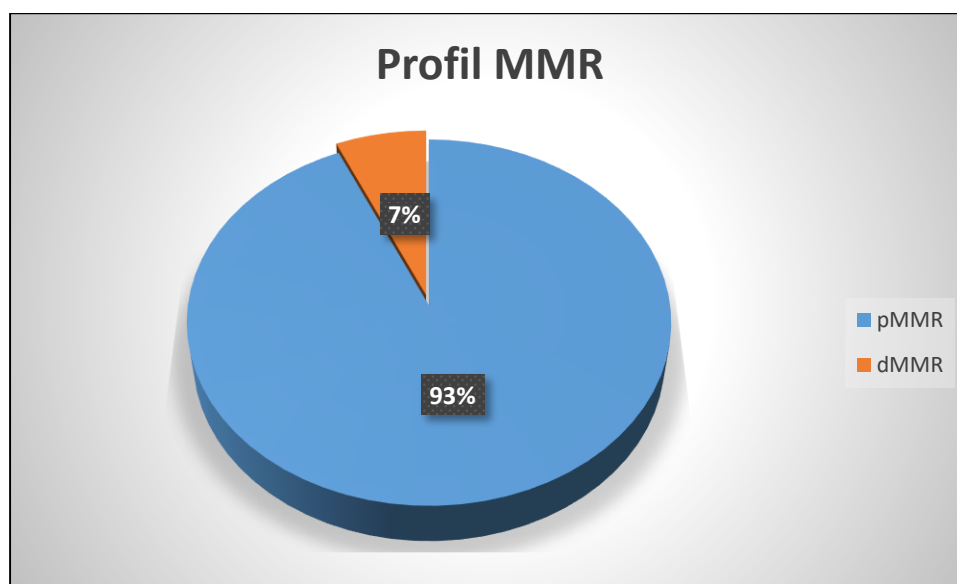
Les protéines recherchées sont MLH-1, PMS2, MSH2, MSH6, PD-L1, CD8 et CD4.

### **1. Résultat de l'expression des protéines MMR :**

Pour l'interprétation du statut MMR, nous avons pris en considération la présence du marquage nucléaire des protéines au niveau des cellules tumorales infiltrantes. Dans notre étude un cas est considéré dMMR lorsque les cellules tumorales n'expriment pas la ou les protéines MMR.

Afin d'analyser le système protéique de réparation de mésappariement dans les tumeurs, l'immunohistochimie a été effectuée en utilisant des anticorps spécifiques des protéines MMR (MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2).

Parmi les cas du CCR étudiés, 28cas (93%) présentaient un profil MMR proficient (pMMR) alors qu'un dMMR a été identifiée dans deux cas (7%). Le premier Cas MSI (N° 22) est un adénocarcinome colorectal mucineux, alors que le deuxième cas MSI (N° 28) est un adénocarcinome peu différencié.



*Figure 27 : Répartition des cas en fonction du profil MMR.*

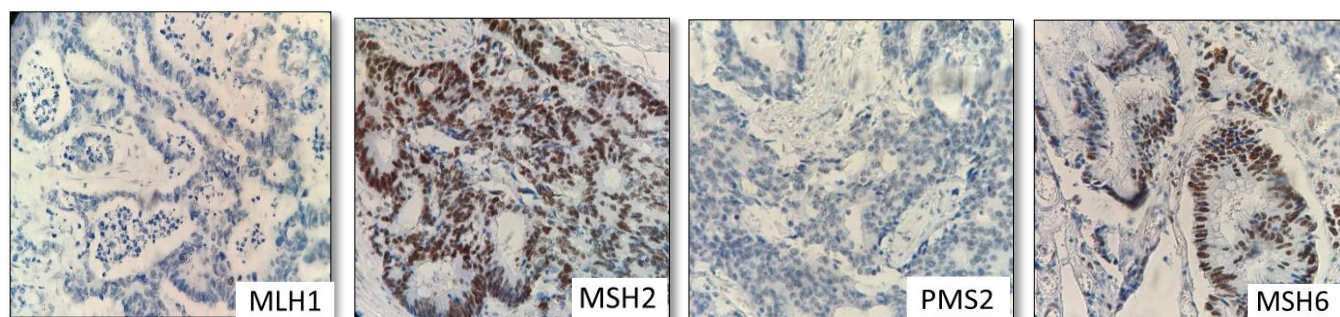


Le cas N° 28, a été exclu après et remplacé par un autre cas en raison de décollement du fragment causé par une mauvaise fixation lors de la phase pré-analytique, et cela conduit à des contraintes en immunohistochimie.

*Tableau 6: Données des cas dMMR.*

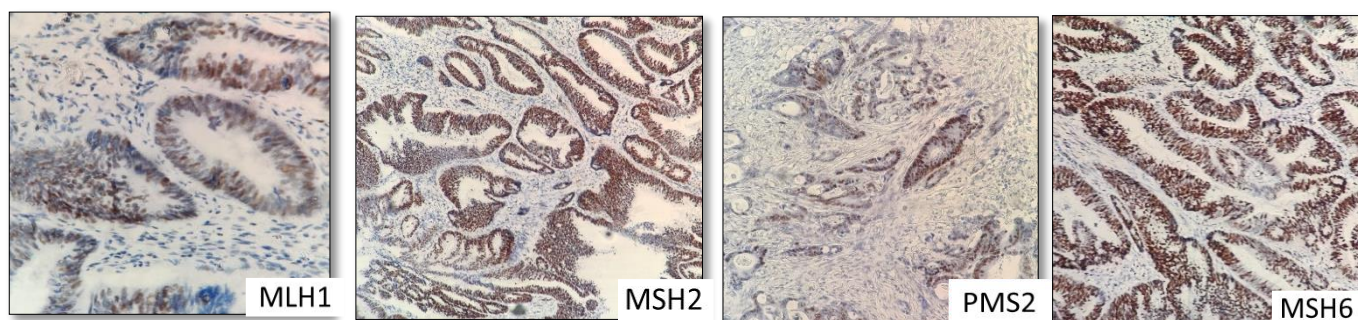
| N° du cas | Age | Sexe | MLH1    | PMS2    | MSH2     | MSH6     |
|-----------|-----|------|---------|---------|----------|----------|
| 22        | 44  | F    | Absence | Absence | Présence | Présence |
| 28        | 45  | M    | Absence | Absence | Présence | Présence |

L'immunohistochimie a révélé une absence de l'expression de MLH1 et de PMS2 dans les 2 cas. L'expression de MSH2 et MSH6 a été maintenue dans toutes les tumeurs.



*Figure 28: Exemple de marquage immunohistochimique des protéines MMR d'un des deux cas du CCR avec profil dMMR(IHCx100).*

Absence d'expression nucléaire des cellules tumorales infiltrantes à l'anticorps anti-MLH1 et anti PMS2, avec maintien de l'expression de MSH2 et MSH6 ; profil dMMR.



*Figure 29: Exemple de marquage immunohistochimique des protéines MMR d'un des cas du CCR avec profil pMMR(IHCx40,IHCx200).*

Une expression nucléaire des cellules tumorales infiltrantes aux quatre Ac utilisés : MLH1, MSH2, PMS2 et MSH6 ; profil pMMR.

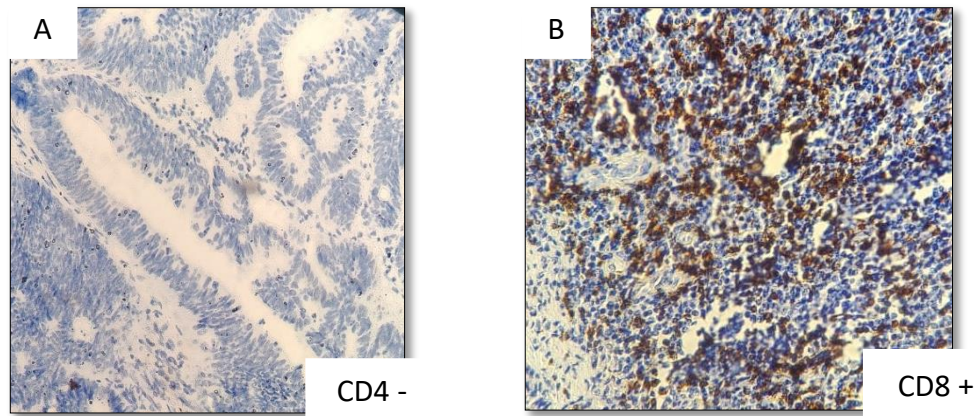
## 2. Résultat de l'expression des TILs CD4 et CD8 :

L'expression du CD8 et CD4 est déterminée selon le marquage membranaire des cellules tumorales et le pourcentage des lymphocytes infiltrant les tumeurs CD4 et CD8 marqués. Le tableau ci-dessous regroupe les pourcentages d'expression des TILs dans le microenvironnement tumoral, ainsi que le pourcentage des lymphocytes CD4 et CD8 marqués par rapport au TILs.

*Tableau 7: Expression des TILs CD4 et CD8.*

| CAS | % DES TILS | CD4 | CD8          |
|-----|------------|-----|--------------|
| 1   | 50%        | –   | (+) dans 40% |
| 2   | 60%        | –   | (+) dans 50% |
| 3   | 15%        | –   | (+) dans 80% |
| 4   | 20%        | –   | (+) dans 50% |
| 5   | 25%        | –   | (+) dans 20% |
| 6   | 10%        | –   | (+) dans 90% |
| 7   | 15%        | –   | (+) dans 90% |
| 8   | 10%        | –   | (+) dans 80% |
| 9   | 35%        | –   | (+) dans 20% |
| 10  | 10%        | –   | (+) dans 30% |
| 11  | 30%        | –   | (+) dans 40% |
| 12  | 40%        | –   | (+) dans 20% |
| 13  | 30%        | –   | (+) dans 30% |
| 14  | 25%        | –   | (+) dans 30% |
| 15  | 10%        | –   | (+) dans 25% |
| 16  | –          | –   | –            |
| 17  | 15%        | –   | (+) dans 30% |
| 18  | 15%        | –   | (+) dans 20% |
| 19  | –          | –   | –            |
| 20  | 20%        | –   | (+) dans 30% |
| 21  | –          | –   | –            |
| 22  | –          | –   | –            |
| 23  | 25%        | –   | –            |
| 24  | –          | –   | –            |
| 25  | –          | –   | –            |
| 26  | 30%        | –   | –            |
| 27  | 15%        | –   | –            |
| 28  | –          | –   | –            |
| 29  | 20%        | –   | (+) dans 10% |
| 30  | 25%        | –   | –            |

D'après l'étude, on a constaté l'absence totale de l'expression des LT CD4 dans le stroma, or que les LT CD8+ ont été présentes dans 19cas et 11cas n'expriment pas des LT CD8 dans les cas étudiés.



*Figure 30: Exemple de marquage immunohistochimique des CD4 et CD8 d'un des cas du CCR (IHCx200).*

A : Absence d'expression des cellules lymphocytaire intra-tumoral à l'Ac anti CD4.

B : Expression membranaire des cellules lymphocytaire intra-tumoral à l'Ac anti CD8.

### **3. Résultat de l'expression de la protéine PDL1:**

Pour l'interprétation des résultats, nous nous sommes basés sur le marquage membranaire, l'intensité de marquage et le pourcentage de cellule carcinomateuse infiltrante marquée, ainsi que les lymphocytes intratumoraux. Le score des cellules tumorales ainsi que le score des TILS (granulocytes, cellules dendritiques, lymphocytes et macrophages) a été mesuré en pourcentage de 0 à 100. L'intensité d'expression de Pdl1 dans les cas étudiés varie de faible, modérée à intense.

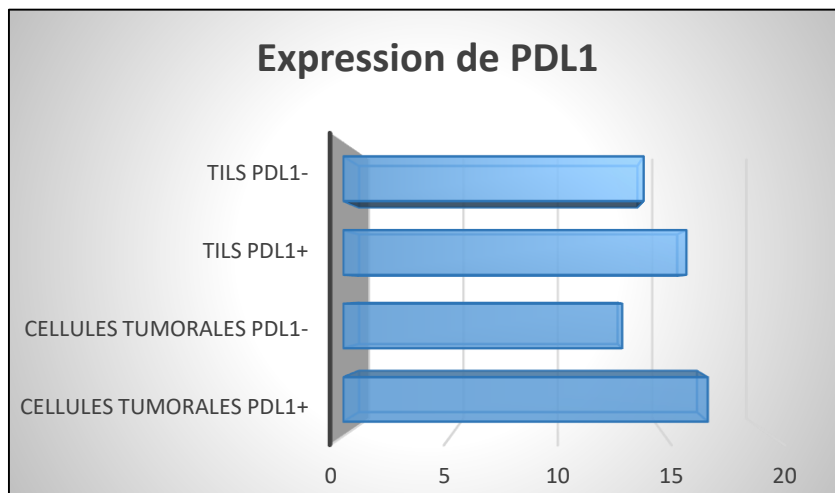
L'immunohistochimie de PD-L1 a été interprétée comme suit :

- Les valeurs  $\geq 1$  % ont été attribuées comme positives à tout moment.
- Les valeurs de score  $< 1$  % ont été attribuées comme négatif.

La positivité de PDL1 a été observée dans les lymphocytes intratumoraux dans 16 cas (86%), les autres cas (14 cas, 13%) ont été PDL1 négatifs. On a constaté l'expression membranaire de PDL1 au niveau des cellules tumorales dans 17 (56,6%), et 13 cas (43,3) ne présentaient aucune expression de PDL1.

*Tableau 8: Expression de PDL1 dans la population étudiée.*

| CAS | %Tils | % des cellules tumorales | Marquage cellules tumorales |
|-----|-------|--------------------------|-----------------------------|
| 1   | 20%   | <1%                      | -                           |
| 2   | 10%   | 20%                      | modéré membranaire          |
| 3   | <1%   | <1%                      | -                           |
| 4   | 25%   | 10%                      | faible membranaire          |
| 5   | 15%   | <1%                      | -                           |
| 6   | 30%   | 5%                       | faible membranaire          |
| 7   | <1%   | <1%                      | -                           |
| 8   | <1%   | 20%                      | intense membranaire         |
| 9   | 10%   | <1%                      | -                           |
| 10  | 15%   | 10%                      | faible membranaire          |
| 11  | <1%   | 25%                      | modéré membranaire          |
| 12  | 10%   | 25%                      | modéré membranaire          |
| 13  | 20%   | 5%                       | modéré membranaire          |
| 14  | <1%   | 25%                      | modéré membranaire          |
| 15  | 20%   | 5%                       | intense membranaire         |
| 16  | <1%   | <1%                      | -                           |
| 17  | 10%   | <1%                      | -                           |
| 18  | 40%   | 30%                      | faible membranaire          |
| 19  | <1%   | <1%                      | -                           |
| 20  | 30%   | <1%                      | -                           |
| 21  | <1%   | 10%                      | modéré membranaire          |
| 22  | <1%   | <1%                      | -                           |
| 23  | 10%   | <1%                      | -                           |
| 24  | <1%   | 40%                      | intense membranaire         |
| 25  | <1%   | 10%                      | modéré membranaire          |
| 26  | 5%    | 25%                      | faible membranaire          |
| 27  | <1%   | <1%                      | -                           |
| 28  | 20%   | 5%                       | faible membranaire          |
| 29  | <1%   | <1%                      | -                           |
| 30  | <1%   | 10%                      | modéré membranaire          |



*Figure 31 : Résultats de l'expression de la protéine PDL1.*

D'après les résultats, on remarque une expression membranaire de PDL1 au niveau des TILs dans 16 cas d'adénocarcinome colorectal. Les cellules carcinomateuses infiltrantes montre une expression membranaire faible, modérée à intense dans 17 cas d'adénocarcinome colorectal. Aucune positivité n'a été observée dans les autres cas.



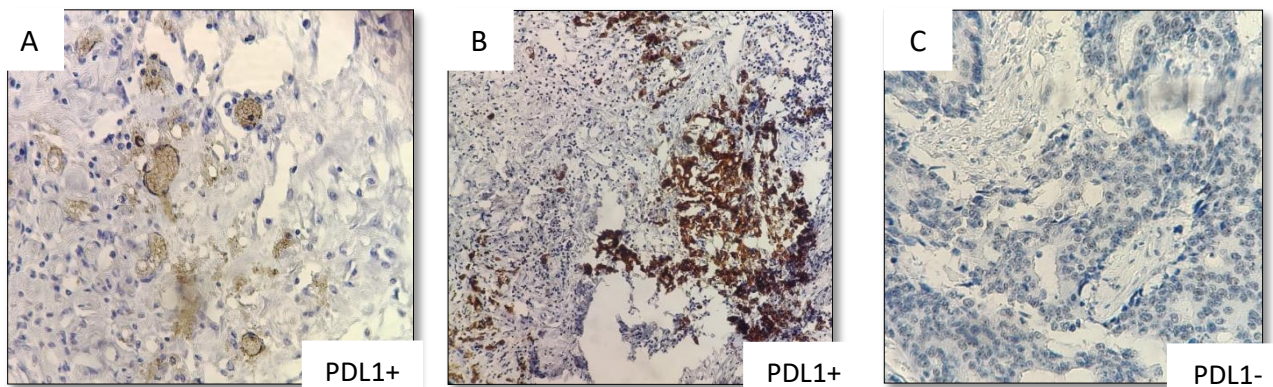


Figure 32: Exemple de marquage immunohistochimique de PDL1 de quelques cas du CCR (IHCx200 et IHCx100).

A : Marquage membranaire modérée (IHCx200).

B : Marquage membranaire intense (IHCx100).

C : Absence de marquage (IHCx200).

### **III. Résultats de l'analyse de la corrélation de PDL1 avec les différentes protéines :**

Les résultats de l'étude immunohistochimique et les caractéristiques cliniques des 30 cas de Cancer colorectal sont présentées en détail dans le Tableau R (Annexe).

#### **1. PDL1 et protéines MMR :**

Pour les deux cas dMMR, le pourcentage de cellules tumorales PDL 1+ est respectivement <1% et 5%, c'est-à-dire qu'on a une expression nulle à faible du PD-L1. Ces résultats suggèrent que dans le CCR les tumeurs MSI sont PD-L1 négatif, donc on pourra déduire des résultats que le profil pMMR de la tumeur peut être utilisé comme marqueur prédictif de l'efficacité de l'immunothérapie. Or que dans les tumeurs MSS, l'expression de PD-L1 n'est pas forcément positive.

## 2. PDL1 et TILs CD4 /CD8 :

Comme les LT CD8 et CD4 jouent un rôle central dans l'immunité adaptative et dans l'évasion immunitaire associée à l'expression de PD-L1 dans les tumeurs, nous avons évalué leur expression dans les échantillons du CCR (30 cas) afin de déterminer la relation entre l'expression du PD-L1 et l'immunité antitumorale dans le microenvironnement tumoral.

Nous avons constaté qu'il n'existe aucune association significative entre l'expression de PDL1 au niveau des cellules tumorales, et l'expression des Tils CD4/CD8 dans le microenvironnement tumoral. Comme le tableau 6 montre, on peut dire que, de la densité des lymphocytes T CD8 infiltrant les tumeurs n'est pas corrélée à une surexpression de PDL1.

*Tableau 9 : Corrélation entre profil MMR, PDL1 et TILs CD4 /CD8.*

| CAS | %PDL1 | CD4 | CD8          | Profil MMR |
|-----|-------|-----|--------------|------------|
| 1   | <1%   | –   | (+) dans 40% | pMMR       |
| 2   | <1%   | –   | (+) dans 50% | pMMR       |
| 3   | <1%   | –   | (+) dans 80% | pMMR       |
| 4   | 10%   | –   | (+) dans 50% | pMMR       |
| 5   | <1%   | –   | (+) dans 20% | pMMR       |
| 6   | 5%    | –   | (+) dans 90% | pMMR       |
| 7   | <1%   | –   | (+) dans 90% | pMMR       |
| 8   | 20%   | –   | (+) dans 80% | pMMR       |
| 9   | <1%   | –   | (+) dans 20% | pMMR       |
| 10  | 10%   | –   | (+) dans 30% | pMMR       |
| 11  | 25%   | –   | (+) dans 40% | pMMR       |
| 12  | 25%   | –   | (+) dans 20% | pMMR       |
| 13  | 5%    | –   | (+) dans 30% | pMMR       |
| 14  | 25%   | –   | (+) dans 30% | pMMR       |
| 15  | 5%    | –   | (+) dans 25% | pMMR       |
| 16  | <1%   | –   | –            | pMMR       |
| 17  | <1%   | –   | (+) dans 30% | pMMR       |
| 18  | <1%   | –   | (+) dans 20% | pMMR       |
| 19  | <1%   | –   | –            | pMMR       |
| 20  | <1%   | –   | (+) dans 30% | pMMR       |
| 21  | 10%   | –   | –            | pMMR       |
| 22  | <1%   | –   | –            | dMMR       |
| 23  | <1%   | –   | –            | pMMR       |
| 24  | 40%   | –   | –            | pMMR       |
| 25  | 10%   | –   | –            | pMMR       |
| 26  | 25%   | –   | –            | pMMR       |
| 27  | <1%   | –   | –            | pMMR       |
| 28  | 5%    | –   | –            | dMMR       |
| 29  | <1%   | –   | (+) dans 10% | pMMR       |
| 30  | <1%   | –   | –            | pMMR       |



**DISCUSSION**

L'adénocarcinome colorectal est le troisième cancer le plus répandu dans le monde et l'une des principales causes de décès liés au cancer. L'émergence récente de divers agents immunothérapeutiques a rendu cruciale l'interprétation d'un microenvironnement tumoral complexe mêlé à des cellules immunitaires infiltrant la tumeur pour prédire le taux de réponse immunothérapeutique. <sup>[50]</sup>

Cependant, dans l'adénocarcinome colorectal, il manque des études fournissant des analyses détaillées du ligand de mort programmé 1 (PD-L1) et des lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL) pour élucider leurs valeurs pronostiques et identifier les sous-groupes ciblables par immunothérapie, de préférence avec plusieurs immuno- biomarqueurs associés. Dans la présente étude, nous avons évalué l'expression de PDL1 en corrélation avec le profil MMR, et il nous a paru important de connaître l'impact de l'infiltration lymphocytaire dans ces tumeurs, notamment les lymphocytes T cytotoxiques et régulateurs.

Dans le système immunitaire normal, PD-L1 joue un rôle extrêmement important dans le maintien de l'équilibre entre l'immunité protectrice et la tolérance immunitaire dans le corps normal. Après liaison des lymphocytes T à leur récepteur PD-1, PD-L1 peut induire la transmission de signaux inhibiteurs conduisant à l'apoptose des lymphocytes T, régulant ainsi la tolérance immunitaire des lymphocytes T. <sup>[51]</sup>

Dans le microenvironnement tumoral, l'expression de PD-L1 est régulée à la hausse via divers mécanismes, conduisant à l'activation anormale de la voie de signalisation PD-L1 / PD-1. Ceci, à son tour, inhibera la prolifération et la différenciation des cellules T par différents mécanismes, et induit l'apoptose des cellules T, médiant ainsi l'évasion immunitaire tumorale. Dans l'adénocarcinome colorectal, la valeur pronostique de l'expression de PD-L1 a été contradictoire. <sup>[50]</sup>

Le phénotype d'instabilité des microsatellites avec déficience du système de réparation du mésappariement de l'ADN (MSI/dMMR) est observé dans environ 15-18 % des cancers colo-rectaux de stade II, 9-10 % des cas de stade III et 4-5 % des cas de stade IV. <sup>[52]</sup>

Nous avons analysé le statut MMR dans une cohorte (n=30) du CCR en utilisant l'IHC. Nous démontrons que dans notre cohorte, la présence d'un statut dMMR est faible (7%).



L'étude de Sloan et al est la première étude qui a évalué l'association entre l'expression du PDL1 et le statut MMR dans les néoplasmes malins et a été réalisée en 2017. Elle montre que les fréquences d'expression de PD-L1 par immunohistochimie étaient dans 70% des carcinomes de l'endomètre (CE) liés au syndrome de Lynch, 33% des cancers de l'endomètre avec hyperméthylation sporadique du promoteur MLH1 et 10% des CE pMMR. [53]

Dans une autre étude faite par Byeong-Joo Noh et al, la surexpression de PD-L1 était significativement associée au statut dMMR. [50]

Corinna lang-schwarz et al ont démontré que la positivité PD-L1 était significativement corrélée avec les TIL > 5% et le déficit en MMR, et les cas PD-L1 positifs ont montré une survie globale (OS). [54]

Dans la présente étude, On a une forte expression de PD-L1 dans les tumeurs pMMR, mais le rôle prédictif n'est pas assez justificatif étant donné le nombre limité de cas. Nos résultats sont cohérents avec ceux de Raoul A. Drosier et al qui ont démontré une forte expression de PD-L1 chez 37 % des CCR maîtrisant la réparation des mésappariements (pMMR). [55]

Les cellules TCD8 +, qui sont les principales cellules cytotoxiques, jouent un rôle essentiel dans la réponse immunitaire antitumorale à médiation cellulaire. Une étude de Tumeh et al a montré que les lymphocytes T CD8 + préexistants sont essentiels à la régression tumorale après un blocage thérapeutique de PD-1 / PD-L1 dans le mélanome métastatique, indiquant que les CD8 + des TILs jouent un rôle clé dans la réponse au traitement anti-PD-1. [56]

Dans le CCR compétent en MMR (pMMR), une forte expression de PD-L1 était corrélée à l'infiltration par des lymphocytes CD8 +.

Dans plusieurs types tumoraux et notamment dans les cancers colorectaux il a été montré qu'un infiltrat lymphocytaire tumoral CD8+ tumoral est associé à un meilleur pronostic. Dans notre étude, aucune corrélation n'a été détectée entre l'expression de PDL1 et l'expression des TILs CD4 et CD8 dans le microenvironnement tumoral.

Récemment, Teng et al ont proposé de classer les tumeurs en quatre groupes basés sur l'expression de PDL1 et CD8.

Ils ont défini quatre catégories: **type I** résistance immunitaire adaptative (PD-L1 positive et TIL élevée), **type II** ignorance (PD-L1 négative et faible TIL), **type III** induction intrinsèque (PD-L1 positive et faible TIL), et **type IV** tolérance immunitaire (PD-L1 négatif et TIL élevé) Les tumeurs de **type I** sont les plus susceptibles de bénéficier d'un blocage par un seul agent anti – PD-1 /PD-L1, car c'est dans ces tumeurs que des cellules T intratumorales sont préexistantes et sont désactivées par l'engagement de PD-L1. Par conséquent, le fait de pouvoir définir correctement cette catégorie peut permettre de bénéficier d'un traitement anti-PD-1 /PD- L1 en évitant les toxicités et les coûts supplémentaires liés à l'utilisation d'approches d'immunothérapie combinée. La troisième catégorie « **type III** » indique que la positivité de PD-L1 seule ne peut pas être considérée comme un facteur prédictif de la réponse au traitement anti – PD-1 ou anti – PD-L1, car sans TIL dans la tumeur, il est peu probable que le blocage de PD-1 ou de PD-L1 conduise à une réponse des cellules T au cancer. <sup>[57]</sup>

Nous avons caractérisé le statut MMR dans des adénocarcinomes colorectaux par Immunohistochimie et avons conclu que la déficience du MMR est faible. Une forte expression de PD-L1 est associée au statut pMMR, mais suite au faible nombre de cas, l'association entre ces deux marqueurs mériterait de faire l'objet d'une étude plus approfondie avec un plus large échantillon.

Peu d'études ont examiné l'expression de CD4 et CD8 en tant que biomarqueurs prédictifs. En revanche, les CD8 ont été largement étudiés pour leur valeur pronostique dans différents types de cancer. Des études d'immunohistochimie ont montré que les CD8 ont un effet favorable sur la survie globale dans différents types de tumeurs solides. Dans notre étude nous nous sommes basés seulement sur l'étude de l'association entre l'expression des CD8, CD4 et PD-L1 et aucune association significative n'a été détectée.

Les inhibiteurs de l'axe PD-1/PD-L1 ont montré une efficacité thérapeutique dans les cancers colorectaux (CCR) de phénotype MSI (Microsatellite Instability) uniquement. <sup>[58]</sup> Des études prospectives ont montré que la combinaison de l'évaluation de CD8 + et de PD-L1 semble être plus efficace que celle de CD8 + ou PD-L1 seule en tant que marqueur prédictif de la réponse aux inhibiteurs des check points immunitaires.



## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Le CCR représente au Maroc et à travers le monde un vrai problème de santé publique. Il occupe la première place parmi les cancers digestifs dans notre pays. Le protocole de diagnostic du CCR est basé sur la classification OMS 2019 et TNM 2017 qui font l'objet d'un consensus international.

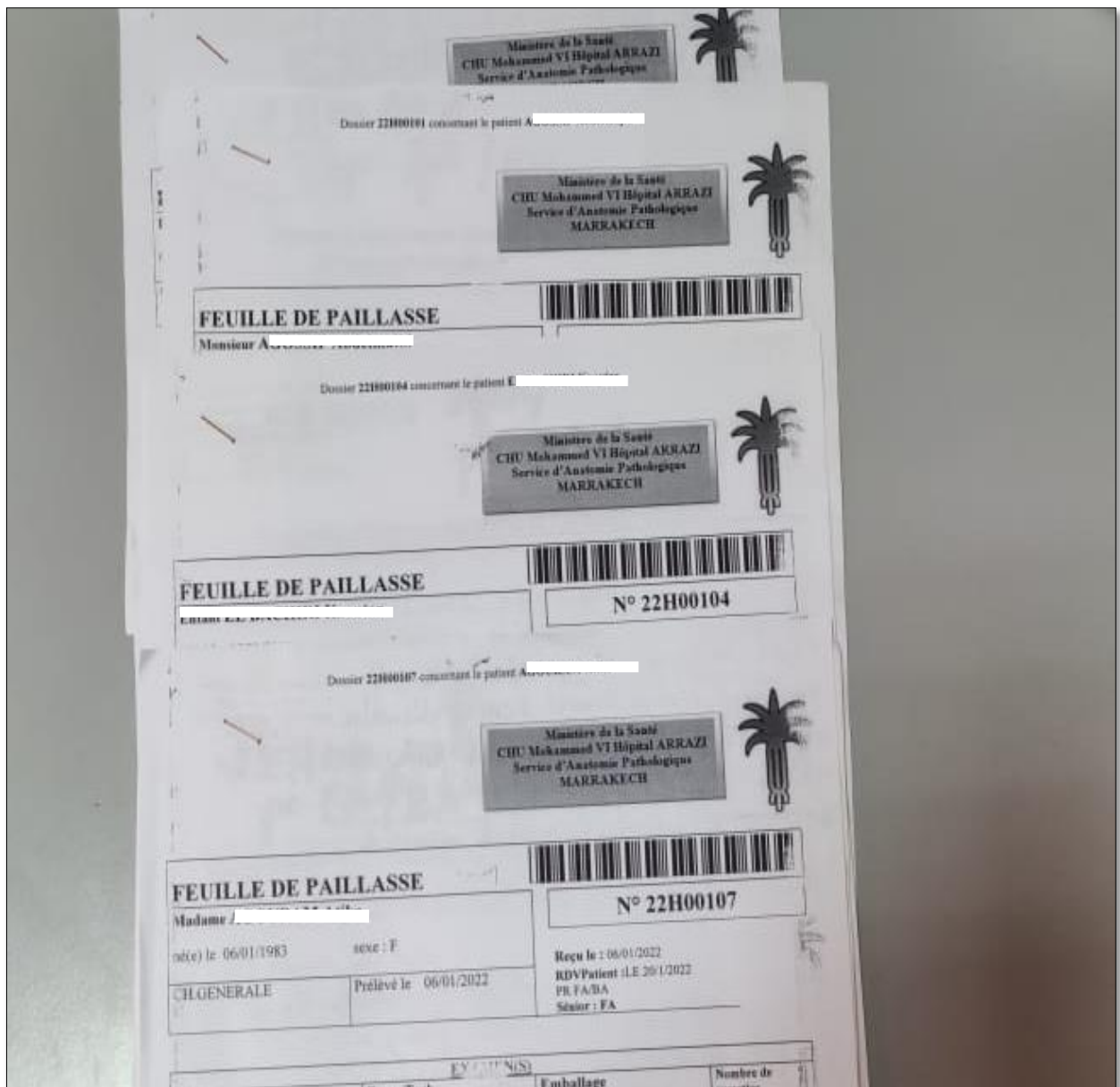
Les immunothérapies anti-checkpoints sont des anticorps monoclonaux dirigés contre les points de contrôle du système immunitaire. Actuellement, les anti-checkpoint qui sont utilisés en oncologie ciblent des récepteurs inhibiteurs présents à la surface des lymphocytes (PD1) ou leur ligand (PD-L1). La voie de signalisation PD-1/PD-L1 a été largement reconnue et soulignée dans la recherche sur l'immunothérapie du cancer, et nous a fourni de nouvelles cibles moléculaires. Par conséquent, PD-L1 pourrait être un nouveau marqueur biologique de l'invasion et des métastases dans le cancer du côlon.

Nous avons caractérisé le statut MMR dans des adénocarcinomes colorectaux par immunohistochimie et nous avons conclu que la déficience du MMR est faible. Une forte expression de PD-L1 est associée au statut pMMR, mais suite au faible nombre de cas, l'association entre ces deux marqueurs mériterait de faire l'objet d'une étude plus approfondie avec un plus large échantillon. Peu d'études ont examiné l'expression de CD8 et CD4 en tant que biomarqueur prédictif. En revanche, les CD8 ont été largement étudiés pour leur valeur pronostique dans différents types de cancer. Des études d'immunohistochimie ont montré que les CD8 ont un effet favorable sur la survie globale dans différents types de tumeurs solides. Dans notre étude nous nous sommes basés seulement sur l'étude de l'association entre l'expression des CD8 /CD4 et PD-L1 et aucune association significative n'a été détectée. Contrairement à certaines tumeurs malignes telles que le mélanome, les cancers du rein et du poumon, le cancer colorectal présente généralement un taux de réponse très faible au blocage de PD-1 ou PD-L1.

A la lumière des données recueillies au cours de cette étude, nous présumant continuer une étude de doctorat, pour instaurer le test de PDL1 de façon consensuelle pour tous les cancers colorectaux. Cette recherche pourra être une étude prospective portant sur une large cohorte de patients ayant des cancers colorectaux pour pouvoir analyser leur statut PDL1 et MMR, et aussi une étude moléculaire pour un ensemble de gènes, dans le but d'élucider une thérapie et d'évaluer le devenir de ces patients.



**ANNEXE 1 :**



Fiches des patients

## ANNEXE 2 :

*Tableau 10: Résultats de l'étude et les caractéristiques cliniques des patients.*

| Cas | Age | Sexe | Nature du prélèvement | Type histologique                      | Profil MMR | CD4 | CD8          | PDL1 |
|-----|-----|------|-----------------------|--|------------|-----|--------------|------|
| 1   | 48  | M    | Pièce opératoire      | Adénocarcinome moyennement différencié | pMMR       | -   | (+) dans 40% | <1%  |
| 2   | 44  | F    | Pièce opératoire      | Adénocarcinome moyennement différencié | pMMR       | -   | (+) dans 50% | <1%  |
| 3   | 37  | M    | Pièce opératoire      | Adénocarcinome moyennement différencié | pMMR       | -   | (+) dans 80% | <1%  |
| 4   | 60  | F    | Pièce opératoire      | Adénocarcinome moyennement différencié | pMMR       | -   | (+) dans 50% | 10%  |
| 5   | 57  | M    | Pièce opératoire      | Adénocarcinome moyennement différencié | pMMR       | -   | (+) dans 20% | <1%  |
| 6   | 51  | M    | Pièce opératoire      | Adénocarcinome bien différencié        | pMMR       | -   | (+) dans 90% | 5%   |
| 7   | 48  | M    | Pièce opératoire      | Adénocarcinome moyennement différencié | pMMR       | -   | (+) dans 90% | <1%  |
| 8   | 56  | M    | Pièce opératoire      | Adénocarcinome moyennement différencié | pMMR       | -   | (+) dans 80% | 20%  |
| 9   | 60  | F    | Pièce opératoire      | Adénocarcinome moyennement différencié | pMMR       | -   | (+) dans 20% | <1%  |
| 10  | 58  | M    | Pièce opératoire      | Adénocarcinome moyennement différencié | pMMR       | -   | (+) dans 30% | 10%  |
| 11  | 55  | M    | Pièce opératoire      | Adénocarcinome bien différencié        | pMMR       | -   | (+) dans 40% | 25%  |
| 12  | 37  | M    | Pièce opératoire      | Adénocarcinome moyennement différencié | pMMR       | -   | (+) dans 20% | 25%  |
| 13  | 67  | F    | Pièce opératoire      | Adénocarcinome moyennement différencié | pMMR       | -   | (+) dans 30% | 5%   |
| 14  | 64  | F    | Pièce opératoire      | Adénocarcinome moyennement différencié | pMMR       | -   | (+) dans 30% | 25%  |
| 15  | 58  | M    | Pièce opératoire      | Adénocarcinome moyennement différencié | pMMR       | -   | (+) dans 25% | 5%   |
| 16  | 58  | M    | Pièce opératoire      | Adénocarcinome moyennement différencié | pMMR       | -   | -            | <1%  |
| 17  | 81  | M    | Pièce opératoire      | Adénocarcinome moyennement différencié | pMMR       | -   | (+) dans 30% | <1%  |
| 18  | 70  | M    | Pièce opératoire      | Adénocarcinome mucineux                | pMMR       | -   | (+) dans 20% | <1%  |
| 19  | 47  | F    | Pièce opératoire      | Adénocarcinome mucineux                | pMMR       | -   | -            | <1%  |
| 20  | 62  | F    | Pièce opératoire      | Adénocarcinome moyennement différencié | pMMR       | -   | (+) dans 30% | <1%  |
| 21  | 43  | M    | Pièce opératoire      | Adénocarcinome peu différencié         | pMMR       | -   | -            | 10%  |
| 22  | 44  | F    | Pièce opératoire      | Adénocarcinome mucineux                | dMMR       | -   | -            | <1%  |
| 23  | 60  | F    | Pièce opératoire      | Adénocarcinome moyennement différencié | pMMR       | -   | -            | <1%  |
| 24  | 62  | M    | Pièce opératoire      | Adénocarcinome mucineux                | pMMR       | -   | -            | 40%  |
| 25  | 64  | F    | Pièce opératoire      | Adénocarcinome moyennement différencié | pMMR       | -   | -            | 10%  |
| 26  | 61  | M    | Pièce opératoire      | Adénocarcinome bien différencié        | pMMR       | -   | -            | 25%  |
| 27  | 66  | F    | Pièce opératoire      | Adénocarcinome mucineux                | pMMR       | -   | -            | <1%  |
| 28  | 45  | M    | Pièce opératoire      | Adénocarcinome peu différencié         | dMMR       | -   | -            | 5%   |
| 29  | 56  | F    | Pièce opératoire      | Adénocarcinome mucineux                | pMMR       | -   | (+) dans 10% | <1%  |
| 30  | 47  | M    | Pièce opératoire      | Adénocarcinome moyennement différencié | pMMR       | -   | -            | <1%  |



## **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



1. Nogtegaal ID, Aneds MJ, salto-Tellez M. WHO classification of tumors.5TH
2. Bouvier A.-M., Lepage C, Faivre J. Epidémiologie des cancers du tube digestif. *Encycl Méd Chir, Gastro-entérologie* 2009;9-000-E-12.
3. International Agency for Research on Cancer Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2015 [en ligne] Disponible sur : <http://globocan.iarc.fr> .Consulte le 24 octobre 2018
4. Global Cancer Observatory (2020) Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>. Accessed April 22, 2021
5. F. Marguet, A. Lamy, F. Le Pessot, J.C. Sabourin, Détection de l'instabilité génétique (instabilité microsatellitaire)
6. Zaanan, J. Taïeb, MSI phenotype and resectable colorectal cancer: clarifying things
7. Lugli A, Karamitopoulou E, Zlobec I (2012) Tumour budding: a promising parameter in colorectal cancer. *Br J Cancer* 106:1713– 1717. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.127> 15.
8. Van Wyk HC, Park J, Roxburgh C, Horgan P, Foulis A, McMillan DC (2015) The role of tumour budding in predicting survival in patients with primary operable colorectal cancer: a systematic review. *Cancer Treat Rev* 41:151–159.
9. Mei Z, Liu Y, Liu C, Cui A, Liang Z, Wang G, Peng H, Cui L, Li C (2014) Tumour-infiltrating inflammation and prognosis in colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer* 110:1595–1605.
10. Sorensen SF, Demuth C, Weber B, Sorensen BS, Meldgaard P. Increase in soluble PD-1 is associated with prolonged survival in patients with advanced EGFR-mutated non-small cell lung cancer treated with erlotinib. *Lung Cancer*. 2016;100:77-84
11. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012;12: 252–264
12. Okita R, Maeda A, Shimizu K, Nojima Y, Saisho S, Nakata M. PD-L1 overexpression is partially regulated by EGFR/HER2 signaling and associated with poor prognosis in patients with non-small-cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2017;66:865–876. [PubMed] [Google Scholar]
13. AiErken N, Shi HJ, Zhou Y, Shao N, Zhang J, Shi Y, Yuan ZY, Lin Y. High PD-L1 expression is closely associated with tumor-infiltrating lymphocytes and leads to good clinical outcomes in Chinese triple negative breast cancer patients. *Int J Biol Sci*. 2017;13:1172–1179. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
14. Wang Y, Lin JC, Cui JJ, Han T, Jiao F, Meng Z, Wang L. Prognostic value and clinicopathological features of PD-1/PD-L1 expression with mismatch repair status and desmoplastic stroma in Chinese patients with pancreatic cancer. *Oncotarget*. 2017;8:9354–9365. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
15. Calderaro J, Rousseau B, Amaddeo G, Mercey M, Charpy C, Costentin C, Luciani A, Zafrani ES, Laurent A, Azoulay D, Lafdil F, Pawlotsky JM. Programmed death ligand 1 expression in hepatocellular carcinoma: relationship with clinical and pathological features. *Hepatology*. 2016;64:2038–2046. [PubMed] [Google Scholar]
16. Massi D, Brusa D, Merelli B, Falcone C, Xue G, Carobbio A, Nassini R, Baroni G, Tamborini E, Cattaneo L, Audrito V, Deaglio S, Mandalà M. The status of PD-L1 and tumor-infiltrating immune cells predict resistance and poor prognosis in BRAFi-treated melanoma patients harboring mutant BRAFV600. *Ann Oncol*. 2015;26:1980–1987. [PubMed] [Google Scholar]
17. [arcagy.org/infocancer/localisations/appareil-digestif/cancer-colon-et-rectum/maladie/epidemiologie.html](http://arcagy.org/infocancer/localisations/appareil-digestif/cancer-colon-et-rectum/maladie/epidemiologie.html), 24 avril 2021
18. Al Hilal M. Etude épidémiologie du cancer (malades de l'INO entre 1985-2002)

19. Dr Desseigne Françoise, Digestif, Oncogénétique, Cancérologie médicale. Centre de lutte contre le Cancer Léon Bérard, Département Prévention Cancer Environnement
20. Julie Giorgetta, Côlon : définition, anatomie, schéma. 2019/Anatomie du côlon – By BruceBlaus. Blausen.com staff., via Wikimedia Commons
21. Véronique Molénat Publié le 18/02/2022
22. e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-colon/Le-diagnostic
23. Abraham L. Kierszenbaum (2006). Histologie et biologie cellulaire: Une introduction à l'anatomie pathologique Bruxelles, De Boeck and Larcier s.a.
24. Pr Michel Ducreux, Traitement du cancer colorectal. Disponible sur : <https://www.gustaveroussy.fr/fr/cancer-colorectal/traitement>
25. Favoriti P, Carbone G, Greco M, Pirozzi F, Pirozzi RE, Corcione F. Worldwide burden of colorectal cancer: a review. *Updates Surg.* 2016;68:711. [PubMed] [Google Scholar]
26. Ada Collura, Jérémie H. Lefevre, Magali Svrcek, David Tougeron, Aziz Zaanan et Alex Duval Microsatellite instability and cancer: from genomic instability to personalized medicine
27. Modrich P. Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annu Rev Genet* 1991; 25: 229–53.
28. J. Selves, J. Meilleroux, D. Grand, R. Guimbaud L'instabilité microsatellitaire : un marqueur pour l'immunothérapie des cancers
29. Alex Duval and Richard Hamelin, Réparation des erreurs de réplication, microsatellites et cancer, 2003
30. Newbold R. Cancer : mutant ras proteins and cell transformation. *Nature.* 1984;310(5979):628-9.
31. Chang EH, Furth ME, Scolnick EM, Lowy DR. Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal human gene homologous to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus. *Nature.* 1982;297(5866):479-83.
32. Lievre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol.* 2008;26(3):374-9.
33. ref-oncomip-2017-biologie-moleculaire
34. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012;12: 252–264.
35. Sorensen SF, Demuth C, Weber B, Sorensen BS, Meldgaard P. Increase in soluble PD-1 is associated with prolonged survival in patients with advanced EGFR-mutated non-small cell lung cancer treated with erlotinib. *Lung Cancer.* 2016;100:7784.
36. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(4):252–64.
37. Francisco, L. M., Salinas, V. H., Brown, K. E., Vanguri, V. K., Freeman, G. J., Kuchroo, V. K., & Sharpe, A. H. (2009). PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(13), 3015–3029.
38. Noh, H., Hu, J., Wang, X., Xia, X., Satelli, A., and Li, S. (2015). Immune checkpoint regulator PD-L1 expression on tumor cells by contacting CD11b positive bone marrow derived stromal cells. *Cell Commun. Signal.* CCS 13,14.
39. Nguyen, L.T., and Ohashi, P.S (2015). Clinical blockade of PD1 and LAG3—potential mechanisms of action. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 45-56.
40. Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. & Schreiber, R. D. Cancer immunoeediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3, 991–998 (2002).
41. Schreiber, R. D., Old, L. J. & Smyth, M. J. Cancer Immunoeediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science (80- )*. 331, 1565–1570 (2011).

42. Spiotto, M. T., Rowley, D. A. & Schreiber, H. Bystander elimination of antigen loss variants in established tumors. *Nat. Med.* 10, 294–298 (2004)
43. Seliger, B., Cabrera, T., Garrido, F. & Ferrone, S. HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. *Semin. Cancer Biol.* 12, 3–13 (2002).
44. Domagala-Kulawik, J., Osinska, I., and Hoser, G. (2014). Mechanisms of immune response regulation in lung cancer. *Transl. Lung Cancer Res.* 3, 19-22.
45. Van der Burg, S. H., Arens, R., Ossendorp, F., van Hall, T. & Melief, C. J. M. Vaccines for established cancer: overcoming the challenges posed by immune evasion. *Nat. Rev. Cancer* 16, 219–233 (2016).
46. Smyth, M. J., & Teng, M. W. (2018). 2018 Nobel Prize in physiology or medicine. *Clinical & Translational Immunology*, 7(10), e1041.
47. Marie Kostine, Aurélien Marabelle, Thierry Schaeffer, et Maria Kfoury, Toxicities of immune checkpoint inhibitors and their management
48. Perrine Vuagnat, Stéphane Champiat, Immunothérapies anti-checkpoints : aspects fondamentaux
49. Sorensen SF, Demuth C, Weber B, Sorensen BS, Meldgaard P. Increase in soluble PD-1 is associated with prolonged survival in patients with advanced EGFR-mutated non-small cell lung cancer treated with erlotinib. *Lung Cancer.* 2016;100:77-84.
50. Byeong-Joo Noh, Jae Young Kwak and Dae-Woon Eom, Immune classification for the PD-L1 expression and tumour-infiltrating lymphocytes in colorectal adenocarcinoma
51. Frydenlund N, Mahalingam M. PD-L1 and immune escape: insights from melanoma and other lineage-unrelated malignancies. *Hum Pathol.* 2017;66:13–33. [PubMed] [Google Scholar]
52. Thierry ANDRÉ, Immunothérapie dans les cancers colo-rectaux avec instabilité des microsatellites (MSI+)
53. Sloan EA, Ring KL, Willis BC *et al.* PD-L1 expression in mismatch repair-deficient endometrial carcinomas, including lynch syndrome-associated and MLH1 promoter hypermethylated tumors. *Am J Surg Pathol* 2017;41:326–333.
54. Corinna Lang-Schwarz · Balint Melcher · Arndt Hartmann · Simone Bertz · Theresa Dregelies · Klaus Lang-Schwarz · Michael Vieth · William Sterlacci, Programmed death ligand 1 (PD-L1) in colon cancer and its interaction with budding and tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) as tumor-host antagonists
55. Raoul A. Droeser<sup>abh</sup> Christian Hirt<sup>abh</sup> Carsten T. Viehl<sup>a</sup> Daniel M. Frey<sup>a</sup> Christian Nebiker<sup>ab</sup> Xaver Huber<sup>a</sup> Inti Zlobec<sup>c</sup> Serenella Eppenberger-Castori<sup>d</sup> Alexander Tzankov<sup>d</sup> Raffaele Rosso<sup>e</sup> Markus Zuber<sup>f</sup> Manuele Giuseppe Muraro<sup>b</sup> Francesca Amicarella<sup>b</sup> Eleonora Cremonesi<sup>b</sup> Michael Heberer<sup>b</sup> Giandomenico Alezzi<sup>b</sup> Alessandro Lugli<sup>c</sup> Luigi Terracciano<sup>d</sup> ... Luigi Tornillo<sup>d</sup>, Clinical impact of programmed cell death ligand 1 expression in colorectal cancer
56. Tumeh, P. C., Harview, C. L., Yearley, J. H., Shintaku, I. P., Taylor, E. J. M., Robert, L., ... Ribas, A. (2014). *PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance.* *Nature*, 515(7528), 568–571.
57. Teng, M. W. L., Ngiow, S. F., Ribas, A., & Smyth, M. J. (2015). *Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1.* *Cancer Research*, 75(11), 2139–2145.
58. Ott Eva, Dansette Delphine, Ouairy Adrien, Jarry Anne, Bézieau Stéphane, Mosnier Jean-François, Toquet Claire, Bossard Céline, P487 - Profils d'expression de PD-1, PD-L1, IDO-1 dans les cancers colorectaux en fonction du statut microsatellitaire et du sous-type histologique.

