

Table des matières

INTRODUCTION	1
I. Le système MMR et les conséquences de sa déficience.....	3
A. Le phénotype tumoral MSI	3
1. La découverte d'un nouveau mécanisme de tumorigenèse.....	3
2. Définition du phénotype tumoral MSI	3
B. Les conséquences de l'inactivation du système MMR.....	6
1. Les microsatellites codants.....	6
2. Les microsatellites non codants.....	9
3. Les mutations non répétées	11
II. Les cancers gastro-intestinaux MSI	15
A. La classification moléculaire des tumeurs MSI	15
B. Le syndrome de Lynch.....	16
1. Historique et découverte	16
2. Définition et caractéristiques génétiques	16
3. Les caractéristiques épidémiologiques et cliniques du LS	17
4. Les critères d'identification du Syndrome de Lynch	19
C. Les tumeurs sporadiques.....	20
1. Les cancers colorectaux MSI sporadiques	21
2. Les cancers gastriques MSI sporadiques	22
D. La détermination du statut MSI	23
1. Diagnostique par PCR	24
2. Analyse immunohistochimique	26
E. La chimiothérapie.....	27
1. Les protocoles de traitements.....	29
2. La valeur prédictive du statut MSI.....	30

F. L'émergence des immunothérapies	32
III. La protéine chaperonne HSP110	35
A. Les caractéristiques de la chaperonne HSP110	38
B. Les fonctions de la protéine chaperonne HSP110	39
C. Le rôle de la chaperonne HSP110 dans la tumorigenèse	41
IV. Le système « Nonsense-mediated mRNA decay »	45
A. L'implication du NMD dans le cancer	48
B. Les différentes méthodes d'inhibition du NMD	50
RESULTATS	53
"HSP110 promotes colorectal cancer growth through STAT3 activation"	55
"Mutation of HSP110 in gastric cancer with microsatellite instability is deleterious for cancer cells and improves disease prognosis"	60
"Targeting Nonsense-Mediated mRNA Decay is deleterious for MSI Colorectal Cancer"	64
DISCUSSION & PERSPECTIVES	69
I. La mutation étonnante du gène <i>HSP110</i> dans les tumeurs MSI	71
II. Le rôle du système NMD dans la carcinogenèse MSI	77
ANNEXES	81
Le rôle de la localisation nucléaire d'HSP110 dans la réponse au traitement et la progression tumorale colique	83
"HSP110 T ₁₇ simplifies and improves the microsatellite instability testing in patients with colorectal cancer"	89
BIBLIOGRAPHIE	93

Table des illustrations 1

FIGURE 1 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU FONCTIONNEMENT DU SYSTEME MMR CHEZ LES MAMMIFERES	5
FIGURE 2: REPRESENTATION NON EXHAUSTIVE DES GENES CIBLES DE L'INSTABILITE MICROSATELLITAIRE DANS LES CANCERS MSI	7
FIGURE 3: ADAPTATION DE LA REPRESENTATION DES MUTATIONS DES GENES CIBLES DE L'ONCOGENESE COLIQUE MSI D'APRES LE MODELE <i>SELTARBASE</i>	8
FIGURE 4 : LOCALISATION DES MICROSATELLITES AU SEIN DU GENOME	9
FIGURE 5 : DETERMINATION DU STATUT MSI DES TUMEURS PAR PCR (PENTAPLEX)	24
FIGURE 6 : DETERMINATION DU STATUT MSI DES TUMEURS PAR IMMUNOHISTOCHIMIE	26
FIGURE 7 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA CLASSIFICATION TNM DES TUMEURS COLIQUES ET GASTRIQUES	28
FIGURE 8 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU ROLE DES HSP DANS LA CELLULE.....	36
FIGURE 9 : L'IMPLICATION DES CHAPERONNES HSP DANS LE CANCER.	37
FIGURE 10 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU GENE <i>HSP110</i> ET DES ISOFORMES <i>HSP110A</i> ET <i>HSP110B</i>	39
FIGURE 11 : LA MUTATION DE LA CHAPERONNE <i>HSP110</i> DANS LES CCR MSI	43
FIGURE 12 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU MODELE D'ACTIVATION DU SYSTEME NMD DEPENDANT DES EJC.	46
FIGURE 13 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU ROLE D' <i>HSP110</i> DANS L'ACTIVATION DE LA VOIE STAT3 PAR L'IL-6.	58
FIGURE 14 : MODELE D'ACTION DU SYSTEME NMD ET DE SON INHIBITION DANS LES CANCERS MSI.	67
FIGURE 15 : EVALUATION DES CARACTERISTIQUES CLINIQUES ET MOLECULAIRES DES SOURIS <i>MSH2^{KO}HSP110^{KI/KI}</i> COMPARES AUX SOURIS <i>MSH2^{KO}HSP110^{WT}</i>	73
FIGURE 16 : <i>HSP110</i> NUCLEAIRE, UN FACTEUR PREDICTIF DE REPONSE A LA CHIMIOTHERAPIE	85
FIGURE 17 : ETUDE MOLECULAIRE ET FONCTIONNELLE DE L'IMPACT DE LA LOCALISATION NUCLEAIRE D' <i>HSP110</i> <i>IN VITRO</i>	87

Table des illustrations 2

TABLEAU 1 : LES CRITERES D'AMSTERDAM I ET II.....	19
TABLEAU 2 : LES CRITERES DE BETHESDA REVISES.....	20
TABLEAU 3 : CLASSIFICATION DEPENDANTE DU STADE TUMORAL DES TUMEURS COLIQUES ET GASTRIQUES	28

Abréviations

5-FU: 5-fluorouracile

ADP: adénosine diphosphate

ADN: acide désoxyribonucléique

ARN: acide ribonucléique

ARNm: acide ribonucléique
messager

ASO: oligonucléotide anti-sens

ATP: adénosine triphosphate

CCR: cancer colorectal

CCRM: cancer colorectal
métastatique

CG: cancer gastrique

CIMP: *CpG island methylator
phenotype*

DECID: *decay-inducing complex*

dMMR: MMR-déficient

DFS : *disease free survival*

EJC: *exon junction complex*

eRF: *eukaryotic release factor*

FdUMP: fluorodésoxyuridine
monophosphate

FdUTP : fluorodésoxyuridine
triphosphate

FUMP : fluorouridine triphosphate

GINI : *gene identification by NMD
inhibition*

GST: gene suppresseur de tumeurs

HNPCC: *hereditary non polyposis
colorectal cancer*

HSP: heat shock protein

ICK: *immune checkpoints*

IDL: insértions-délétions

IHC: Immunohistochimie

IRI: irinotécan

LS: syndrome de lynch

LV: leucovorine

miARN: micro-ARN

MLH: *mutL homolog*

MMR: mismatch repair

MSH: *mutS homolog*

MSI : *microsatellite instability*

MSS : microsatellite stable

NES: *nuclear export signal*

NGS: *next generation sequencing*

NLS: *nuclear localization signal*

NMD: *nonsense-mediated mRNA decay*

NMDI-1: *NMD inhibitor 1*

OS: *overall survival*

OXA: oxaliplatine

PCR: *polymerase chain reaction*

PFS: *progression free survival*

pMMR: MMR-proficient

PMS: *post-meiotic segregation*

PTC: *premature termination codon*

SBD: *substrate binding domain*

SMG: *suppressor with morphogenetic effect on genitalia*

SO: *spliced-out*

SURF: SMG1-UPF1-eRF1-eRF3

TCGA: *the cancer genome atlas*

TNM: tumeur primitive - ganglions lymphatiques régionaux – métastase à distance

TS: thymidylate synthase

UPF: *up-frameshift*

Avant-propos

Mon projet de thèse a été réalisé au sein de l'équipe « Instabilité des microsatellites et cancer » dont la thématique de recherche est l'étude du type tumoral MSI, consécutif à l'inactivation du système MMR (Mismatch Repair) dans ces tumeurs. Cette équipe, dirigée par Alex DUVAL, est située au sein du centre de recherche Saint Antoine, localisée dans l'enceinte de l'hôpital Saint-Antoine, dont l'une des activités cliniques majeures est l'oncologie digestive. En 2011, mon laboratoire d'accueil a identifié la protéine chaperonne HSP110 comme cible de l'instabilité microsatellitaire dans les cancers colorectaux (CCR) MSI. Cette mutation affecte un microsatellite non codant du gène codant cette chaperonne, localisé au niveau d'une borne d'épissage (site polypyrimidique), perturbant l'épissage de la protéine par saut d'exon (exon 9). Elle inactive *HSP110* en conséquence, ce qui induit une sensibilité des cellules à la chimiothérapie. Cette mutation est un facteur prédictif positif de réponse à la chimiothérapie chez les patients atteints de CCR MSI.

L'introduction de ce manuscrit est divisée en quatre grands chapitres. Dans un premier chapitre, je décris brièvement le système de réparation MMR et les conséquences de son inactivation sur l'instabilité des séquences répétées et non répétées du génome qui est un processus sous-jacent au développement tumoral MSI. Les principales caractéristiques moléculaires et cliniques des cancers coliques et gastriques MSI sont décrites dans un deuxième chapitre introductif. Le troisième chapitre se focalise sur la chaperonne HSP110 et rapporte synthétiquement nos connaissances sur son rôle dans le cancer. Enfin, la dernière partie de cette introduction porte sur le système NMD (*Nonsense mediated mRNA decay*) et sur l'impact de ce système de surveillance de la transcription dans les cancers MSI, puisque son activité est requise pour réguler l'expression des nombreux mutants générés par l'instabilité microsatellitaire dans ce modèle tumoral hyper instable.

Les résultats décrits au sein de ce manuscrit sont présentés à la suite, sous la forme de 3 articles originaux, qui sont publiés (Article 1), soumis à publication (Article 2) ou en cours de rédaction (Article 3). La présentation de ces articles est précédée d'un résumé français écrit et graphique.

Dans le cadre de ma thèse, j'ai aussi eu l'opportunité de participer et d'initier d'autres travaux de recherche, qui figurent dans ce manuscrit sous forme d'annexes.

INTRODUCTION

I. Le système MMR et les conséquences de sa déficience

A. Le phénotype tumoral MSI

1. La découverte d'un nouveau mécanisme de tumorigenèse

En 1993, M. Perucho et ses collègues publient dans la revue *Nature* une étude dans laquelle 12% des tumeurs du côlon présentent des délétions somatiques au niveau de diverses séquences répétées simples³. Au cours de la même année, deux autres équipes rapportent le même type d'instabilité au niveau de séquences répétées de l'ADN, appelées microsatellites, dans des cancers colorectaux (CCR) sporadiques, ainsi que dans la majorité des CCR héréditaires, dits HNPCC (*Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer*)^{4,5}. Ces trois études princeps ont ainsi décrit l'apparition d'un nouveau mécanisme de carcinogénèse colique, différent du modèle proposé par Fearon et Volgestein, caractérisé par une atteinte séquentielle d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs⁶. Ce nouveau mécanisme de carcinogénèse d'abord appelé RER (*Replication Error*) ou MIN (*Microsatellite Instability*), a par la suite été renommé MSI (*Microsatellite Instability*) lors d'un consensus international qui a eu lieu à Bethesda en décembre 1997⁷.

2. Définition du phénotype tumoral MSI

Contrairement aux tumeurs MSS (*Microsatellite Stable*), caractérisées par une instabilité génomique liée à des remaniements chromosomiques, les tumeurs MSI sont caractérisées par un caryotype normal dans la majorité des cas (75%) et par une accumulation d'altérations (insertions ou délétions) nucléotidiques au niveau de séquences microsatellitaires suite à l'inactivation d'un des systèmes de réparation de l'ADN, le système MMR (*MisMatch Repair*), responsable de la reconnaissance et de la réparation des mésappariements de bases au niveau de l'ADN.

Les microsatellites constituent environ 3% du génome⁸. Il s'agit de répétitions en tandem d'un motif (de 1 à 5 nucléotides), réparties dans tout le génome avec une prépondérance au niveau des régions non codantes. En raison de leur nature, ces séquences sont des points chauds de mutation dues à des erreurs de réplication via le glissement de l'ADN polymérase sur la séquence d'ADN. Ainsi, l'instabilité au niveau de ces séquences se traduit par des insertions ou des délétions d'un ou de plusieurs bases. Chez la bactérie *Escherichia Coli*, l'inactivation du système MMR a pour

conséquence une augmentation du taux de mutations spontanées en raison de l'incapacité à réparer les erreurs de réplication ⁹⁻¹¹. Au vu de ces données, il a été suggéré qu'un défaut de ce système de réparation pourrait provoquer une instabilité observée au niveau des microsatellites dans certains cancers humains.

Une description succincte de ce système de réparation et les étapes de son fonctionnement sont décrites dans la Figure 1.

Le système MMR

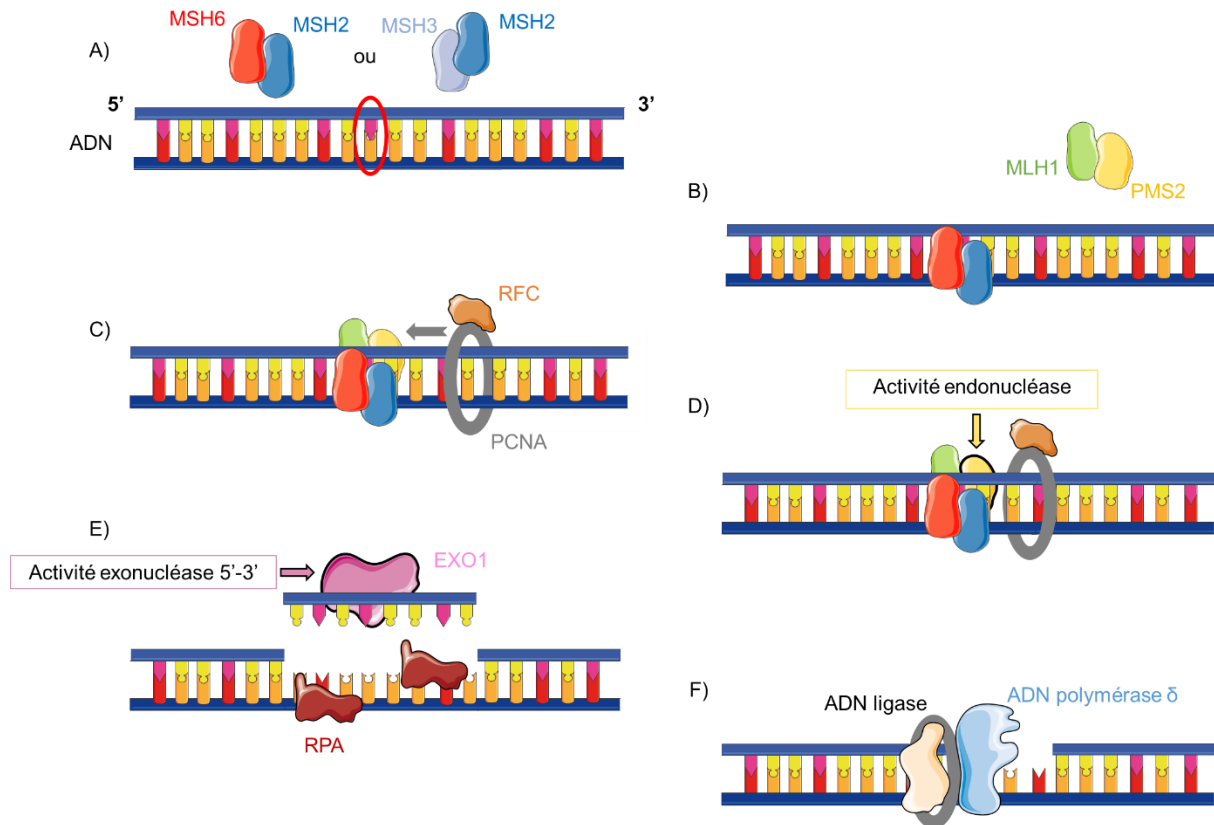


Figure 1 : Représentation schématique du fonctionnement du système MMR chez les mammifères

(A) Les mésappariements au niveau de l'ADN (cercle rouge) sont reconnus (i) soit par le complexe MutSα (MSH2-MSH6), capable de reconnaître les mésappariements de base et de petites structures en épingles suite à l'insertion ou délétion de bases (IDL) de 1-2 paires de bases ; (ii) soit par l'hétérodimère MutSβ (MSH2-MSH3), responsable de la reconnaissance de structures en épingles causés par les IDL (> 2 paires de base). (B) Suite à la reconnaissance de ces mésappariements, le complexe MutLα (MLH1-PMS2) subit une modification conformationnelle (ATP dépendante), lui permettant d'être recruté au niveau du mésappariement. (C) La protéine PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) est alors recrutée au niveau de l'ADN par le facteur de réplication RFC (*Replication Factor C*), (D) lui permettant d'interagir avec MutLα. Cette interaction entraîne l'activation de l'activité endonucléasique de PMS2 (jaune), nécessaire à l'excision en 3' du mésappariement. (E) L'exonucléase 5'-3' EXO1 (rose) est ensuite recrutée et induit l'excision du brin d'ADN contenant le mésappariement alors que les protéines RPA se lient à l'ADN simple brin généré par l'excision afin de le protéger de la dégradation. Lorsque le mésappariement est éliminé, (F) l'ADN polymérase δ ainsi que l'ADN ligase sont recrutées au niveau de l'ADN excisé afin de synthétiser et de relier le nouveau brin d'ADN correspondant. (Adapté de S. Li et al., 2016¹²).

B. Les conséquences de l'inactivation du système MMR

La déficience du système MMR est responsable du phénotype hypermutateur des tumeurs MMR-déficientes (dMMR) ou MSI. Cette inactivation induit l'accumulation de mutations au niveau de séquences répétées microsatellitaires et non répétées de l'ADN ^{13,14}. Il convient de préciser que l'inactivation du système MMR n'est pas en soi un évènement transformant pour la cellule dMMR, mais est responsable d'un processus général d'instabilité génomique favorisant le développement tumoral.

1. Les microsatellites codants

Environ 20% des gènes humains contiennent au niveau de leur région codante une répétition microsatellitaire supérieure ou égale à 7 nucléotides ¹⁵, ce qui rend très élevé le nombre potentiel de gènes cibles de l'instabilité microsatellitaire, aussi appelés gènes cibles MSI. Les altérations au niveau de ces répétitions entraînent majoritairement un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré au niveau du transcrit messager. Dans la majorité des cas, une inactivation fonctionnelle de la protéine correspondante est observée, conférant un avantage sélectif à la cellule tumorale MMR-déficiente ¹⁶.

Divers travaux ont rapporté l'existence de nombreuses mutations au niveau de microsatellites codants dans des cancers MSI (côlon, estomac, endomètre). Ces mutations affectent des gènes impliqués dans de nombreux processus incluant la régulation du cycle et/ou de la prolifération cellulaire (*TGFBR2*, *IGF2R*, *TCF4*, *AXIN2*, *PTEN*, *RIZ...*), la régulation de l'apoptose (*BAX*, *CASP5*, *BCL10*, *APAF1*, *FAS...*), ou encore la réparation ou la signalisation des dommages de l'ADN (*RAD50*, *BLM*, *MSH3*, *MSH6*, *MBD4*, *MLH3*, *CHK1*, *ATR...*) (Figure 2) ^{17,18}. Au cours des dernières années, de nouveaux gènes cibles MSI ont été mis en évidence incluant des gènes impliqués dans la maturation et l'export nucléaire des micro-ARN (miRNA) ainsi que dans la régulation de l'état de la chromatine ¹⁹. Outre l'identification de gènes cibles MSI, la véritable problématique, aujourd'hui, est de mettre en évidence les gènes impliqués dans le développement tumoral MSI, parmi la multitude de gènes mutés ne contribuant pas à la tumorigenèse dans ce contexte (bruit de fond MSI).

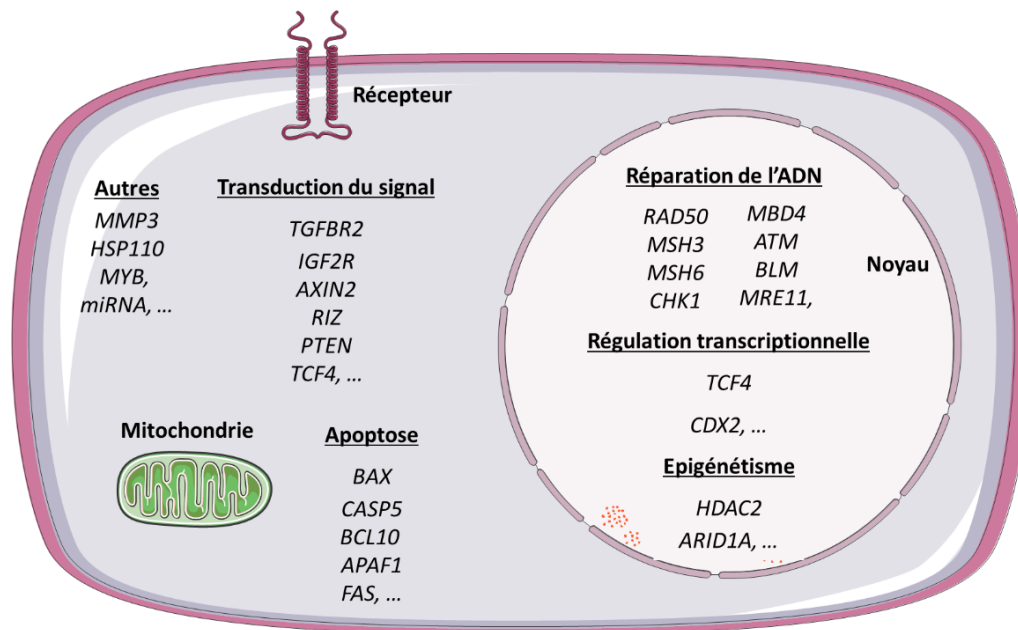


Figure 2: Représentation non exhaustive des gènes cibles de l'instabilité microsatellitaire dans les cancers MSI. De nombreux gènes cibles de l'instabilité microsatellitaire ont été identifiés dans les cancers gastro-intestinaux de type MSI. Cependant, il est à noter que l'impact oncogénique n'a pas été prouvé dans tous les cas rapportés. (Adapté de Yamamoto H. et al., 2015¹⁹).

De manière attendue, l'immense majorité des gènes contenant un microsatellite codant sont des points chauds de mutations du fait de l'instabilité microsatellitaire dans ces tumeurs. Cependant, les fréquences de mutations semblent varier en fonction de la contribution de ces gènes à l'oncogénèse. Par exemple, le gène *TGFR2* (*Transforming Growth Factor β Receptor 2*), codant pour une sérine/thréonine kinase, est muté dans environ 90% des tumeurs coliques MSI alors que 40% de ces tumeurs présentent une mutation sur le gène *BAX* (*Bcl-2-Associated X protein*), codant pour une protéine pro-apoptotique¹⁸. En 2002, un modèle a été suggéré afin d'associer la fréquence mutationnelle au rôle du gène cible dans la cellule tumorale. Ainsi, l'existence de classe de gènes cibles MSI a été proposé incluant (i) les gènes dits « transformateurs », dont les mutations sont soumises à une pression de sélection positive et qui donc présentent un taux de mutation élevé ; (ii) les gènes dits « survivors », soumis à une pression de sélection négative et qui donc seraient mutés à très basse fréquence dans les cellules tumorales MSI¹⁸. En accord avec ces données, le concept de mutations sélectionnées et contre sélectionnées au niveau de microsatellites mononucléotidiques exoniques et introniques a été proposé (Figure 3). Un modèle de

prédiction *Seltarbase*, se basant sur la corrélation entre la taille du microsatellite et le taux de mutation du gène, a été constitué à partir de données de la littérature afin d'identifier les gènes cibles MSI participant au développement tumoral ²⁰. De manière intéressante, ce modèle a aussi permis d'identifier certains gènes dont les mutations sont contre-sélectionnées dans le processus tumoral MSI (*RFC3* et *CDH2*) ²¹.

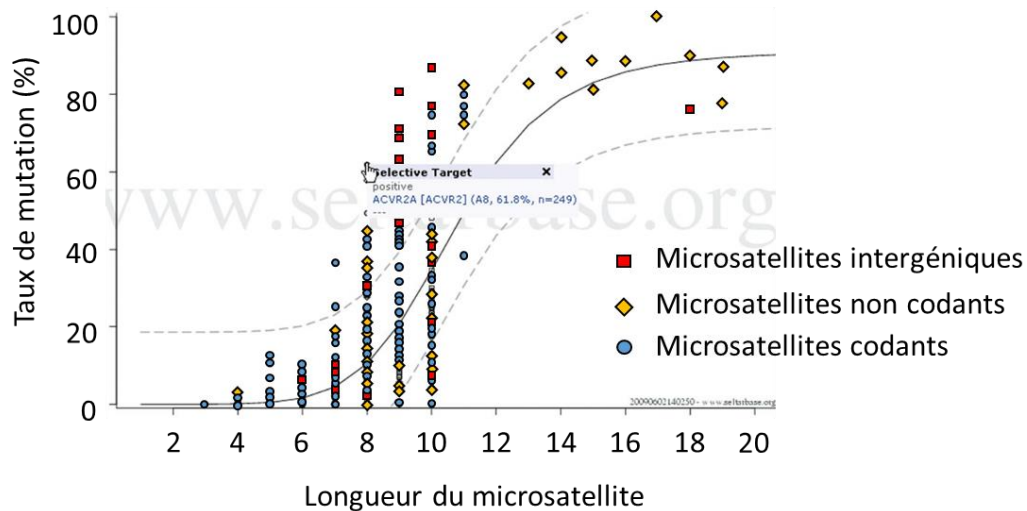


Figure 3: Adaptation de la représentation des mutations des gènes cibles de l'oncogenèse colique MSI d'après le modèle *Seltarbase*. Modèle de régression des microsatellites non codant (UTR, intronique et pseudo-gène), codants et intergéniques en fonction du taux de mutation et de la longueur des microsatellites. La ligne de régression est représentée par un trait noir plein alors que les lignes de prédiction sont représentées en pointillé. Les microsatellites représentés en dehors des lignes de prédiction présentent des mutations sélectionnées (au-dessus) ou contre-sélectionnées (en-dessous), favorisant le processus tumoral MSI. Il est à noter que depuis 2010, d'autres gènes candidats MSI ont été identifiés et que des données concernant d'autres localisations tumorales MSI (gastriques et endomètre) ont été récoltées (voir www.Seltarbase.org). (Adapté de Woerner et al., 2010 ²⁰).

De nos jours, de nouvelles technologies comme le séquençage à haut débit (NGS pour *Next-Generation Sequencing*) nous permettent d'identifier de nouvelles mutations présentes, dans l'ensemble du génome (*Whole-Genome Sequencing*) ou au niveau de régions codantes (*Exome Sequencing*), pouvant impacter le processus tumoral ²². En 2013, Kim et ses collaborateurs ont réalisé un séquençage génomique (*Exome* et *Whole-Genome*) à haut débit sur 27 tumeurs coliques et 30 tumeurs de l'endomètre MSI, afin de mettre en évidence un profil génomique des tumeurs MSI. De manière intéressante, une surreprésentation de l'instabilité microsatellitaire a été

identifiée dans les régions euchromatiques et introniques en comparaison des régions hétérochromatiques et intergéniques, représentatives des mutations somatiques non répétées ²³. De manière étonnante, ce travail n'a tenu compte que de l'influence de la fréquence mutationnelle des microsatellites, en étudiant que les cibles les plus fréquemment touchées. Cependant, le taux de mutations ne dépend pas seulement de ce paramètre mais aussi de la taille et de la nature du microsatellite ^{18,24}. Dans ce contexte, une récente analyse exomique, prenant en compte ces deux critères, a permis d'identifier les gènes positivement sélectionnés dans les tumeurs MSI. Ainsi, 53 gènes cibles MSI ont été identifiés dans une cohorte de 24 CCR sporadique MSI ²⁵.

Il est à noter que l'étude de Kim a permis l'identification de gènes cibles MSI (*JAK1* et *TFAM1*) spécifiques du cancer de l'endomètre MSI, suggérant une tissu-spécificité dépendante du contexte tumoral. Ce résultat est en accord avec une précédente étude comparative des cancers du côlon-rectum, de l'estomac et de l'endomètre, se basant sur une approche gènes candidats. Ce travail a montré qu'il existe un profil de mutations similaire entre les tumeurs gastriques et coliques MSI alors que les tumeurs de l'endomètre présentent un profil de mutations différent ²⁶.

2. Les microsatellites non codants

Outre les microsatellites codants, la majorité des séquences répétées microsatellitaires est localisée au niveau de régions non codantes incluant les régions inter-géniques ou intra-géniques (introns, régions 5' et 3' UTR et promoteurs de gènes) (Figure 4).

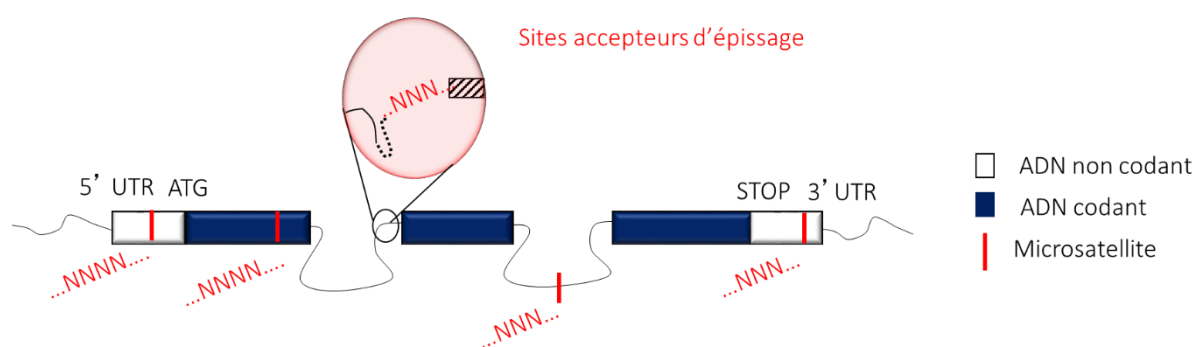


Figure 4 : Localisation des microsatellites au sein du génome. Les microsatellites sont présents tout au long du génome, aussi bien dans les régions codantes que non codantes.

Les mutations introniques sont sans conséquence dans la majorité des cas et peu d'études se sont intéressées à la fonction de telles répétitions ^{27,28}. Cependant, l'oncogène *MYB* a été décrit comme cible de cette instabilité microsatellitaire particulière en 2006. Ce gène contient une séquence répétée, composée de 19 thymidines (T₁₉), au niveau de l'intron 1, jouant un rôle dans la régulation de la transcription de cet oncogène. Ainsi, des mutations au niveau de ce microsatellite ont été observées dans les cancers colorectaux MSI, entraînant une augmentation de l'expression de *MYB* ²⁹. De manière intéressante, une forte expression de ce gène a été suggérée comme marqueur pronostique de survie chez les patients atteints de CCR ³⁰, indiquant un rôle oncogénique de cette mutation.

Dans d'autres cas, les mutations peuvent affecter des microsatellites non codants ayant un rôle fonctionnel dans l'homéostasie des gènes. En 2004, le gène *MRE11* a été décrit comme cible de l'instabilité microsatellitaire dans les cancers gastriques et colorectaux MSI ^{31,32}. Une délétion du microsatellite T₁₁, localisé dans une région intronique au niveau du site accepteur d'épissage de l'intron 4, entraîne un épissage aberrant (saut de l'exon 5) et la production d'un transcrit mutant. Cela se traduit par une perturbation de l'hétérotrimère composé des protéines MRE11/NBS1/RAD50, jouant un rôle dans la réparation de cassures doubles brins *via* le processus de réparation par jonction d'extrémités non homologues (NHEJ pour *Non-Homologous End Joining*) et par recombinaison homologue ³¹. De manière similaire, une instabilité microsatellitaire au niveau de sites accepteurs d'épissage du gène *ATM* (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), une sérine-thréonine kinase impliquée dans la signalisation des cassures double brin et dans les systèmes de surveillance de l'intégrité du génome, aboutie à un épissage aberrant dans les cancers gastriques (saut de l'exon 6) et dans des lignées de cancers colorectaux (saut de l'exon 8 et 12) MSI. Ces mutations ont été associées à une perte d'expression de la protéine sauvage et à la production d'une protéine tronquée perte de fonction ^{33,34}. A l'instar des mutations observées dans les gènes *MRE11* et *ATM*, mon laboratoire d'accueil a identifié dans les cancers colorectaux MSI, une mutation sur un microsatellite intronique localisée en amont d'une borne d'épissage du gène codant pour la protéine chaperonne HSP110 (*Heat Shock Protein 110*) ¹. Une description plus détaillée de cette découverte sera présentée dans le chapitre III, dédié à HSP110.

D'autres régions régulatrices non codantes telles que les promoteurs de gènes peuvent aussi être riches en microsatellites et donc être les cibles d'une instabilité microsatellitaire dans un contexte dMMR. Par exemple, une instabilité au niveau d'un microsatellite localisé dans le promoteur du gène *MMP-3* (*Matrix MetalloProteinase-3*) a été associée à une perte d'expression de la protéine correspondante dans des tumeurs colorectales MSI ³⁵.

Outre les promoteurs de gènes, les régions UTR (*Untranslated Region*), peuvent posséder des séquences répétées ciblées par cette instabilité particulière. Dans un contexte MSI, l'instabilité de ces microsatellites pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'expression de certains gènes impliqués dans le développement tumoral ³⁶. Par ailleurs, de récentes données obtenues à partir d'analyses génomiques et transcriptomiques issues de cancers gastriques MSI ont mis en évidence 139 gènes pour lesquels une association a été trouvée entre la perte d'expression et l'instabilité au niveau de microsatellites présents dans les régions UTR associées. Dans ce travail, 90,5% des délétions au niveau de microsatellites ont été retrouvées au sein de régions UTR, suggérant l'importance de ces régions dans le phénotype tumoral gastrique MSI ³⁷.

3. Les mutations non répétées

Bien que la majorité des mutations identifiées soit présente au niveau de séquences répétées, quelques mutations récurrentes au niveau de séquences non répétées ont été rapportées dans les cancers MSI. Ces mutations ponctuelles ont été recherchées dans les principales voies de signalisation impliquées dans la transformation maligne des cellules épithéliales coliques.

Des mutations inactivatrices du gène *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*), appartenant à la voie de signalisation *Wnt*, ont ainsi été rapportées dans 20% des tumeurs coliques MSI ^{38–40}. Toutefois, il est à noter que des mutations activatrices sur *CTNNB1* (25-43%), codant pour la β -caténine, un facteur de transcription essentiel à la voie *Wnt*, ont été observées dans les tumeurs coliques MSI ^{41,42}. De manière intéressante, aucune altération somatique d'*APC* n'a été identifiée dans les tumeurs gastriques MSI ⁴³.

De manière similaire à *APC*, le gène suppresseur de tumeurs (GST) *TP53*, codant pour un facteur de transcription régulant les réponses au stress, n'est retrouvé muté que dans 20-30% des tumeurs coliques MSI ^{44,45}. Toutefois, un de ces gènes cibles *BAX*, qui est aussi un gène cible MSI, est fréquemment muté dans les tumeurs MSI (50%) ¹⁸. Il est intéressant de noter que les tumeurs MSS sont mutées dans 50-75% des cas sur le gène *TP53* ⁴⁶, suggérant que les tumeurs MSI et MSS partagent certaines voies de signalisations altérées en commun contribuant au développement tumoral.

En opposition aux GST, dont les mutations sont majoritairement responsables d'une perte de fonction, les mutations sur les oncogènes sont principalement associées à leur activation. *KRAS* appartient à la voie de signalisation des RAS/RAF/MAPK. Son altération (au niveau des exons 12 et 13) est fréquemment observée (30-40%) dans les tumeurs coliques de type MSS. Cependant, dans les tumeurs MSI, son altération n'est présente que dans seulement 10-20% des cas ^{44,47}. A l'inverse, les tumeurs gastriques MSI sont plus fréquemment touchées par les mutations sur le gène *KRAS* (17-20%) en comparaison des CG MSS (5%), suggérant un rôle plus prédominant de cet oncogène dans le développement tumoral gastrique MSI ^{48,49}.

BRAF, un autre oncogène appartenant à la voie des RAS/RAF/MAPK, est aussi muté dans les CCR. Les mutations touchant cet oncogène sont surtout caractérisées par des transversions (T-A) qui survient au niveau du nucléotide 1799, situé dans l'exon 15. Cette mutation activatrice correspond à un changement d'acide aminé, une valine (V) remplacée par un acide glutamique (E), en position 600 de la protéine. Contrairement à *KRAS*, *BRAF* est fréquemment muté (30-60%) dans les tumeurs CCR MSI sporadique en comparaison des tumeurs MSS (5-10% des cas) ^{47,50}. Il est intéressant de noter que les mutations aux niveaux des gènes *BRAF* et *KRAS* sont mutuellement exclusives dans les tumeurs coliques MSI, en rapport avec la redondance des effets liés à ces mutations. En opposition aux tumeurs coliques MSI, les mutations *BRAF* V600E ne sont pas retrouvées dans les tumeurs gastriques MSI ou MSS ⁴⁷.

D'autres points chauds de mutation ont été identifiés dans certains cancers MSI. Par exemple, des altérations somatiques touchant le gène *PIK3CA* (*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase Catalytic subunit α*) et *MLK3* (*Mixed*

Lineage Kinase 3), codants respectivement pour une sous-unité catalytique de la protéine kinase PI3K (*Phosphatidylinositol 3-Kinase*) et une serine/thréonine kinase, ont été identifiées dans les tumeurs gastriques et coliques de type MSI ^{49,51,52}.

Grâce au séquençage à haut débit, de nouvelles mutations fréquentes au niveau de séquences non répétées ont été identifiées dans des tumeurs colorectales MSI ^{53,54}. De manière intéressante, la mutation faux-sens (Arg261Trp) identifiée au niveau du gène *ZBTB2* semble impacter la prolifération cellulaire ⁵³. Récemment, de nouvelles données issues d'une analyse à plus grande échelle, provenant de la base de données « *The Cancer Genome Atlas* » (TCGA), ont proposé que certains points chauds de mutations favorisent le développement tumoral MSI, comme les mutations des gènes *POLE* (*DNA Polymerase ϵ , catalytic subunit* ; 23%) et *POLD1* (*DNA Polymerase δ , catalytic subunit* ; 27%), impliqués dans la réparation de l'ADN ⁵⁵. De manière similaire, l'analyse de 52 tumeurs gastriques coréennes a permis de mettre en évidence 75 nouveaux variants somatiques (dont 34 nouveaux points chauds de mutations) au niveau de nombreux gènes incluant *TP53*, *EGFR* et *PIK3CA* ⁵⁶, connus pour être oncogénique lorsqu'ils sont mutés.

II. Les cancers gastro-intestinaux MSI

La déficience du système MMR est responsable d'un processus général d'instabilité génomique qui favorise le développement des tumeurs MSI de type sporadique (colon, estomac et endomètre) et de la quasi-totalité des cancers colorectaux et « extra-coliques » survenant dans un contexte héréditaire associé au syndrome de Lynch. Dans le cas des cancers MSI héréditaires, le mécanisme majeur en cause est une mutation germinale de l'un des 4 gènes MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* et *PMS2* ; puis une inactivation somatique du deuxième allèle). A l'inverse, les tumeurs MSI de type sporadique sont majoritairement caractérisées par une hyperméthylation somatique et bi-allélique du promoteur du gène *MLH1*, modification épigénétique associée à la sénescence de l'épithélium colique, responsable de l'inactivation de ce gène. Afin de mieux comprendre les caractéristiques définissant les cancers colorectaux et gastriques de type MSI, localisations auxquelles je me suis intéressé lors de ma thèse, ce deuxième chapitre portera sur certaines caractéristiques épidémiologiques, moléculaires et cliniques de ces tumeurs survenant dans un contexte sporadique ou héréditaire.

A. La classification moléculaire des tumeurs MSI

Grâce à l'avènement du NGS et de l'ère de la bio-informatique, Marisa et ses collaborateurs ont établi une classification moléculaire basée sur une analyse transcriptomique d'une série de 750 patients atteints de cancers coliques tous stades confondus (I à IV). Six groupes (C1 à C6) ont ainsi pu être identifiés en fonction de critères cliniques et moléculaires. Dans ce travail, les tumeurs MSI ont été majoritairement regroupées au sein du groupe C2, caractérisé par un fort système immunitaire et une croissance tumorale importante ⁵⁷. Plus récemment, un consensus appelé CMS (*Consensus Molecular Subtype*) a mis en évidence une signature moléculaire sur une cohorte de 4 151 échantillons de tumeurs coliques donnant lieu à une nouvelle classification plus robuste des cancers colorectaux. Ainsi, 4 groupes ont été mis en évidence dont le CMS1 (14% des tumeurs), qui est enrichi en tumeurs MSI et caractérisé par un phénotype hypermutateur, une instabilité microsatellitaire importante ainsi qu'une forte activation immunitaire ⁵⁸.

A l'instar des CCR, une classification moléculaire a aussi été établie pour les cancers de l'estomac à partir de 295 échantillons issus de la base de données TCGA

(*The Cancer Genome Atlas*). Ainsi, les tumeurs gastriques ont été classées en 4 groupes, regroupant les tumeurs dMMR au sein d'un groupe unique « MSI », caractérisé par (i) un phénotype hypermutateur ; (ii) une association avec un phénotype particulier appelé CIMP (*CpG island methylator phenotype*), caractérisé par une hyperméthylation des îlots CpG lié à la sénescence de l'épithélium et (iii) l'inactivation du promoteur du gène MMR *MLH1* par hyperméthylation ⁵⁹.

B. Le syndrome de Lynch

1. Historique et découverte

Au début du 20^{ème} siècle, Aldred Scott Warthin décrit pour la première fois l'existence d'une prédisposition génétique au développement de cancers du côlon, de l'estomac et de l'endomètre dans une famille ⁶⁰. En 1966, une prédisposition similaire est décrite par Henry Lynch dans deux autres familles ⁶¹. Ces deux études princeps ont ainsi pu mettre en évidence l'existence d'un syndrome autosomique dominant appelé « syndrome des cancers familiaux », favorisant l'apparition de cancers. Initialement appelé HNPCC (*Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*), par opposition à la FAP (*Familial Adenomatous Polyposis*), qui est caractérisé par un nombre plus important de polypes, ce syndrome fut renommé syndrome de Lynch (LS), afin d'inclure tous les cancers (coliques et « extra-coliques ») présentant une déficience du système MMR d'origine héréditaire.

2. Définition et caractéristiques génétiques

Le syndrome de Lynch est un syndrome héréditaire de prédisposition au cancer colorectal, représentant 2-5% des cancers du côlon. Les patients LS sont porteurs d'une mutation monoallélique germinale au niveau d'un des gènes du système MMR, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* et *PMS2*, prédisposant au cancer ⁶². Selon le modèle de KNUDSON ⁶³, une inactivation épigénétique, une altération somatique ou une perte d'hétérozygotie (LOH) suffit à inactiver l'allèle sauvage restant, contribuant ainsi au développement tumoral MSI. Le groupe InSIGHT (*International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumors*) a établi une base de données permettant d'identifier les mutations prédominantes, principalement faux-sens et non-sens, observées chez ces patients. Ainsi, il a été observé que les mutations sur le gène

MLH1 représentent 45% des mutations héréditaires retrouvées alors que les gènes *MSH2*, *MSH6* et *PMS2* sont mutés respectivement dans 33%, 18% et 7% des cas ⁶⁴.

Outre le modèle de KNUDSON, un petit groupe de patients LS est caractérisé par la présence d'épimutations constitutionnelles du gène *MLH1* et *MSH2*, suggérant un mécanisme alternatif prédisposant à ce syndrome ^{65,66}. Par ailleurs, un autre mécanisme de prédisposition au syndrome de Lynch a été proposé n'impliquant pas une mutation directe sur un gène MMR mais sur le gène codant pour la protéine d'adhésion EpCAM (*Epithelial Cell Adhesion Molecule*) ⁶⁷. Ainsi, il a été décrit que les délétions germinales en 3' de ce gène, situé en amont de *MSH2*, entraînent une inhibition transcriptionnelle de ce dernier, résultant en une inactivation du gène *MSH2*.

3. Les caractéristiques épidémiologiques et cliniques du LS

De manière générale, il est maintenant établi que ce syndrome expose à un risque inéluctable de cancer colorectal autour de l'âge de 46 ans (médiane de survenue) ⁶⁸. Toutefois, le risque de développer un cancer associé au spectre clinique du syndrome de Lynch peut être influencé par le sexe de l'individu. Ainsi, les femmes touchées par le syndrome de Lynch semblent présenter un risque plus faible (10 à 52%) de développer un cancer colorectal que les hommes (20 à 69%) ⁶⁹. Cependant, ces patientes peuvent également développer un cancer de l'endomètre dans 40 à 60% des cas. Il est à noter que les cancers du côlon et de l'endomètre ne sont pas les seules localisations tumorales associées au LS et que d'autres tumeurs « extra-coliques » peuvent être observées de manière moins fréquente incluant des tumeurs des voies ovariennes, de l'estomac, de l'intestin grêle, du cerveau, du pancréas et des voies urinaires ^{69,70}.

Outre l'effet dépendant du sexe, l'expression de ce syndrome est variable et a été corrélé au gène MMR touché par la mutation germinale ^{71,72}. Ainsi, les individus porteurs d'une altération germinale au niveau du gène *MLH1* ou *MSH2* ont généralement les risques les plus élevés et le plus large spectre clinique de cancers liés au syndrome de Lynch. Toutefois, il est à noter que les patients LS qui présentent une mutation sur le gène *MSH2* semblent avoir une prépondérance accrue pour le développement de cancers extra-coliques ⁷³⁻⁷⁵. De manière intéressante, il semblerait que les mutations touchant le gène *EPCAM* soient associées à un risque équivalent de développer un CCR que les patients mutés sur *MSH2*. Toutefois, ces individus

semblent être associés à un risque plus faible de cancers de l'endomètre ⁷⁶. Les patients porteurs de mutation au niveau du gène *MSH6* se sont révélés avoir un risque plus élevé pour le développement de cancers gynécologiques que de cancers coliques ^{77,78}. Par ailleurs, les patients LS présentant des mutations sur le gène *PMS2*, semblent être associés à un risque plus faible de cancers colorectaux et gynécologiques, puisque seulement 25% des hommes et 33% des femmes semblent être diagnostiqués avec un cancer associé au syndrome de Lynch à l'âge de 70 ans ⁷⁹.

Les CCR LS sont localisés dans 70% des cas au niveau du côlon proximal ⁸⁰ et présentent un risque élevé de développement de tumeurs synchrones (tumeurs métastatiques découvertes en même temps que la tumeur primitive) et métachrones (cancers diagnostiqués au décours du traitement de la tumeur primitive). D'un point de vue histologique, ces tumeurs sont caractérisées par la présence d'un fort infiltrat lymphocytaire et de follicules lymphoïdes de type Crohn en bordure des tumeurs ^{81,82}. Elles présentent une architecture médullaire ou en bagues à chatons et sont le plus souvent mucineuses ainsi que peu différenciées. Il est intéressant de noter que ces cancers évoluent à partir d'adénomes pré-existants ⁸³, caractérisés par une augmentation marquée de leur taille, des dysplasies de haut grade et une progression rapide de l'adénome vers le carcinome en comparaison des CCR MSI sporadiques (3 ans *versus* 10 ans) ⁸⁴⁻⁸⁶.

Bien que les patients LS soient exposés à un développement précoce de cancers coliques, il semble que leur survie soit améliorée en comparaison des patients atteints de tumeurs coliques MSI sporadiques à stade égal ⁸⁷. Cette observation peut s'expliquer du fait de la prise en charge précoce des patients LS par rapport aux patients atteints de CCR MSI sporadiques.

Outre les cancers coliques, le syndrome LS expose aussi à un risque précoce de cancer gastrique autour de l'âge de 56 ans, cependant il reste faible comparé aux tumeurs coliques (6-13% *versus* 52-82%) ⁸⁸. De manière similaire aux CCR héréditaires, les risques de cancers gastriques associés au LS (CG LS) semblent être liés au sexe et au gène MMR touché. Ainsi, ces tumeurs sont plus fréquemment retrouvées chez les hommes et les risques sont plus élevés en présence de mutations sur les gènes *MLH1* et *MSH2*, bien que les mutations *MSH2* semblent être associées à un risque plus élevé ^{74,89}. D'un point de vue histologique, les tumeurs gastriques sont divisées en deux types histologiques selon la classification de Lauren ⁹⁰. Le type

intestinal est caractérisé par la présence de cellules cancéreuses bien différenciées se développant lentement. En opposition, le type diffus se caractérise par des cellules cancéreuses peu différenciées et très agressives. En 2010, une étude a suggéré que les CG LS semblent être majoritairement associés au type intestinal (62%), bien que le type diffus soit aussi retrouvé dans ces tumeurs (23%) ⁸⁹.

4. Les critères d'identification du Syndrome de Lynch

Afin de pouvoir identifier les individus présentant un risque important de développer un cancer à un âge précoce (syndrome de Lynch), les critères d'Amsterdam I, aussi nommé la règle 3-2-1, ont été mis en place en 1991 ⁹¹ (Tableau 1). Cependant, il est à noter que ces critères ne tenaient compte que des tumeurs du colon-rectum. Par conséquent, de nouveaux critères (les critères d'Amsterdam II) ont vu le jour, incluant d'autres localisations tumorales à savoir l'endomètre, l'intestin grêle, l'urètre et le rein ⁹² (Tableau 1).

Les critères d'Amsterdam I et II
Au moins trois parents atteints d'un cancer colorectal (Amsterdam I) ou de cancers* associés au syndrome HNPCC (Amsterdam II)
1. Un des parents doit être lié au premier degré avec les deux autres
2. Au minimum deux générations successives affectés
3. Un des parents doit être diagnostiqué pour un cancer colorectal (Amsterdam I) ou un cancer lié au HNPCC (Amsterdam II) avant l'âge de 50 ans
4. La polypose adénomateuse familiale (FAP) doit être exclu
5. Le diagnostique doit être histologiquement prouvé (Amsterdam II)

Tableau 1 : Les critères d'Amsterdam I et II. * CCR, endomètre, intestin grêle et voies urinaires.

En 1997, l'Institut National du Cancer aux Etats-Unis a publié de nouveaux critères (les critères de Bethesda), plus spécifiques et plus sensibles que les critères d'Amsterdam ⁹³. Ces critères ont été réévalués (critères de Bethesda révisés) afin d'identifier les patients LS en prenant en compte des critères familiaux mais aussi de nouveaux critères génétiques et clinico-pathologiques connus incluant les follicules

lymphoïdes de type Crohn, le caractère mucineux des cellules tumorales ou encore leur localisation ⁹⁴ (Tableau 2).

Les critères de Bethesda révisés
La recherche du phénotype MSI est recommandé dans l'un des cas suivants :
1. Cancer colorectal doit être diagnostiqué avant l'âge de 50 ans
2. La présence de cancers synchrones ou métachrones liés au syndrome HNPCC** quel que soit l'âge du patient
3. Cancer colorectal d'histologie évocatrice*** avant l'âge de 60 ans
4. Cancer colorectal diagnostiqué chez au moins un parent apparenté au premier degrés avec un patients HNPCC**, diagnostiqué avant l'âge de 50 ans
5. Cancer colorectal diagnostiqué chez au moins deux parents apparentés au premier ou second degrés avec un patients HNPCC**, diagnostiqué quel que soit l'âge du patient

Tableau 2 : Les critères de Bethesda révisés. ** CCR, endomètre, estomac, ovaire, voies urinaires, cerveau, petit intestin, tractus hépatobiliaire, et cancers de la peau (tumeurs sébacées). *** Présence de lymphocytes intra-tumoraux, d'une réaction lymphocytaire de type Crohn, de cellules mucineuses de type bague à chaton.

Malgré le fait que ces critères se soient montrés efficaces pour identifier les patients LS, certaines familles ne répondant pas à ces critères ou ne présentant pas de mutations germinales au niveau des gènes MMR (*EPCAM*) ont été identifiées. Pour ces raisons, certains auteurs ont proposé de réaliser un dépistage systématique du phénotype MSI chez tous les patients âgés de moins de 70 ans (recommandations de Jérusalem) par réaction en chaîne par polymérase ou par immunohistochimie ⁹⁵. Ces deux techniques seront décrites dans la suite de ce chapitre.

C. Les tumeurs sporadiques

Les tumeurs MSI sporadiques représentent 12-15% des tumeurs du côlon, de l'estomac et de l'endomètre ⁷. Ces cancers sont secondaires à un phénotype d'hyperméthylation (phénotype CIMP) absent dans un contexte héréditaire ⁹⁶. L'instabilité des microsatellites de ces tumeurs est liée, dans la majorité des cas, à l'acquisition d'une hyperméthylation somatique bi-allélique du promoteur du gène *MLH1*, entraînant l'inactivation et la perte d'expression de ce gène ⁹⁷.

1. Les cancers colorectaux MSI sporadiques

Bien que l'altération épigénétique de *MLH1* soit majoritaire dans les CCR MSI de type sporadique, d'autres mutations MMR peuvent être associés au développement de ces tumeurs. Des mutations somatiques dans les gènes MMR *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* et *PMS2* ainsi que dans l'ADN polymérase *POLE* ont été observées dans des cancers de l'endomètre et colorectaux MSI ^{98,99}. En accord avec ces résultats, une analyse génomique à grande échelle a suggéré que 77% des CCR, possédant un phénotype hypermutateur, sont associés à une hyperméthylation du promoteur du gène *MLH1* alors que les 23% restants sont caractérisés par une ou plusieurs mutations somatiques au niveau des gènes MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH3*, *MSH6*, *PMS2*) ou au niveau de la polymérase *POLE* ¹⁰⁰. Cependant, malgré la co-existence des mutations touchant cette ADN polymérase et les gènes *MMR*, participant au phénotype hypermutateur de ces tumeurs, il est à noter que les mutations au niveau du gène *POLE* ne semblent pas être associées au phénotype tumoral MSI ^{23,101}.

D'autres mécanismes de dérégulation du système MMR ont été suggérés dans les tumeurs coliques MSI sporadiques. Ainsi, une corrélation inverse a été mise en évidence entre l'expression du miR-155 et l'expression des protéines MLH1 et MSH2 dans un certain nombre de tumeurs MSI sans cause antérieure connue d'inactivation somatique du système MMR ¹⁰². Plus récemment, la tri-méthylation de l'histone H3 sur la Lysine 36 (H3K36me3) a été identifiée comme marqueur épigénétique nécessaire au recrutement du complexe MutSα (MSH2-MSH6) sur la chromatine *via* des interactions directes avec la protéine MSH6 ¹⁰³. En conséquence, les cellules dépourvues de l'enzyme H3K36 tri-méthyltransférase SETD2 sont caractérisées par une instabilité des microsatellites et des fréquences de mutation spontanées élevées, caractéristiques de la déficience du système MMR.

De manière générale, les CCR MSI sporadiques sont retrouvés plus fréquemment chez les femmes (sexe ratio 2:1) de plus de 70 ans ¹⁰⁴ et sont associés à une localisation proximale dans 90% des cas ¹⁰⁵. D'un point de vue histologique, les tumeurs colorectales sporadiques MSI partagent des caractéristiques communes (infiltration lymphocytaire, cellules mucineuses et peu différenciées) avec les cancers colorectaux associés au syndrome de Lynch.

De nombreuses preuves suggèrent que les CCR MSI sporadiques se développent à partir d'adénomes sessiles, résultant d'une hyperplasie des cryptes suite à l'inhibition de l'apoptose et du retard de migration des cryptes vers la villosité ^{106,107}, suggérant que les CCR sporadiques MSI évoluent à partir d'une voie différente des CCR LS (adénomes pré-existants). De manière intéressante, la mutation V600E au niveau du gène *BRAF* est majoritairement retrouvée dans les cancers MSI sporadiques et n'est jamais présente dans les tumeurs colorectales associées au LS ^{108,109}.

Concernant la valeur pronostique du statut MSI, plusieurs études ont démontré que les patients atteints de cancers colorectaux MSI semblent avoir une survie globale augmentée par rapport aux patients MSS à stade égal ^{110,111}. En accord avec ces données, une méta-analyse, de 32 études incluant 1277 tumeurs colorectales MSI parmi un total de 7642 patients tous stades confondus, a confirmé que les patients avec une tumeur colique MSI semblent avoir un meilleur pronostic de survie que les patients MSS de manière générale ¹¹². Le bon pronostic des tumeurs MSI est plus apparent à un stade précoce (stade II) comparé à un stade tardif (stade III) ¹¹³. Cependant, les tumeurs MSI de stade IV font exception (pronostic plus sévère comparé aux tumeurs MSS de même stade), malgré le potentiel métastatique réduit des tumeurs MSI ^{114,115}. Une deuxième méta-analyse, regroupant quatre essais cliniques randomisés (CAIRO, CAIRO2, FOCUS et COIN) comprenant 3 063 patients, a démontré l'effet négatif du phénotype MSI sur le pronostic dans les CCR métastatiques (CCRm). Dans ce travail, la survie sans aggravation de la maladie (PFS pour *Progression Free Survival*) et la survie globale (OS pour *Overall Survival*) ont été considérablement réduites dans la cohorte dMMR, par rapport à la cohorte MMR-proficiente (pMMR) ¹¹⁶. De manière intéressante, il a été suggéré que la mutation *BRAF* V600E exerce cet effet délétère dans ce contexte particulier ^{116,117}.

2. Les cancers gastriques MSI sporadiques

Outre l'hyperméthylation du promoteur du gène *MLH1*, les cancers gastriques sporadiques MSI peuvent être caractérisés par d'autres étiologies responsables de la déficience du système MMR. Ainsi, une infection de la bactérie *Helicobacter Pylori* a été suggérée comme responsable de l'inhibition du système MMR. En effet, il a été montré que cette bactérie entraîne une diminution de l'expression des gènes MMR *MLH1*, *MSH2*, *PMS1* et *MSH6* dans des modèles cellulaires de cancers gastriques,

ainsi que dans des modèles murin d'infection ¹¹⁸⁻¹²⁰. En accord avec ces données, une étude clinique a observé que le niveau d'expression de *MLH1* est diminué chez les patients infectés par *Helicobacter Pylori* comparativement aux patients non infectés ¹²¹. Il est intéressant de noter que l'éradication de la bactérie par traitement entraîne une réexpression de *MLH1* et *MSH2* dans les cellules de la muqueuse gastrique ¹²².

A l'instar des CCR MSI sporadiques, les CG MSI sporadiques sont retrouvés plus fréquemment chez les femmes âgées (autour de 63 ans) et sont localisés majoritairement au niveau de l'antrum gastrique (localisation distale de l'estomac) ¹²³. D'un point de vue anatomo-pathologique, il est intéressant de noter que les CG MSI sont caractérisés par un phénotype mucineux ainsi qu'une infiltration par des follicules lymphoïdes ^{123,124}.

D'un point de vue clinique, plusieurs études ont évalué l'effet pronostique du phénotype MSI dans les CG, toutes montrant que le statut MSI semble être associé à une survie améliorée à tous les stades par rapport aux cancers gastriques de type MSS ^{125,126}. Ces résultats peuvent être expliqués en partie par les critères clinico-pathologiques des CG MSI. En effet, outre l'association avec le type histologique intestinal, caractérisé par une progression lente ^{127,128}, les cancers gastriques MSI sporadiques sont associés à une faible capacité de métastases ganglionnaires et généralement de bas grade ¹²⁸.

D. La détermination du statut MSI

D'un point de vue diagnostique, la recherche du phénotype tumoral MSI (principalement dans le côlon) est aujourd'hui de plus en plus courante en clinique. Son intérêt revêt de plus en plus un caractère pronostique, puisque les tumeurs coliques MSI sont associées à un meilleur pronostic en comparaison des tumeurs de type MSS, notamment du fait de leur caractéristiques clinico-pathologiques (immunogène, faible potentiel métastatique). De nos jours, deux méthodes permettent d'établir un diagnostic clair de ce phénotype tumoral MSI : la technique de réaction en chaîne par polymérase (PCR) et l'immunohistochimie (IHC).

1. Diagnostique par PCR

Une des techniques permettant de déterminer le phénotype tumoral MSI repose sur l'analyse des produits d'amplification par PCR de plusieurs régions non codantes possédant un microsatellite, de manière comparative entre l'ADN tumoral et normal du même patient. Le panel recommandé lors du congrès de Bethesda ⁷ est composé de 5 microsatellites : 2 marqueurs mononucléotidique (BAT25 et BAT26) et 3 marqueurs dinucléotidiques (D5S346, D2S123 et D17S250). Par définition, une instabilité sur au moins 2 de ces 5 marqueurs permet de définir une tumeur comme MSI. En 2006, ce panel a été révisé et une méthode alternative, basée sur l'analyse de marqueurs microsatellitaires mononucléotidiques, a été développée par notre laboratoire ¹²⁹. Dans ce travail, il a été proposé que 5 répétitions microsatellitaires peu polymorphes (BAT25, BAT26, NR21, NR24 et NR27) soient co-amplifiées et utilisées afin d'identifier le phénotype MSI dans les cancers colorectaux (2/5 microsatellites touchés) (Figure 5).

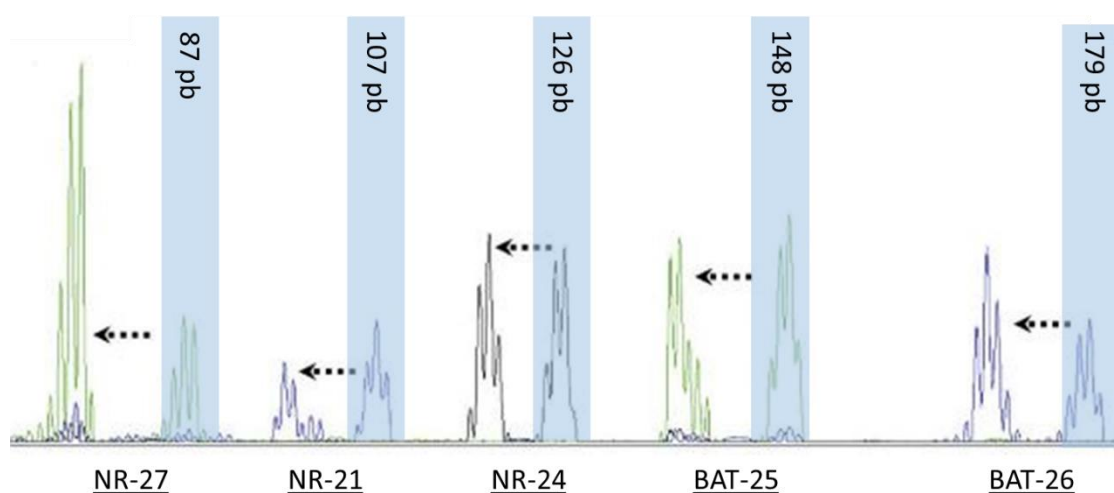


Figure 5 : Détermination du statut MSI des tumeurs par PCR (pentaplex). Mise en évidence de l'instabilité microsatellitaire par génotypage en fluorescence suite à la co-amplification de cinq marqueurs (BAT25, BAT26, NR21, NR24 et NR27). Les tailles indiquées correspondent aux tailles les plus courantes retrouvées au sein de la population mondiale. Dans un contexte tumoral MSI, les délétions au niveau de ces microsatellites entraînent l'apparition de pics (indiqués par une flèche) en dehors de la zone polymorphique (zones bleues). (Adapté de Boland C.R et al., 2010 ⁹⁵).

Aujourd'hui, cette méthode connue sous le nom de pentaplex, est une des références internationales utilisées en routine en clinique, en France comme à l'étranger. Les nombreuses études publiées, relatives à son utilisation, ont montré que, contrairement à la première approche proposée, ce panel est d'intérêt pour identifier le phénotype tumoral colique MSI, permettant de se passer de l'analyse comparée entre ADN tumoral et normal des patients dans les tumeurs coliques notamment ¹³⁰. Cependant, cette méthode présente quelques limites. En effet, la pentaplex repose sur la co-amplification de marqueurs, ce qui n'est pas toujours réalisable en routine. En outre, un manque de sensibilité et de spécificité de cette méthode a été souligné du fait que les marqueurs présentent : (i) un certain polymorphisme dans la population mondiale, masquant un phénotype MSI dans certaines situations (notion de faux négatifs) ; (ii) des allèles rares, en dehors des zones de polymorphismes fréquents qui peuvent mimer des mutations aberrantes retrouvées dans les tumeurs (faux positifs).

Au cours des dernières années, de nouveaux microsatellites ont été suggérés afin de simplifier et d'améliorer le diagnostic du phénotype tumoral MSI. Ainsi, le microsatellite mononucléotidique (MT1XT20), localisé en 3' UTR du gène *MT1X* (*Metallothionein 1X*) ou le microsatellite EWS16T, localisé en 3'-UTR du gène *EWSR1* (*EWing Sarcoma breakpoint Region 1*) ont été proposés comme nouveaux marqueurs MSI ^{131–133}. Bien qu'intéressant, ces deux microsatellites n'ont été étudiés que dans des cohortes non représentatives de la population mondiale (population danoise-finlandaise et caucasienne). En 2016, notre équipe a suggéré l'analyse du microsatellite T₁₇ présent au niveau d'une borne d'épissage du gène *HSP110* comme nouveau marqueur diagnostique du phénotype tumoral MSI ¹³⁴. Dans ce travail (voir Annexe 2 pour plus de détails), nous avons démontré que le marqueur T₁₇ est encore plus monomorphe que les marqueurs de la pentaplex, puisque seulement 2 allèles sauvages (T₁₆ et T₁₇) ont été identifiés dans la cohorte issue du CEPH (Centre d'Etude du Polymorphisme Humain), représentant 54 populations à travers le monde (soit 1037 échantillons). En outre, nous avons montré que ce microsatellite est tout aussi spécifique et plus sensible que la pentaplex actuellement utilisée, notamment grâce à son quasi-monomorphisme, permettant d'identifier de petites variations somatiques.

2. Analyse immunohistochimique

L'immunohistochimie est une méthode indirecte, alternative du génotypage par fluorescence des microsatellites, permettant d'observer une perte d'expression de 4 protéines du système MMR (MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2). Alors que la perte totale de marquage semble indiquer une déficience de ce système, les cellules normales contaminantes ou infiltrantes ont une fonction de contrôle interne de l'expression de ces protéines (Figure 6).

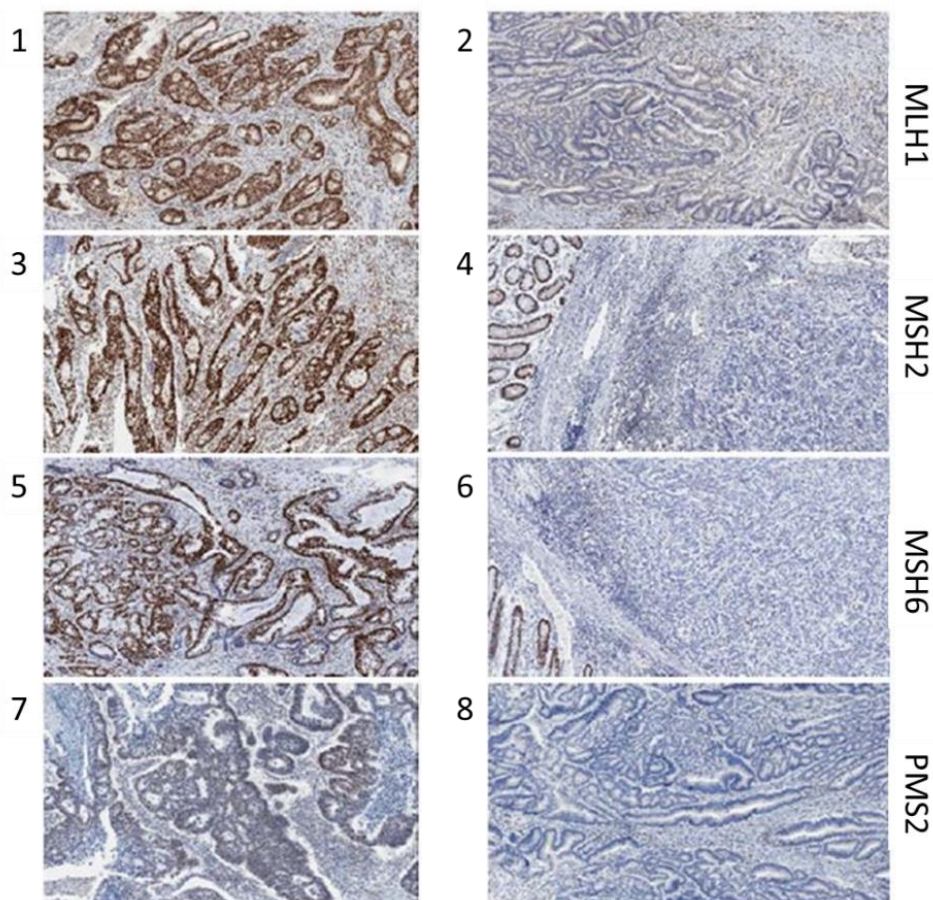


Figure 6 : Détermination du statut MSI des tumeurs par immunohistochimie. Immunomarquages des protéines MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2. Un marquage positif des protéines MMR peut être observé au niveau de l'épithélium colique tumoral, suggérant des tumeurs MMR-proficientes (1, 3, 5 et 7). A l'inverse, les coupes immunohistochimiques 2, 4, 6 et 8 montrent un marquage négatif des protéines MMR, suggérant un phénotype tumoral MSI. De manière intéressante, un marquage positif dans l'épithélium colique normal adjacent peut être observé du fait des cellules normales contaminantes (endothéliales, immunitaires). (*Adapté de Richman S et al., 2015* ¹³⁵).

Cette technique présente de nombreux avantages. Elle n'est pas onéreuse, très sensible (> 90%) et extrêmement spécifique (100%) ¹³⁶. En outre, l'IHC permet d'étudier spécifiquement la perte d'expression protéique d'un gène MMR, ce qui facilite la recherche de mutations germinales et donc l'identification des patients LS. Cependant, cette méthode présente aussi certaines limites. Par exemple, l'immunohistochimie ne permet pas la détection de mutation faux-sens, pouvant induire une perte de fonction sans diminution de l'expression de la protéine touchée.

Il est à noter que les deux techniques décrites (IHC et PCR) sont toutes les deux utilisées en routine au sein du service d'anatomo-pathologie et de biologie médicale de l'hôpital Saint Antoine afin d'identifier les patients atteints de CCR MSI.

E. La chimiothérapie

A l'heure actuelle pour les CCR et les CG, la prise en charge reste identique, ne tenant pas compte des différences majeures qui existent entre le type tumoral MSI et MSS. De nos jours, la classification TNM (T: Tumeur primitive ; N: Ganglions lymphatiques régionaux ; M: métastases à distance) (Figure 7) est le seul indicateur d'agressivité des tumeurs coliques et gastriques (MSS et MSI) permettant de déterminer les protocoles de traitements les plus adaptés (chirurgie, chimiothérapie, immunothérapie). Elle est définie par 4 stades (Tableau 3). Schématiquement, les stades précoces, appelés stade I et II, sont caractérisés par un envahissement de la paroi allant de la muqueuse à la totalité de la paroi. Tandis que les stades avancés (III) sont caractérisés par une invasion de la paroi avec un envahissement des ganglions régionaux et les stades métastatiques (IV) par une ou des métastases à distance.

De nos jours, le 5-fluorouracile (5-FU) est la molécule chimiothérapeutique la plus utilisée pour le traitement des cancers gastro-intestinaux. Cette molécule est une fluoropyrimidine possédant des propriétés anti-tumorales découverte en 1957 ¹³⁷. Suite aux publications démontrant son efficacité dans les CCR, le 5-FU est devenu un standard dans les protocoles de traitements de ces tumeurs. Néanmoins, afin d'améliorer son efficacité, de nombreuses molécules incluant des agents platines (oxaliplatine et cisplatine) et l'irinotécan (IRI) ont été approuvées comme additifs au 5-FU seul ^{138,139}.

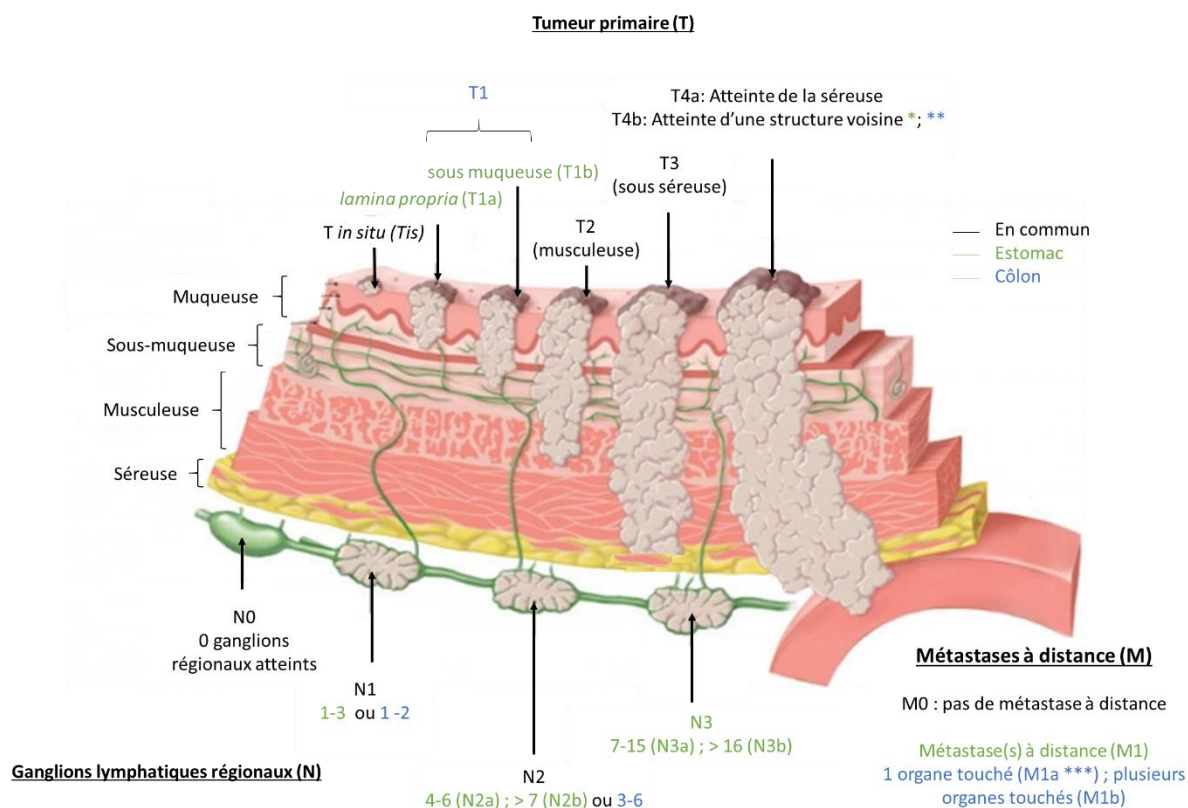


Figure 7 : Représentation schématique de la classification TNM des tumeurs coliques et gastriques. * Foie, poumons, ovaires, ganglions non régionaux. ** Colon (sigmoïde et descendant), péritoine, rein, prostate, vésicules séminales, col de l'utérus et vagin. *** Rate, côlon transversal, foie, diaphragme, pancréas, paroi abdominale, glande surrénale, rein, intestin grêle et péritoine. (Adapté du « National Comprehensive Cancer Network », 2016 & de Medicialia, Cosentino F, 2013 (revue médicale italienne))

Stade	Colon	Estomac
0	Tis ; N0 ; M0	Tis ; N0 ; M0
I	T1-T2 ; N0 ; M0	T1-T2 ; N0-1 ; M0
II	T3-T4 ; N0 ; M0	T1-T4a ; N0-N3 ; M0
III	T1-T4 ; N1-2 ; M0	T2-T4 ; N0-3 ; M0
IV	T0-T4 ; N0-2 ; M1	T0-T4 ; N0-3 ; M1

Tableau 3 : Classification dépendante du stade tumoral des tumeurs coliques et gastriques. (Adapté du « National Comprehensive Cancer Network », 2016.)

1. Les protocoles de traitements

De manière générale, la chirurgie est le principal protocole pour les patients atteints de tumeurs coliques de stades précoces (I et II). A l'inverse, les tumeurs colorectales de stade II de « haut grade » (indicateur d'un envahissement important) ou de stade III, sont traitées en adjuvant de la chirurgie avec du FOLFOX, une combinaison de 5-FU, de leucovorine (LV) et d'oxaliplatine (OXA) ¹⁴⁰. Le 5-FU est métabolisée au sein de la cellule en trois molécules actives, le fluorodésoxyuridine monophosphate (FdUMP), le fluorodésoxyuridine triphosphate (FdUTP) et le fluorouridine triphosphate (FUTP). Ces métabolites, responsables de l'effet anti-cancer du 5-FU, sont capables (i) de bloquer l'activité de la thymidylate synthase (TS), impliqué dans la voie de biosynthèse de la thymidine, entraînant des cycles futiles de réparation ; (ii) de s'incorporer au niveau de l'ADN et de l'ARN, entraînant l'arrêt de la fourche de réplication de l'ADN et de la transcription ¹⁴¹. La leucovorine, un analogue de l'acide folinique, est responsable de la synthèse de la coenzyme CH₂THF (5-10 méthylène tétrahydrofolate), améliorant l'effet inhibiteur du 5-FU sur la TS et par conséquent son effet toxique pour la cellule tumorale ¹³⁸. Enfin, l'OXA est un agent alkylant responsable de l'induction de pont intra et inter-brins entre deux guanines, entraînant l'inhibition de la réplication de l'ADN et de transcription ¹⁴².

Pour les stades III de « haut grade » et les stades métastatiques (stade IV), le protocole est plus complexe et prévoit une chimiothérapie néo-adjuvante et adjuvante, basée sur le FOLFIRI (une combinaison de 5-FU, LV et d'IRI) ^{143,144}. L'irinotécan, un analogue de la camptothécine, est un inhibiteur de la topoisomérase de type I. Cette molécule est responsable de la formation de cassures simples brins et d'un blocage de la fourche de réplication de l'ADN, entraînant la mort cellulaire par apoptose ¹⁴¹. Il est aussi intéressant de noter que certains anticorps monoclonaux incluant le cetuximab, ciblant le récepteur EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) ou le bevacizumab, ciblant VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) sont actuellement, utilisées seuls ou en combinaison avec de la chimiothérapie pour traiter les tumeurs coliques métastatiques ^{145,146}.

Contrairement aux cancers coliques, les protocoles de traitement par chimiothérapie pour les cancers de l'estomac ne sont pas aussi standardisés. La résection chirurgicale reste la seule thérapie curative ¹⁴⁷. Pour des tumeurs gastriques précoces (limitées à la muqueuse), la résection chirurgicale par endoscopie peut être

réalisée, cependant pour des tumeurs avancées restreintes à l'estomac, la gastrectomie est le protocole chirurgical le plus adapté. Pour ces patients, une chimiothérapie néo-adjuvante et adjuvante de première ligne, composée de 5-FU et de cisplatine (CIS) (protocole CF), est recommandée ¹⁴⁸. La cisplatine est un agent alkylant responsable de la formation de ponts intra et inter-brins entre une adénosine et une guanine entraînant l'inhibition de la synthèse d'ADN et de la transcription ¹⁴⁹. Il est à noter qu'il n'existe pas de consensus concernant la stratégie optimale de traitement à adapter au niveau international. Aussi, d'autres composés platines peuvent être utilisés en clinique à l'instar de l'oxaliplatine. L'épirubicine, un intercalant de l'ADN, peut aussi être utilisé en combinaison avec le 5-FU et la CIS pour le traitement de ces patients ¹⁵⁰. Cet agent est responsable de l'inhibition de la synthèse d'ADN et d'ARN, du clivage de l'ADN par la topoisomérase de type II ainsi que de la production de radicaux libres entraînant la mort cellulaire par apoptose ¹⁴⁹.

En ce qui concerne les tumeurs gastriques de stades avancées ou métastatiques, non opérables par voie chirurgicale, le traitement préconisé est la chimiothérapie palliative. Au cours des dernières années, des chimiothérapeutiques de seconde ligne ont émergé incluant les taxanes et l'irinotécan ^{151,152}. Les taxanes (Docétaxel, Paclitaxel) représentent une nouvelle classe de molécules, responsables de l'inhibition de la fonction des microtubules, entraînant une altération de la mitose et par conséquent la mort cellulaire par apoptose ¹⁴⁹. De manière intéressante, certains anticorps monoclonaux peuvent être aussi utilisés en combinaison avec des chimiothérapeutiques pour le traitement de cancers gastriques avancées. Ainsi, le trastuzumab, dirigé contre le récepteur tyrosine kinase HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor-2*), a été approuvé en combinaison du traitement CF pour les tumeurs gastriques HER2-positives lors d'une étude clinique de phase III ¹⁵³.

2. La valeur prédictive du statut MSI

Toutes les études ne sont pas d'accord concernant la valeur prédictive du statut MSI en réponse à la chimiothérapie. Néanmoins, la plupart d'entre elles suggèrent que les tumeurs coliques dMMR sont associées à une résistance au 5-FU en comparaison des tumeurs MSS ^{112,154,155}. De manière similaire, il semblerait que les tumeurs gastriques sporadiques MSI ne bénéficient pas des effets bénéfiques liés au traitement par chimiothérapie adjuvante à base de 5-FU contrairement aux tumeurs MSS

^{123,156,157}. Il est intéressant de noter qu'une analyse comparative intra-MSI (sporadique *versus* héréditaire) a suggéré que les patients atteints de CCR héréditaires (syndrome de Lynch) sont associés à une meilleure survie sans récurrence (DFS) après traitement au 5-FU en comparaison des patients MSI sporadiques ¹⁵⁸, suggérant alors que le statut mutationnel des gènes MMR puisse être un biomarqueur prédictif de réponse au 5-FU.

Afin d'expliquer la résistance des cancers MSI au 5-FU, divers mécanismes ont été décrits. En 2004, il a été suggéré que la chimiosensibilité au 5-FU est dépendante des composants du système MMR ¹⁵⁹, expliquant l'absence d'efficacité du traitement lors d'une déficience de ce système. Par ailleurs, une association a été mise en évidence entre l'augmentation de l'expression de la thymidylate synthase (TS) et les tumeurs MSI ¹⁶⁰⁻¹⁶², suggérant un autre mécanisme de résistance. En condition physiologique, la TS est capable de s'associer à son ARNm, inhibant par conséquent sa traduction. En présence de 5-FU, il a été suggéré que le FdUMP (un des métabolites du 5-FU) est capable de lier la thymidylate synthase, entraînant une augmentation de son expression *via* l'inhibition de sa boucle de contrôle négative, contre-régulant ainsi l'action inhibitrice du 5-FU sur cette enzyme ¹³⁸.

A la différence du 5-FU, il a été rapporté un effet bénéfique de l'ajout d'oxaliplatine au 5-FU en adjuvant (protocole FOLFOX) dans les CCR MSI ¹⁶³. En accord avec ces données, d'autres études ont observé un effet bénéfique de l'ajout d'oxaliplatine chez les patients atteints de tumeurs MMR-déficientes ^{164,165}. Toutefois, il a été suggéré que les mutations au niveau de *BRAF* (V600E) et *KRAS* ainsi que la localisation tumorale peuvent influencer la réponse au traitement FOLFOX des tumeurs coliques MSI de stade III ¹⁶⁶.

La sensibilité à l'oxaliplatine peut s'expliquer en partie par l'indépendance des effets de cet agent vis-à-vis du statut MSI *in vitro* ¹⁶⁷. Les mécanismes de résistance à l'OXA sont quelque peu différents de ceux observés par d'autres agents platines tels que la cisplatine. Ces observations ont été étayées par le fait que les cellules dMMR démontrent une résistance au cisplatine mais pas à l'OXA, suggérant que les cellules MMR-déficientes sont toujours capables de reconnaître les dommages induits par l'OXA. Il est intéressant de noter que les composés tels que la cisplatine exercent leur activité anti-tumorale par induction de l'apoptose *via* la reconnaissance des dommages par le système MMR ¹⁶⁸. Ainsi, quand le système MMR est déficient, la cellule devient

résistante aux mécanismes d'action de ces molécules à l'exception de l'oxaliplatine dont les dommages continuent à être reconnus, expliquant la sensibilité des tumeurs MSI à cet agent.

Les informations concernant l'utilisation adjuvante d'irinotécan dans les tumeurs MSI restent peu investiguées et controversées. Une analyse rétrospective (1 264 patients de stade III) a démontré l'impact du statut MSI sur la survie globale et la survie sans récurrence des patients avec une tumeur dMMR comparé aux patients atteints de tumeurs MMR-proficientes ¹⁶⁹. Cependant, cette observation ne fut pas supportée par l'analyse récente d'une cohorte de 1 254 patients (stade II et III), dans laquelle l'ajout d'IRI en adjuvant (protocole FOLFIRI) n'améliore pas de manière significative la survie globale des patients dMMR comparé aux patients pMMR ¹⁷⁰.

F. L'émergence des immunothérapies

Dans un contexte tumoral colique MSI, les mutations responsables d'un décalage du cadre de lecture entraîne la production de nombreux peptides néo-antigéniques. Une réponse immunitaire cellulaire et humorale est ainsi engendrée dans ces tumeurs ^{171,172}. Cette réponse semble jouer un rôle important sur le plan clinique, puisque l'immunité anti-tumorale a été récemment désignée comme facteur de bon pronostic dans les CCR MSI ¹⁷³, à l'instar de l'instabilité microsatellitaire.

Au cours de la progression tumorale, il a été démontré que les lymphocytes T présentent une augmentation de l'expression d'inhibiteurs de points de contrôle du système immunitaire appelés « checkpoints immunitaires » (Tim3, PD-1) entraînant une inactivation des propriétés anti-tumorales des cellules T cytotoxiques ¹⁷⁴. De manière intéressante, il a été démontré que les patients atteints d'un cancer colique MSI répondent positivement au traitement au pembrolizumab, un inhibiteur de PD-1. PD-1 est une molécule clé du «checkpoint immunitaire», réprimant une trop forte réponse immune potentiellement délétère pour l'organisme. Il a été suggéré que le nombre important de néo-antigènes associé au phénotype tumoral MSI pourrait expliquer l'importante réponse immunitaire et donc l'activation de ce contrôle du système immunitaire. Récemment, il a été démontré que le traitement au pembrolizumab était bénéfique pour une part significative des patients avec une tumeur colique MSI métastatique ¹⁷⁵. Ces données, associées à celles obtenues en utilisant un autre inhibiteur de PD-1 (nivolumab) combiné à un anticorps monoclonal

(ipilimumab) reconnaissant CTLA-4, un autre composant du système de contrôle immunitaire, suggèrent une stratégie thérapeutique d'intérêt pour les années à venir pour les tumeurs MSI ¹⁷⁶. Récemment mon équipe d'accueil a étudié conjointement la valeur pronostique du statut MSI des tumeurs et de l'infiltration immunitaire. Dans ce travail, il a été montré que la valeur pronostique de l'infiltration lymphocytaire est annexe dans les CCR MSI par rapport à ce qui est connu dans les CCR MSS. En revanche, c'est l'expression des « checkpoints » immunitaire (ICK) dans les tumeurs coliques MSI (*Marisa et al., accepté pour publication, JNCI, 2017*) qui revêt un rôle pronostique. Ainsi, une forte expression des points de contrôle de ce système est associée à un mauvais pronostic des tumeurs MSI, malgré une co-infiltration lymphocytaire cytotoxique majeure.

III. La protéine chaperonne HSP110

A mon arrivée au sein du laboratoire, mon équipe d'accueil avait identifié HSP110 comme gène cible de l'instabilité microsatellitaire dans les cancers colorectaux de type MSI ¹. Les travaux réalisés avaient permis (i) l'identification d'un mutant de la chaperonne HSP110; (ii) la mise en évidence de l'impact physiopathologique de la mutation d'*HSP110* dans les cancers colorectaux MSI et son rôle en particulier dans la réponse à la chimiothérapie chez les patients avec un CCR MSI ². Il s'agit de la première description d'une mutation affectant une chaperonne dans une pathologie tumorale chez l'homme.

HSP110 appartient à la famille des protéines chaperonnes HSP (*Heat Shock Protein*), jouant un rôle majeur dans l'homéostasie cellulaire. Afin de comprendre les fonctions relatives aux chaperonnes HSP en condition physiologique et tumorale, une brève introduction sera présentée (Figure 8 et 9). Puis, cette partie se focalisera plus en détails sur les fonctions physiologiques connues de la chaperonne HSP110 ainsi que son rôle dans le cancer, peu étudié comparativement à d'autres grandes protéines HSP comme HSP27, HSP70 et HSP90.

Les protéines HSP

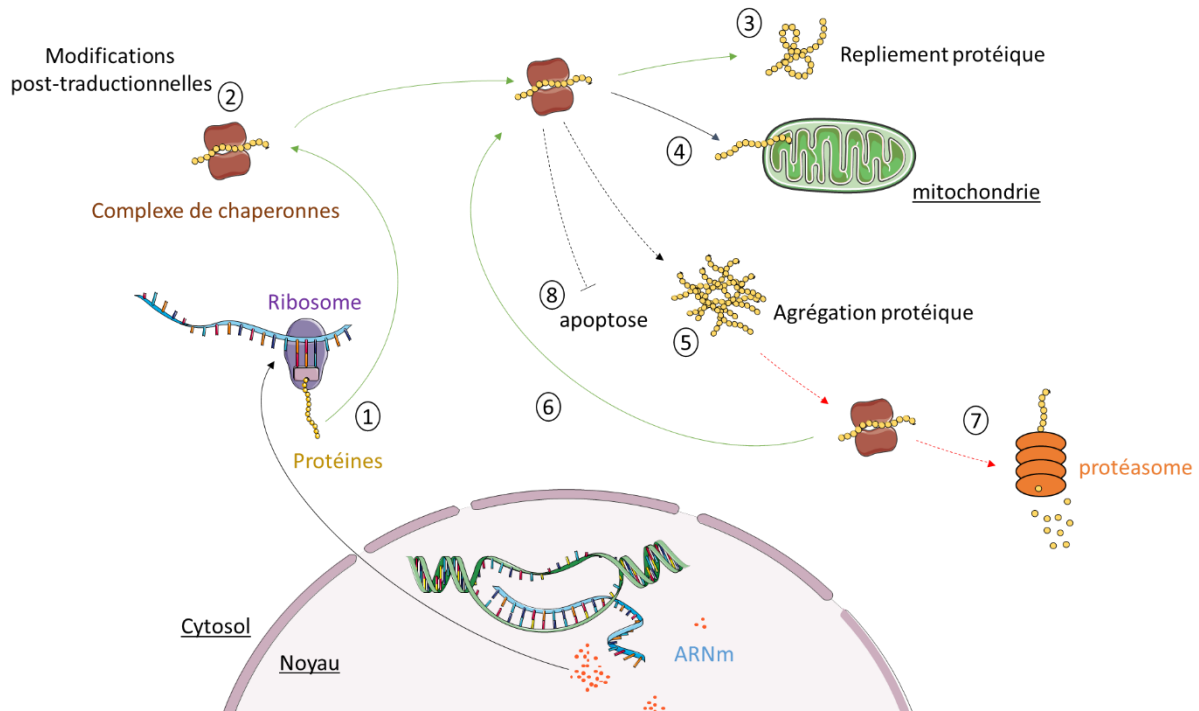


Figure 8 : Représentation schématique du rôle des HSP dans la cellule.

En tant que chaperonnes moléculaires, les HSP ont un rôle pléiotrope au sein de la cellule. En condition physiologique, ces protéines prennent en charge les protéines néo-synthétisées (1), favorisant ainsi des processus de modifications post-traductionnelles (2) et de repliement protéique (flèches vertes) (3). Par ailleurs, d'autres fonctions leurs sont attribuées incluant le transport subcellulaire de leur substrat (4), ou encore la participation à certaines voies de signalisation. En réponse au stress (flèches en pointillés), de nombreuses protéines partiellement dénaturées s'accumulent et se regroupent, formant des agrégats protéiques via l'exposition de leur domaine hydrophobe (5). Certaines protéines HSP sont alors capables de lier ces protéines partiellement dénaturées prévenant ainsi l'agrégation protéique et favorisant leur repliement correct (6). Toutefois, les HSP peuvent aussi favoriser l'élimination de ces protéines en les orientant vers la voie de dégradation du système ubiquitine-protéasome (flèches rouges), lorsque le repliement n'est pas possible (7). Par ailleurs, il a aussi été rapporté que les protéines HSP sont capables d'inhiber le processus apoptotique intrinsèque (inhibition de la formation de l'apoptosome) et extrinsèque (inhibition de la transduction du signal des récepteurs de mort) (8) ¹⁷⁷. (Adapté de Macario AJ et al., 2005 ¹⁷⁸).

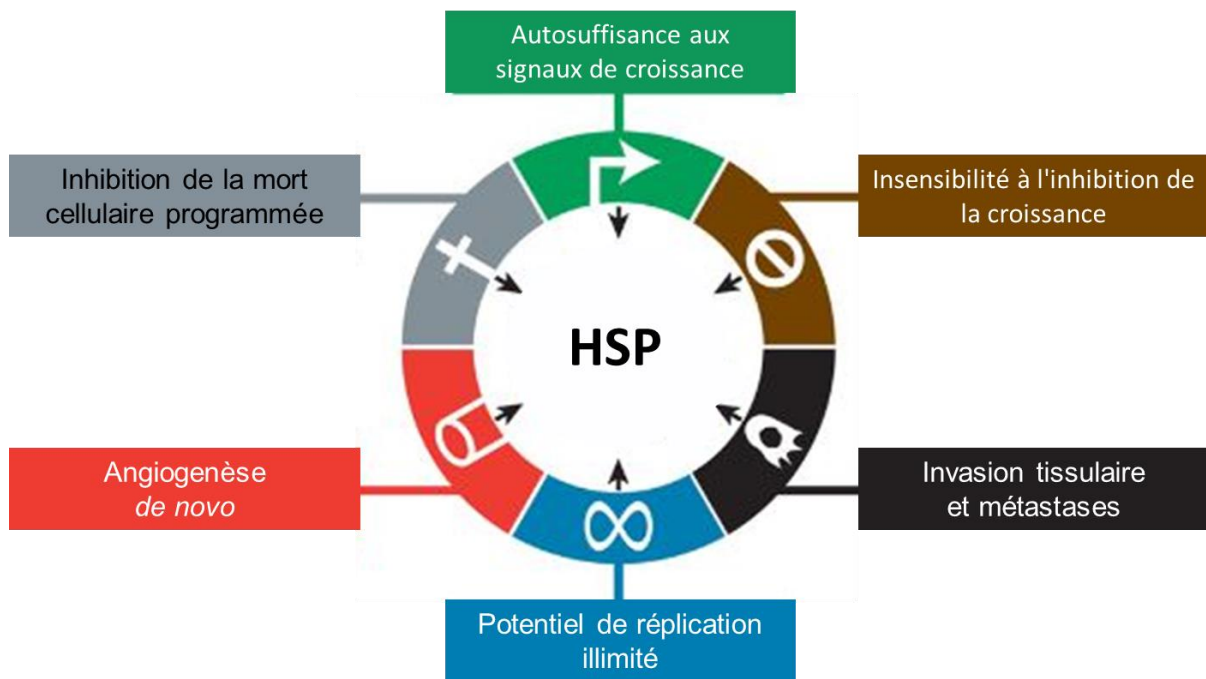


Figure 9 : L'implication des chaperonnes HSP dans le cancer.

En 2011, le développement tumoral a été organisé autour de six altérations essentielles afin de simplifier la complexité de cette maladie. Ces modifications majeures incluent (i) une autosuffisance aux signaux de croissance ; (ii) une insensibilité à l'inhibition de la croissance ; (iii) une invasion tissulaire et une capacité à développer des métastases ; (iv) un potentiel de réplication illimité ; (V) une angiogenèse *de novo* et (vi) une inhibition de la mort cellulaire programmée ¹⁷⁹. Bien que l'apparition de ces changements soit liée majoritairement à une instabilité génomique, de nombreuses études ont démontré l'implication de diverses protéines HSP (HSP27, HSP70 et HSP90) dans nombreux de ces processus, suggérant un rôle oncogénique de ces chaperonnes moléculaires (pour plus de détails cf. *Calderwood S.K et al., 2016* ¹⁸⁰). Compte tenu du rôle des HSP dans la biologie du cancer, ces chaperonnes ont aussi été suggérées comme des cibles thérapeutiques potentielles (pour revue cf. *Jego G et al., 2013 & Wu J et al., 2017* ^{181,182}). (Adapté de *Hanahan D et al., Cell, 2011* ¹⁷⁹).

A. Les caractéristiques de la chaperonne HSP110

La chaperonne HSP110, aussi connue sous le nom d'HSP105 ou HSPH1, appartient aux membres de la famille HSPH. Cette famille est composée de 3 autres membres : APG-1, APG-2 et GRP170 d'après la nomenclature HUGO (*Human Genome Organization*)¹⁸³. Bien qu'elle apparaisse comme une protéine distincte des autres HSP (HSP27, HSP40 HSP70 et HSP90) notamment à cause de son poids moléculaire ou de la spécificité de certaines séquences, HSP110 est un membre apparenté à la famille des protéines HSP70¹⁸⁴.

De manière intéressante, des homologies structurelles ont été mises en évidence entre la chaperonne HSP110 et DnaK, l'homologue d'HSP70 chez *Escherichia Coli*¹⁸⁵. D'un point de vue structurel (Figure 10), HSP110 est composé de trois domaines majeurs : (i) un domaine ATPase situé en N-terminal, permettant la fixation de l'ATP ; (ii) un domaine de liaison au peptide (SBD), comprenant le feuillet β (formé par 7 brins β) ; (iii) un domaine H composé d'une séquence NES (*Nuclear export signal*) et d'une série d'hélices α en C-terminal, contenant des séquences spécifiques, appelées « Magic » et « TedWlyee », impliquées dans la reconnaissance et la liaison de substrats ou de co-chaperonnes¹⁸⁶. Il est intéressant de noter qu'une structure supplémentaire (boucle), contenant une séquence NLS (*Nuclear localisation signal*), est présente entre le domaine SBD et le domaine H.

De nos jours, deux isoformes physiologiques d'HSP110 ont été décrites, HSP110 α et HSP110 β . HSP110 α est une isoforme constitutive et inductible majoritairement cytoplasmique alors que HSP110 β est une isoforme nucléaire, exprimée suite à un choc thermique à 42°C¹⁸⁷. L'isoforme β résulte de l'épissage alternatif de l'exon 12 conduisant à la délétion d'une séquence spécifique de 44 acides aminés appelée « Spliced-Out » (SO). L'absence de cette séquence entraîne une activation constitutive du domaine NLS et de ce fait une expression spécifiquement nucléaire de cette isoforme^{188,189} (Figure 10). Il est à noter que les fonctions potentielles d'HSP110 β restent peu connues, compte tenu de son induction très spécifique à la chaleur et de sa compartimentation subcellulaire.

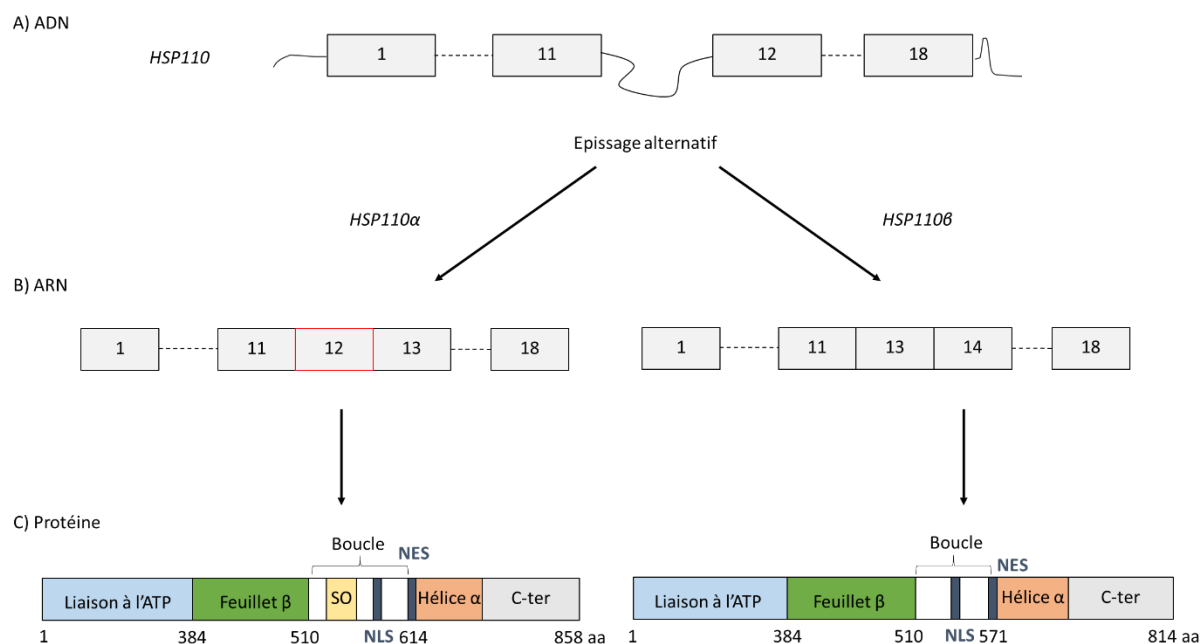


Figure 10 : Représentation schématique du gène *HSP110* et des isoformes *HSP110α* et *HSP110β*. Le gène *HSP110*, composé de 18 exons (A), est transcrit en deux ARNm *HSP110α* et *HSP110β*, issu de l'épissage alternatif de l'exon 12 (contour en rouge). (B). Les protéines correspondantes sont alors composées de 858 et 814 acides aminés, suite à la délétion de la séquence SO (en jaune) (C).

A l'instar d'autres protéines HSP, l'expression d'*HSP110* peut être induite en réponse à de nombreux stress physico-chimiques et est dépendante du facteur de transcription HSF1 (*Heat Shock Factor 1*), capable de se fixer aux séquences HSE (*Heat Shock Element*) présentes au sein de son promoteur^{190,191}. Qui plus est, il a récemment été rapporté la présence de sites de fixation du facteur de transcription STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) au niveau du promoteur du gène *HSP110* chez l'Homme, suggérant une régulation de l'expression de cette chaperonne par la protéine STAT3¹⁹².

B. Les fonctions de la protéine chaperonne *HSP110*

De nombreuses études ont montré que la protéine chaperonne *HSP110* possède certaines propriétés fonctionnelles partagées avec la famille des protéines *HSP70*. En effet, il a été montré qu'*HSP110* confère une résistance thermique aux cellules lorsqu'elle est surexprimée et empêche l'agrégation de protéines dénaturées *in vitro*¹⁹³. Cette dernière propriété est dépendante de son activité chaperonne. Aussi,

HSP110 est capable de maintenir les protéines dénaturées dans un état favorisant leur repliement protéique de manière plus efficace qu'HSC70 (isoforme constitutive de la famille HSP70). Il a été suggéré que la présence de domaines particuliers puisse avoir un impact potentiel sur sa fonction chaperonne. Par exemple, la taille importante de sa région C-terminal semble jouer un rôle dans la régulation de l'entrée et/ou la sortie du substrat au niveau du domaine SBD ¹⁹⁴. Il est à noter que sa capacité à maintenir les protéines dans un état favorisant le repliement *in vitro* ne soit pas liée à son domaine ATPase, suggérant d'autres implications de ce domaine tel que la régulation de la fixation au domaine de liaison au substrat ¹⁸⁵. En accord avec ces données, son activité anti-agrégation semble être plus importante en présence d'ADP comparé à l'ATP, suggérant un rôle plus important d'HSP110 en condition sévère de stress, dans laquelle la quantité d'ATP diminue grandement ¹⁹⁵.

Outre sa fonction chaperonne, HSP110 est aussi capable de s'associer avec d'autres protéines HSP, démontrant une activité co-chaperonne. Aussi, il a été montré qu'HSP110 forme un complexe avec la protéine HSC70 ¹⁹⁶. Cette association semble réguler l'activité chaperonne d'HSC70 *via* l'inhibition de son domaine ATPase par la protéine HSP110 ^{197,198}. De manière intéressante, il a été montré que la sérine/thréonine kinase CK2 (*Casein Kinase 2*) est capable de moduler l'activité inhibitrice d'HSP110 sur la chaperonne HSC70 ^{199,200}. Il a aussi été proposé qu'HSP110 possède 7 sites de phosphorylation *in vivo*, suggérant que des modifications post-traductionnelles de la chaperonne puisse moduler son activité chaperonne et co-chaperonne. Par ailleurs, un autre partenaire de la chaperonne HSP110 a été identifié. En 2006, il a été suggéré qu'HSP110 agisse comme facteur d'échange de nucléotides de la chaperonne ATP-dépendante HSP70 (principale isoforme inductible de la famille HSP70) *in vitro*, modulant ainsi son activité chaperonne ²⁰¹.

En dehors de son implication dans l'homéostasie protéique, HSP110 joue aussi un rôle dans la régulation de l'apoptose en réponse au stress. Cette chaperonne peut entraîner (i) l'inactivation de la kinase JNK (*c-Jun N-terminal kinase*, membre de la famille des MAPK kinases) ²⁰² ; (ii) l'inhibition de la translocation de BAX, protéine responsable de la libération de cytochrome c ²⁰³ ; ou encore (iii) l'inhibition de la voie p38 MAPK (*p38 mitogen-activated protein kinase*) ²⁰⁴. Cependant, HSP110 semble favoriser des mécanismes pro-apoptotiques induits par l'H₂O₂ dans des cellules

embryonnaires de souris ²⁰⁵, suggérant une spécificité des fonctions apoptotiques de cette chaperonne en fonction du type cellulaire.

Il est intéressant de noter que les chaperonnes HSP sont considérées comme des protéines intracellulaires, cependant elles peuvent être libérées dans le compartiment extracellulaire, démontrant leurs implications dans d'autres mécanismes. Ainsi, la libération d'HSP110 à partir de cellules épithéliales intestinales a été observée dans un processus physiologique de renouvellement de l'épithélium intestinal ²⁰⁶. Dans ce travail, la protéine extracellulaire HSP110 induit l'expression du récepteur CD1d à la surface des cellules épithéliales intestinales, lui permettant d'agir comme une molécule présentatrice d'antigènes glyco-lipidiques. L'activation de ce récepteur entraîne par conséquent la production d'IL-10 (*Interleukin 10*), une cytokine anti-inflammatoire, protégeant l'épithélium intestinal des effets délétères de certaines cytokines incluant l'interféron γ ²⁰⁷.

C. Le rôle de la chaperonne HSP110 dans la tumorigenèse

La chaperonne HSP110 est surexprimée dans divers cancers incluant le mélanome, le cancer du sein, le cancer colorectal et le cancer du pancréas ²⁰⁸. Dans le cancer colorectal et les mélanomes, sa surexpression est associée à la progression de la maladie ^{209,210}. En accord avec ces données, il est suggéré que la surexpression d'HSP110 est un facteur de mauvais pronostic dans le cancer colorectal ^{210,211}. Cependant, l'augmentation de son expression est associée à un bon pronostic dans les cancers de l'œsophage ²¹². Dans ce contexte, l'expression d'HSP110 est associée à une forte infiltration lymphocytaire (lymphocyte T CD4 +), contribuant au bon pronostic de ces patients.

Les études concernant le rôle de la protéine chaperonne HSP110 dans la tumorigenèse restent peu nombreuses en comparaison des autres HSP et sont principalement associées à sa fonction anti-apoptotique ^{213,214}. Néanmoins, depuis quelques années de nouveaux mécanismes impliquant HSP110 dans le développement tumoral ont vu le jour. Ainsi, la fonction chaperonne de cette protéine semble participer au développement tumoral. L'invalidation d'HSP110 perturbe l'intégration de la protéine phosphatase 2A (PP2A) dans le complexe de dégradation de la β -caténine, entraînant une dégradation de la β -caténine et une diminution de la prolifération des lignées de cancer du côlon, porteuses de la mutation APC ²¹⁵. Par

ailleurs, il a été rapporté que la chaperonne HSP110 est capable d'interagir avec les oncoprotéines BCL-6 et C-MYC, favorisant leur stabilisation dans des modèles cellulaires agressifs de lymphomes B non-Hodgkiniens ²¹⁶.

La localisation subcellulaire d'HSP110 semble aussi impacter le processus tumoral. En 2011, une étude a montré que la présence de la chaperonne HSP110 au niveau de la membrane plasmique de lymphomes B non-Hodgkinien est corrélée à l'agressivité de la tumeur ²¹⁷. Plus récemment, une collaboration entre notre laboratoire d'accueil et l'équipe de Carmen GARRIDO (Dijon) a permis d'établir une association entre le niveau d'HSP110 extracellulaire et la polarisation des macrophages dans les tumeurs coliques MSI. Ainsi, un fort niveau d'HSP110 extracellulaire influence la polarisation des macrophages vers un profil pro-tumoral (M2) et à l'inverse un bas niveau d'HSP110 extracellulaire entraîne les macrophages vers un profil anti-tumoral (M1). De manière intéressante, l'altération du profil inflammatoire des macrophages semble se faire *via* la voie de signalisation dépendante du récepteur TLR4 (*Toll Like Receptor 4*) ²¹⁸. Par ailleurs, la localisation nucléaire de la chaperonne HSP110 a été suggéré comme facteur de mauvais pronostic en réponse à la chimiothérapie dans les cancers gastriques ²¹³.

En 2011, mon équipe d'accueil a identifié la première mutation de la chaperonne HSP110 dans les tumeurs coliques de type MSI ¹. Le gène *HSP110* contient un microsatellite mononucléotidique T₁₇ situé au niveau de la séquence polypyrimidique en amont du site accepteur d'épissage de l'intron 8 (Figure 11-A) dont les délétions, variables entre 1 à 7 bases, sont fréquentes et bi-alléliques dans les tumeurs colorectales MSI ². Ces délétions somatiques au niveau du microsatellite T₁₇ ont pour conséquence une perte dynamique de l'expression de la protéine sauvage HSP110 dépendante de la taille des délétions (Figure 11-B). Parallèlement à la perturbation de l'épissage du transcrit sauvage, la synthèse d'un transcrit mutant nommé HSP110DE9 est favorisée. Cet ARNm mutant, dépourvu d'exon 9, possède un codon stop prématuré dans l'exon 10 suite au décalage du cadre de lecture induit par le saut d'exon et code en conséquence une forme tronquée de la chaperonne HSP110 (HSP110DE9) dans les cellules tumorales de type MSI (Figure 11-A).

Dans une première étude publiée dans le journal *Nature Medicine*, mon laboratoire d'accueil a montré que cette protéine mutante est capable d'interagir directement avec la protéine HSP110 sauvage afin d'inhiber son activité chaperonne, démontrant un

effet dominant négatif de la protéine mutée ¹. Une analyse *in silico* a suggéré que le mutant HSP110DE9 interagit avec la protéine sauvage au niveau de son domaine de liaison au substrat *via* les acides aminés ASP633 (acide aspartique 633), GLN707 (glutamine 707) et GLU708 (acide glutamique 708) ². De manière intéressante, lorsqu'elle est surexprimée, cette protéine mutante a un rôle pro-apoptotique et chimiosensibilisant dans des lignées de CCR traitées par chimiothérapie (5-FU ou OXA), suggérant un intérêt thérapeutique de ce mutant.

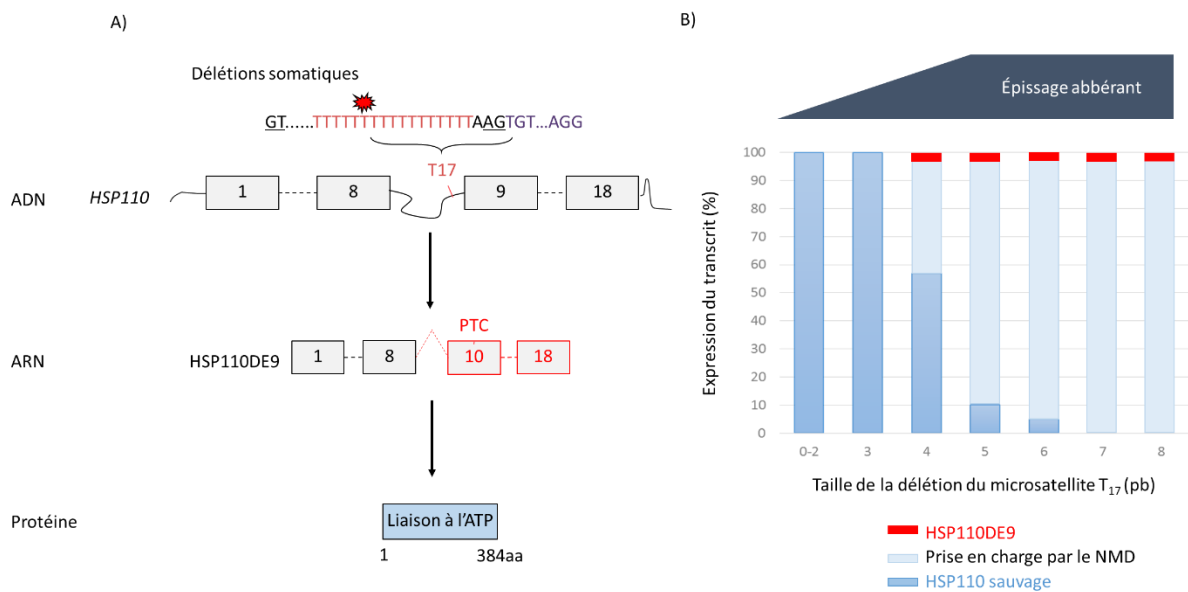


Figure 11 : La mutation de la chaperonne HSP110 dans les CCR MSI. (A) Les délétions somatiques au niveau du microsatellite T₁₇ perturbent l'épissage du transcrit sauvage au profit du transcrit mutant HSP110DE9, dépourvu d'exon 9 et possédant un codon stop prématuré dans l'exon 10 due au décalage du cadre de lecture induit par le saut d'exon. Il code en conséquence une forme tronquée de la chaperonne HSP110, ne possédant que son domaine de liaison à l'ATP. (B) La mutation entraîne une perte d'expression du transcrit sauvage HSP110 (en bleu) corrélée à la taille de la délétion au niveau du microsatellite T₁₇. Ces délétions favorisent un épissage aberrant qui atteint un plateau lorsqu'une perte allélique supérieure ou égale à 5 paires de bases est atteinte entraînant par conséquent une perte totale de l'expression du transcrit sauvage. À l'inverse, l'expression du mutant HSP110DE9 (en rouge) ne semble pas augmenter en fonction de la taille de la délétion suggérant une contre-régulation par le NMD (en bleu clair).

Plus récemment, mon équipe d'accueil a analysé le statut mutationnel d'HSP110 dans une large série d'ADN issus de CCR primitifs MSI. Il a été démontré dans ce travail que les délétions somatiques du microsatellite T₁₇ de grandes tailles (≥ 5 paires

de bases) entraînent une perte complète de l'expression de la protéine HSP110 et donc de son activité (Figure 11-A) ². De manière remarquable, les patients de stade II et III avec des délétions de grande taille dans la tumeur (25% des cas) montrent une excellente réponse au traitement par chimiothérapie (5-FU), contrairement aux autres patients (petites délétions < de 5 paires de base), représentant 75% des cas. Cependant, il est à noter que les patients ne semblent pas bénéficier de l'effet de la mutation sur la survie en absence de chimiothérapie.

En accord avec ces résultats, une équipe coréenne a montré que la faible expression d'HSP110 sauvage est associée au meilleur pronostic en réponse au 5-FU dans une cohorte de 108 tumeurs primaires coliques MSI ²¹¹. De plus, cette équipe a suggéré que l'analyse de l'expression de la protéine sauvage HSP110 par immunohistochimie puisse être une méthode complémentaire afin d'identifier les patients MSI avec un bon pronostic en réponse à la chimiothérapie.

IV. Le système « Nonsense-mediated mRNA decay »

Le système responsable de la surveillance des transcrits messagers, appelé NMD (*Nonsense-mediated mRNA decay*), est un processus conservé chez les eucaryotes. Il est, entre autres, capable de reconnaître et de dégrader les ARNm porteurs d'un PTC, faisant suite à une erreur de transcription, à une mutation ou encore à un épissage aberrant ²¹⁹. Ce processus permet d'éviter la production de protéines tronquées, qui pourraient avoir des effets délétères pour la cellule normale (dominant négatif, gain de fonction...) ²²⁰.

Les cancers MSI sont caractérisés par un nombre important de mutations au niveau des microsatellites. Ces mutations sont responsables, dans la majorité des cas, d'un décalage du cadre de lecture ¹⁰⁰. Lorsque ces mutations touchent un microsatellite codant, cela entraîne la production de nombreux transcrits mutants porteurs de PTC, codant pour des protéines tronquées généralement perte de fonction, du fait de la localisation proximale du microsatellite. Cependant, dans les cas où les répétitions sont plus distales, d'autres répercussions fonctionnelles (perte partielle de fonction, dominant négatif...) potentiellement délétères pour la cellule tumorale peuvent être attendues. Nous avons fait l'hypothèse que dans un contexte MSI, de nombreux transcrits mutés pourraient potentiellement permettre la production de protéines délétères, à l'instar d'HSP110DE9. Dans ce contexte, je me suis intéressé à l'étude de l'inhibition du système NMD afin de comprendre son rôle dans la carcinogenèse colique MSI et de proposer une approche thérapeutique innovante dans les CCR MSI, favorisant la potentialisation de mutants délétères pour la cellule tumorale à l'instar du mutant HSP110DE9.

Au cours de ce chapitre, je décrirai un des modèles d'activation de ce système (Figure 12). Le modèle EJC (*Exon Junction Complex*) décrit la majorité des cas de figures d'activation du NMD. Il fonctionne selon la règle des 50-55 nucléotides, suggérant qu'un PTC localisé à moins de 55 nucléotides de la dernière jonction exon-exon n'entraînera pas d'activation du NMD. Toutefois, du fait de certaines exceptions, il a été suggéré que la distance entre le PTC et la protéine PABPC1, présente en 3' de l'ARNm, puisse être responsable de l'activation du NMD ²²¹. Suite à la description du modèle d'activation dépendant des EJC, l'implication du NMD dans la tumorigenèse, incluant celle de type MSI, et les différentes méthodes rapportées jusqu'alors afin de l'inhiber seront décrites.

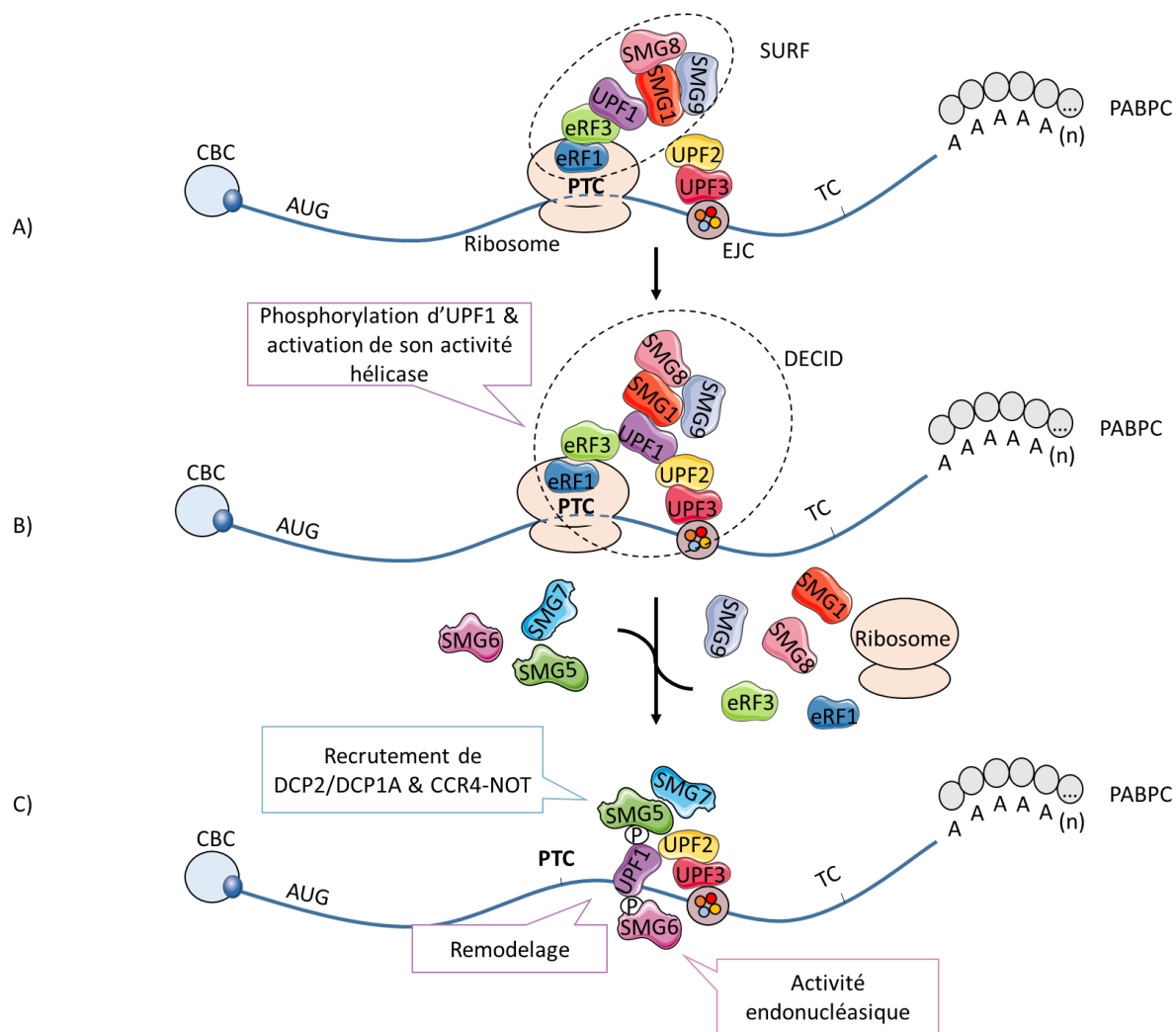


Figure 12 : Représentation schématique du modèle d'activation du système NMD dépendant des EJC.

Les ARNm nouvellement synthétisés sont caractérisés par (i) la présence sur la coiffe en 5' d'un complexe CBC (*Cap Binding Complex*), composé des protéines CBP80-CBP20 ; (ii) des complexes multi-protéiques EJC, composés principalement des protéines IF4AIII, Y14, Magoh et MLN51 (cercles rouge, orange, bleu et jaune compris dans l'EJC), recrutés sur l'ARNm à 20-24 nucléotides en amont de chaque jonction exon-exon, suite à l'épissage des introns²²² ; (iii) des protéines PABPN1 et PABPC1 (*PolyA-Binding Protein Nuclear 1* et *Cytoplasmic 1*) fixées sur la queue polyA en 3'.

(A) Lorsqu'un codon stop est situé 50-55 nucléotides en amont de la dernière jonction exon-exon, il est reconnu comme aberrant par le ribosome pendant le premier cycle de la traduction. Le complexe, formé par la protéine eRF1 (*Eukaryotic Release Factor 1*) et la protéine eRF3 (*Eukaryotic Release Factor 3*), se fixe alors au niveau du site A du ribosome, entraînant l'activation du NMD. La sous-unité CBP80 (*Complex Binding Protein 80*) de la coiffe (5') favorise alors le recrutement d'UPF1 (*Up-Frameshift 1*), sous forme inactive au niveau des protéines eRF1 et eRF3 fixés au ribosome. UPF1 est le facteur clé du NMD, possédant une activité hélicase ATP-dépendante. Cette

protéine est alors liée par la sérine/thréonine kinase SMG-1 (*Suppressor with Morphogenic effect on Genitalia 1*) afin de former le complexe SURF. Parallèlement, les protéines SMG-8 et SMG-9 interagissent avec SMG-1 pour réguler son activité kinase et bloquer la phosphorylation d'UPF1 ²²³.

(B) L'interaction du complexe SURF avec la protéine adaptatrice UPF2, liée au complexe EJC *via* UPF3 ^{224,225}, entraîne la formation du complexe DECID (*Decay Inducing Complex*). La liaison d'UPF1 avec UPF2 entraîne un changement de conformation de ce facteur clé du NMD, favorisant sa phosphorylation par SMG-1 au niveau de sites de phosphorylations en N-terminal et C-terminal ²²⁶ et par conséquent l'activation de son activité hélicase d'UPF1 ²²⁷.

(C) Il est à noter que l'activation d'UPF1 lui permet d'interagir avec le transcrit et de retirer toutes les protéines en aval du PTC, préparant ainsi la dégradation de l'ARNm. De plus, la phosphorylation d'UPF1 semble entraîner une répression traductionnelle du mutant ²²⁸, la libération du ribosome et des eRF (1 et 3) ainsi que le recrutement des protéines SMG-5, 6 et 7, responsable de la libération de SMG-1, 8 et 9. La protéine SMG-6 possède une activité endonucléase *via* son domaine PIN (*Pilt N-terminus*), responsable de la formation de deux produits de clivage contenant d'une part le PTC (5') et d'autre part les composants du NMD ainsi que les facteurs EJC (3') ²²⁹⁻²³¹. Il a été suggéré que le produit de clivage 5' est soumis à une dégradation (3'-5') par l'exosome ²³², tandis que l'intermédiaire 3' est probablement dégradé par des exonucléases 5'-3' incluant XRN1 ²³³. Parallèlement, l'hétérodimère formé par les protéines SMG-5/SMG-7, dépourvu d'activité nucléase intrinsèque, favorise le recrutement de complexe de déadénylation CCR4-NOT et de décoiffage DCP2/DCP1a, favorisant la dégradation du transcrit mutant par les exoribonucléases. Il est important de noter que les protéines SMG-5, SMG-6 et SMG-7 permettent le recrutement de la protéine phosphatase PP2A, responsable de la déphosphorylation d'UPF1, nécessaire à l'activation du NMD ^{226,234-236}. (*Adapté de Le Hir et al., 2016* ²³⁷).

A. L'implication du NMD dans le cancer

Le rôle du NMD dans la cellule tumorale est complexe et peut être considéré comme bénéfique ou néfaste en fonction de la nature de la mutation et de la localisation tumorale. Ainsi, dans les cas où les mutations entraînent la production de mutants dominant négatifs de gènes suppresseurs de tumeurs, le NMD a un effet protecteur. Dans les cancers du sein, ce système permet la dégradation du transcrit mutant BRCA1, codant pour une forme tronquée dominante négative de ce GST. La contre-régulation de ce mutant est essentielle, puisque cette isoforme semble être associée à des mécanismes de chimiorésistance dans les cancers du sein, suggérant donc un effet bénéfique du NMD dans ces conditions ²³⁸. A l'inverse, lorsque la mutation au niveau d'un GST permet la synthèse de mutants partiellement fonctionnels, il est suggéré que le NMD ait un rôle pro-oncogénique *via* la dégradation du mutant. La protéine E-cadhérine en est un exemple. Lorsqu'elle est tronquée en C-terminal, une fonction partielle est conservée ²³⁹. Ainsi, dans les cancers gastriques héréditaires HDGC (*Hereditary Diffuse Gastric Cancer*), la grande majorité des mutations germinales du gène *CDH1* (*Cadherin-1*) conduisent à la génération de PTC en 3' de l'ARNm, dont la plupart sont reconnus par le NMD, réduisant considérablement le niveau d'expression de l'E-cadhérine mutante partiellement fonctionnelle. D'un point de vue clinique, les patients dont le cancer est caractérisé par des mutations cibles du système NMD montrent une fréquence d'apparition plus précoce de cancers gastriques comparée aux patients dont les mutations ne le sont pas, suggérant le rôle délétère du NMD dans ce contexte ²⁴⁰.

De manière intéressante, une méta-analyse de 7 500 mutations a suggéré que la plupart des mutations portées par les oncogènes étudiés sont des mutations de type faux-sens alors que les gènes suppresseurs de tumeurs (GST) sont caractérisés par un nombre plus élevé de mutations non-sens ²⁴¹. De manière générale, ces données suggèrent que les mutations des GST sont ciblées par le NMD alors que celles touchant les oncogènes ne semblent pas être régulées par ce processus. Par extrapolation, le processus de sélection tumoral semble être le fruit de mutations tirant profit du NMD pour le bénéfice de la tumeur ²⁴².

Comme décrit ci-dessus, le système NMD peut bénéficier au patient ou à la tumeur, en fonction des gènes mutés et de la localisation du PTC. Cependant, un niveau de complexité supplémentaire est ajouté lorsque l'on prend en compte la

capacité de ce système à réguler l'expression d'un vaste répertoire de transcrits physiologiques ^{236,243,244}. Ainsi, une augmentation de l'expression de nombreuses cibles, impliquées dans la réponse au stress et dans le développement tumoral (métabolisme des acides aminés), a été observée dans un modèle cellulaire d'ostéosarcome suite à l'inhibition du NMD ²⁴⁴. Il a alors été suggéré que l'inhibition du NMD par le microenvironnement tumoral puisse être importante dans la régulation de l'expression de nombreux gènes critiques dans la tumorigenèse. En accord avec ces données, nombreux de ces transcrits sont surexprimés dans divers cancers incluant le lymphome de Burkitt, le mélanome, le cancer du sein et de la prostate. Par ailleurs, les cancers squameux du pancréas, associés à un mauvais pronostic et un fort potentiel métastatique, semblent être porteurs de mutations fréquentes (environ 80%) sur le gène *UPF1*, responsables d'un épissage aberrant et de sa perte d'expression ²⁴⁵. Ces mutations inactivatrices semblent être sélectionnées et responsables de la surexpression de nombreux transcrits cibles du NMD dans ces tumeurs, suggérant un rôle oncogénique de l'inhibition du NMD dans ce contexte.

Concernant l'impact du système NMD dans les tumeurs MSI, peu de choses ont été décrites jusqu'à aujourd'hui. Dans les années 2000, mon laboratoire d'accueil a démontré que le système NMD est responsable de la dégradation différentielle de nombreux transcrits mutés précédemment rapportés (*TGFBR2*, *MSH3*) contenant un PTC dans des modèles cellulaires établis de CCR MSI et des CCR MSI primitifs ^{15,246}. En accord avec nos données, une autre équipe a démontré que le système NMD est responsable de la dégradation de transcrits mutants *in vitro* ²⁴⁷. De manière intéressante, l'expression d'*UPF1* semble être augmentée dans les CCR primitifs MSI en comparaison des tumeurs MSS. Par ailleurs, l'accumulation de transcrits mutés cibles de MSI est inversement proportionnelle à l'expression d'*UPF1*, suggérant une régulation de l'expression de ces mutants par le NMD *in vivo* ^{15,246}. Toutefois, la dégradation de ces ARNm dans les cellules tumorales est partielle et non systématique pour des raisons encore non totalement élucidées ²⁴⁸. En outre, l'expression de ce facteur dans les cellules tumorales semble être inversement corrélée au degré d'infiltration de la tumeur par des lymphocytes T cytotoxiques CD3+, témoin d'une immunité anti-tumorale de l'hôte ¹⁵. En accord avec l'ensemble de ces données, il semblerait que le NMD joue un rôle pro-tumoral dans un contexte MSI. Son inhibition semble favoriser une réponse immunitaire anti-tumorale *via* la production de peptides

antigéniques, suggérant que le NMD puisse être une cible thérapeutique d'intérêt dans les tumeurs MSI ^{249,250}.

B. Les différentes méthodes d'inhibition du NMD

Un protocole d'étude à grande échelle appelé GINI (*Gene Identification by NMD Inhibition*) a été développé afin d'identifier les transcrits possédant une mutation non-sens ²⁵¹. Ce protocole se base sur l'utilisation de l'émétine (antibiotique capable d'inhiber la traduction) et de l'actinomycine D (inhibiteur transcriptionnel) afin d'inhiber indirectement le système NMD. Cette méthode a permis d'identifier de nouvelles mutations non-sens dans les gènes *UVRAG* et *P300* dans des modèles cellulaires colorectaux MSI ²⁵². Il est à noter que d'autres composés inhibiteurs de la traduction incluant la cycloheximide et la puromycine sont aussi capables d'induire une inhibition indirecte du système NMD ^{251,253}. D'autres gènes cibles de l'instabilité microsatellitaire ont été identifiés *in vitro* via l'utilisation de la caféine, un inhibiteur de la phosphorylation d'UPF1 (protocole GINI2) ²⁵⁴. Par ailleurs, l'inhibition du NMD via un ARN interférence dirigé contre *UPF1* (siUPF1) associée au protocole GINI a permis de mettre en évidence l'existence de nouveaux gènes cibles de l'instabilité microsatellitaire (*MLL3*, *PHARCTR4*, *RUFY2*) fréquemment mutés dans un contexte tumoral MSI ²⁴⁷.

Au cours des dernières années de nouvelles méthodes d'inhibition du système NMD ont été développées. Par exemple, le miR-128 a été rapporté comme potentiel inhibiteur du NMD, entraînant une diminution de l'expression d'*UPF1* lorsque ce miRNA est surexprimé ²⁵⁵. Qui plus est, une autre méthode d'inhibition génétique a été mise en évidence, suggérant l'utilisation d'oligonucléotide anti-sens, aussi appelé ASO ²⁵⁶. Les ASO peuvent être conçus pour bloquer les sites de liaison des protéines liées à l'ARN, entraînant des effets incluant l'inhibition de l'initiation de la traduction. Dans ce travail, ces oligonucléotides ont été utilisés afin de bloquer le dépôt du complexe EJC en aval du PTC. De manière intéressante, une augmentation de l'expression de mini-gènes rapporteurs sensibles au NMD (*MECP2* et *HBB*) a été observée dans les cellules transfectées avec l'ASO.

Outre ces méthodes génétiques, de nouvelles molécules ont été suggérées comme potentiel inhibiteur du système NMD. Ainsi, l'équipe de F. LEJEUNE ont identifié un nouvel inhibiteur spécifique du NMD, le NMDI-1 ²⁵⁷. Cette molécule entraîne une perte d'interaction entre la protéine SMG-5 et UPF1, altérant le cycle de

phosphorylation/déphosphorylation d'UPF1, nécessaire à l'activation du NMD. De manière intéressante, l'utilisation de cet agent entraîne une augmentation de l'expression de transcrits cibles du NMD *in vivo* ²⁵⁸. Par ailleurs, le NMDI-1 semble favoriser l'expression de gènes pro-apoptotiques (*GADD45α*, *GADD45β*, *BAK1*) *in vitro* ²⁵⁹, suggérant qu'un prétraitement avec cet inhibiteur puisse être d'intérêt afin de potentialiser l'effet de la doxorubicine (chimiothérapeutique) *in vitro*. Dans ce travail, il a aussi été montré que l'induction de l'apoptose par la doxorubicine entraîne la production d'une forme clivée d'UPF1, interférant avec la forme endogène (dominant négatif) et inhibant le NMD. En accord avec ces résultats, Jia et ses collaborateurs ont montré que certaines caspases sont responsables de l'inhibition du NMD au cours du processus apoptotique induit par la staurosporine ²⁶⁰. Dans cette étude, il a été observé que les facteurs UPF1 et UPF2 sont clivés par les caspases 3 et 7 pendant l'apoptose, entraînant par conséquent une inhibition de l'activité du NMD ainsi que la stabilisation et l'expression d'ARNm mutant contenant un PTC. Il est à noter qu'un analogue du NMDI-1, appelé VG-1, a été récemment identifié comme potentiel inhibiteur du NMD ²⁶¹. Cependant, son mécanisme d'action n'a pas été encore été démontré.

L'amlexanox, une molécule utilisée depuis des décennies en clinique dans le traitement des aphtes et des ulcères aphteux, a été identifié en 2012 par l'équipe du Dr. Fabrice LEJEUNE comme potentiel inhibiteur du NMD *in vitro* ²⁶². Son utilisation favorise la stabilisation et l'expression de transcrits mutants contenant un codon stop prématuré *in vitro*. Toutefois, son mécanisme d'action sur le NMD n'est pas encore totalement élucidé.

RESULTATS

ARTICLE 1

“HSP110 promotes colorectal cancer growth through STAT3 activation”

K. Berthenet, A. Bokhari*, et al., Oncogene, 2016. (*co-premier auteurs)*

Résumé n°1

Cet article, en collaboration avec l'équipe du Dr. Carmen GARRIDO (Dijon), est le troisième publié par le laboratoire d'accueil qui a comme principal objet l'étude de la protéine HSP110 et de sa mutation dans les cancers coliques MSI. L'objectif de mon travail a été d'investiguer le rôle physiopathologique de la mutation dans le processus tumorigénique colorectal, en dehors de son rôle proposé comme facteur pronostique en réponse à la chimiothérapie. Nos résultats ont permis de démontrer que la mutation du microsatellite T₁₇ d'*HSP110*, responsable de la diminution (délétions de petites tailles < 5 paires de base) ou de l'extinction (délétions de grandes tailles ≥ 5 paires de base) de l'expression de la protéine sauvage HSP110 a pour conséquence une diminution de la prolifération cellulaire *in vitro* et de la croissance tumorale *in vivo* dans des modèles de xénogreffes sous cutanée (souris *nude*). Des résultats similaires ont été obtenus, lorsqu'HSP110 est inhibé par l'utilisation de shARN (*small hairpin ARN*) spécifiquement dirigé contre HSP110 ou *via* la surexpression du mutant dominant négatif HSP110DE9, inhibiteur endogène de la chaperonne sauvage HSP110. Par ailleurs, nous avons mis en évidence d'un point de vue moléculaire que cet impact anti-tumoral de la mutation d'*HSP110* est en partie lié à la diminution de la phosphorylation du facteur de transcription STAT3 *in vitro* et *in vivo* (Figure 13).

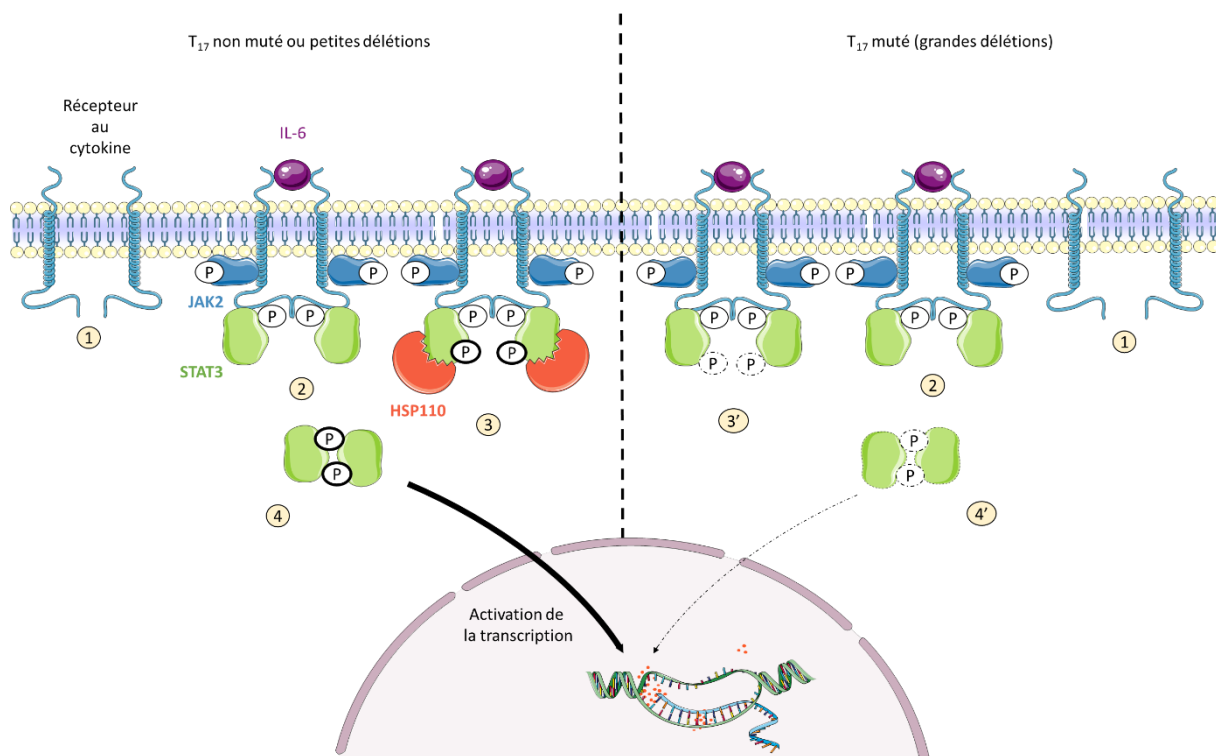


Figure 13 : Représentation schématique du rôle d'HSP110 dans l'activation de la voie STAT3 par l'IL-6.

(1) Les récepteurs aux cytokines sont des récepteurs transmembranaires ne possédant pas d'activité kinase et présents sous la forme de monomères lorsqu'ils sont inactifs. (2) Suite à la liaison de l'interleukine 6 (IL-6), les protéines JAK2 sont recrutées au niveau du domaine cytoplasmique d'une sous-unité du récepteur (Gp130). Parallèlement, une homodimérisation des récepteurs est observée entraînant la phosphorylation de la protéine JAK2 (*Janus Kinase 2*), qui par conséquent phosphorylent les résidus tyrosines présents en C-terminal du récepteur. (**T₁₇ non muté ou petites délétions**) (3) La phosphorylation du récepteur entraîne le recrutement de la protéine STAT3 sous forme de monomère en C-terminal du récepteur, *via* son domaine SH2, entraînant sa phosphorylation en tyrosine 705. Notre étude suggère qu'HSP110 interagit directement avec STAT3, favorisant ainsi sa phosphorylation *via* sa fonction chaperonne. (4) Par conséquent, STAT3 forme un homodimère et migre vers le noyau où il induit l'expression de ses gènes cibles, impliqués dans la prolifération, la survie cellulaire ainsi que l'angiogenèse ²⁶³. (**T₁₇ muté**) (3') En opposition, lorsqu'HSP110 n'est plus exprimée, la phosphorylation de STAT3 n'est plus facilitée, entraînant (4') une diminution de son homodimérisation et donc de sa translocation vers le noyau.

ORIGINAL ARTICLE

HSP110 promotes colorectal cancer growth through STAT3 activation

K Berthenet^{1,2,9}, A' dem Bokhari^{3,4,9}, A Lagrange^{3,4}, G Marcion^{1,2}, C Boudesco^{1,2}, S Causse^{1,2}, A De Thonel⁵, M Svrcek^{3,4}, AR Goloudina^{1,2}, S Dumont⁶, A Hammann^{1,2}, DS Biard⁷, ON Demidov^{1,2}, R Seigneure^{1,2}, A Duval^{3,4}, A Collura^{3,4,9}, G Jegu^{1,2,9} and C Garrido^{1,2,8,9}

Heat shock protein 110 (HSP110) is induced by different stresses and, through its anti-apoptotic and chaperoning properties, helps cells survive these adverse situations. In colon cancers, HSP110 is abnormally abundant. We have recently shown that colorectal cancer patients with microsatellite instability (MSI) had an improved response to chemotherapy because they harbor an HSP110-inactivating mutation (HSP110DE9). In this work, we used patient biopsies, human colorectal cancer cells grown *in vitro* and *in vivo* (xenografts), and intestinal crypts to demonstrate that HSP110 is also involved in colon cancer growth. We showed that HSP110 induces colon cancer cell proliferation and that this effect is associated with STAT3 activation, specifically an increase in STAT3 phosphorylation, nuclear translocation and transcription factor activity. STAT3 inhibition blocks the proliferative effect of HSP110. From a molecular standpoint, we demonstrated that HSP110 directly binds to STAT3, thereby facilitating its phosphorylation by JAK2. Finally, we showed a correlation between HSP110 expression and STAT3 phosphorylation in colon cancer patient samples. Thus, the expression of HSP110 in colon cancer contributes to STAT3-dependent tumor growth and the frequent inactivating mutation of this chaperone is probably an important event underlying the improved prognosis in colon cancer displaying MSI.

Oncogene (2017) 36, 2328–2336; doi:10.1038/onc.2016.403; published online 7 November 2016

INTRODUCTION

Cancer cells have a strong need for chaperones such as heat shock protein-110 (HSP110, also called HSP105 or HSPH1) because they have to rewire cell metabolism.^{1,2} HSP110 is a molecular chaperone with anti-aggregation properties and, through its interaction with HSP70, participates in the correct folding of newly synthesized or misfolded proteins.^{3–6} HSP110 can be induced by different stresses and helps the cell to survive these stressful situations, notably through its anti-apoptotic properties.

We have recently demonstrated that colorectal cancers displaying microsatellite instability (MSI) due to mismatch repair deficiency harbor a loss-of-function mutation in the HSP110 gene.^{4,7,8} As a result, and to the detriment of the wild-type HSP110 protein, they express a truncated form of HSP110 called HSP110DE9, which acts as an endogenous HSP110 inhibitor. HSP110DE9 acts as a dominant-negative mutant that binds to HSP110 (1:1), thereby inhibiting the chaperone effect in cancer cells. We have demonstrated in a multicenter study that the expression of this dominant-negative mutant is associated with an excellent response to chemotherapy (i.e., survival).⁷

The tumorigenic function of intracellular HSP110 can be explained not only by its cytoprotective properties (e.g. anti-apoptotic) but also through its function as a molecular chaperone for other proteins or RNAs.^{9,10} HSP110 has also been shown to affect the Wnt/ β -catenin pathway. It has recently been shown

that HSP110 is needed for Wnt-induced target gene transcription.¹¹

HSP110 has also been shown to be secreted into the extracellular medium and has immune properties. In inflammatory bowel diseases, HSP110 has been shown to be an abundant soluble luminal component of the gastrointestinal tract.¹² More recently, we have demonstrated that cancer cells secrete HSP110 to promote macrophage polarization towards a pro-cancer (inflammatory) phenotype.¹³ In contrast, inhibition of HSP110 promotes macrophage polarization towards a cytotoxic phenotype. This could explain why MSI colon cancers that express high amounts of HSP110DE9 and have a good prognosis are also associated with an abundance of cytotoxic immune cells.¹⁴

Given the recently reported physiological role of HSP110 in colonic mucosa,^{12,15} an important question that needs to be addressed is whether HSP110 also plays a role during colon cancer development. In this work, we explored the effects of the loss of HSP110 or the expression of the HSP110 inhibitor HSP110DE9 in colon cancer cell growth *in vitro*, *ex-vivo* in intestinal crypts and *in vivo*. We demonstrated that HSP110 promotes cell growth and that this effect involves the ability of HSP110 to induce the activation of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). We have also validated in microsatellite-unstable colorectal cancer patients expressing different amounts of the HSP110 inhibitor HSP110DE9 that HSP110 and P-STAT3 could act as a combined marker for a poor prognosis in these patients.

¹INSERM, UMR866, Université de Bourgogne Franche-Comté, Faculté des Sciences de Santé, Dijon, France; ²INSERM, LNC UMR866, Equipe Labellisée Ligue Nationale Contre le Cancer, Dijon, France; ³INSERM, UMR 938, Equipe Labellisée par la Ligue Nationale Contre le Cancer, Paris, France; ⁴Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Paris, France; ⁵CNRS, UMR7216 Epigenetics and Cell Fate, Paris, France; ⁶AP-HP, Hôpital St Antoine; Service d'Anatomie Pathologique, Paris, France; ⁷Centre d'Etude Atomique, Paris, France and ⁸CGFL, Dijon, France. Correspondence: Dr G Jegu or Dr C Garrido, INSERM, UMR866, Université de Bourgogne Franche-Comté, Faculté des Sciences de Santé, 7 Boulevard Jeanne d'Arc, Dijon 21079, France.

E-mail: gaetan.jegu@u-bourgogne.fr or cgarrido@u-bourgogne.fr

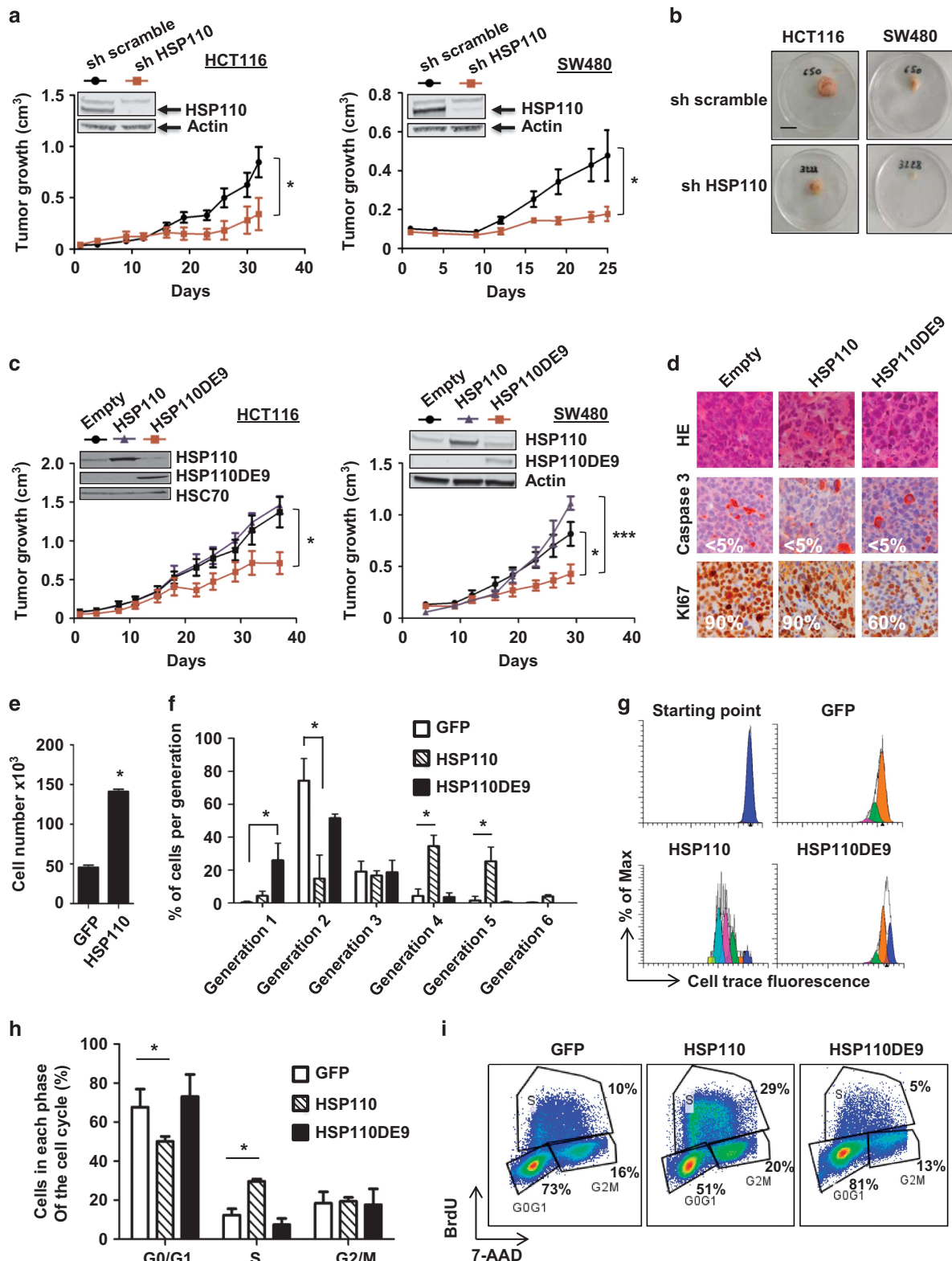
⁹These authors contributed equally to this work.

Received 24 March 2016; revised 9 September 2016; accepted 23 September 2016; published online 7 November 2016

RESULTS

HSP110 induces colon cancer cell proliferation *in vivo* and *in vitro*. Human SW480 (MSS) and HCT116 (MSI) colon cancer cell lines were depleted of HSP110 with specific shRNAs and injected into nude mice (Figure 1a and Supplementary Figure 1A). HSP110

silencing did not alter cell viability (Supplementary Figure 1B) and *in vivo* HSP110 depletion was observed throughout the xenograft experiment (Supplementary Figure 1C). We observed a marked decrease in tumor growth in the xenografts derived from both HCT116 and SW480 cells when HSP110 was depleted compared



with controls (scrambled shRNA) (Figures 1a and b). Similar results were obtained when we inactivated HSP110 through the expression of the dominant-negative mutant HSP110DE9. The over-expression of HSP110DE9 induced a decrease in the size of the xenografts comparable to that obtained with HSP110 shRNA (Figure 1c). Whereas tumor cell viability determined by active caspase 3 staining was similar in the xenografts inactivated or not for HSP110 (i.e. less than 5% caspase 3-positive cells; Figure 5d), a difference in the number of cells expressing the proliferation marker Ki67 was observed. Indeed, while in control or HSP110 expressing xenografts (at day 16) almost all cells were positive for Ki67 ($94\% \pm 4$, $n=3$), in the xenografts expressing the HSP110 inhibitor HSP110DE9 no more than 60% of Ki67-positive cells (54 ± 6 , $n=3$) were found (Figure 1d). This result prompted us to explore the effect of HSP110 on tumor cell proliferation. *In vitro*, expression of HSP110 increased the total number of cells (Figure 1e). This increase was a consequence of a higher cell cycle rate as shown by cell trace dilution (Figures 1f and g) and by the higher number of cells in the S-phase (Figures 1h and i). Accordingly, proliferation increase was limited by the expression of HSP110DE9 (Figures 1f–i).

The proliferative effect of HSP110 involves STAT3 activation. STAT3 is a well-described pathway involved in colon cancer cell proliferation.^{16,17} We determined the expression of 34 known target genes of the STAT3 pathway within a transcriptome analysis of SW480 cells overexpressing HSP110 compared with control-transfected cells (Supplementary Figure 2A). In this panel of 34 genes, we observed an increase in the expression of 26, suggesting the involvement of the STAT3 pathway. To study the implication of STAT3 in the proliferative effect of HSP110, we first used the specific STAT3 inhibitor AG490. As shown in Figure 2a, AG490, at doses that did not induce cell death (Supplementary Figure 2B), induced a dose-dependent reduction in the proportion of S-phase cells induced by HSP110 and in the ability of HSP110 to increase the expression of STAT3 downstream genes such as c-Myc and Cyclin D1 (Figure 2a). Furthermore, as shown in Figure 2b, HSP110 was able to induce STAT3 phosphorylation in a dose-dependent manner, though the amount of total STAT3 remained unchanged. This HSP110-induced activation of STAT3 was further demonstrated by showing its ability to induce both an increase in the amount of P-STAT3 in the nucleus (Figure 2c) and in the transcription of STAT3 target genes such as *MYC* or *MCL1* (Figure 2d).

To confirm the implication of HSP110 in STAT3 activation, in these HSP110-overexpressing cells where we observed STAT3 activation, we inhibited HSP110 by using increasing amounts of the dominant-negative mutant HSP110DE9. As shown in Figure 3a, HSP110DE9 inhibited HSP110-induced phosphorylation of STAT3. Similarly, HSP110DE9 inhibited HSP110-induced STAT3 transcriptional activity as demonstrated by inhibition of the

expression of the P-STAT3 target genes c-Myc, Mcl1 and Bcl_{XL} (Figure 3b).

Endogenous HSP110 levels determine a cell's proliferative and P-STAT3 status *in vivo* and *in vitro*

To study the proliferative effect of HSP110 and its relationship with STAT3 phosphorylation *in vivo* in a more physiological model, we selected two sub-clones of the MSI colon cancer cell line HCT116, which express either high or low levels of endogenous HSP110 (because they bear either a small or a large deletion in the T17 satellite sequence of HSP110⁷). These two clones have similar cell viability in the absence of an external insult.¹³ HSP110 levels in these clones correlated with the levels of P-STAT3 (Figure 4a) and with cell proliferation *in vitro* (Figure 4b). In addition, we also observed significantly lower cell growth in the xenografts derived from the HCT116 sub-clone with low HSP110 expression than in the sub-clone with high HSP110 expression (Figure 4c). We also found an association between STAT3 phosphorylation and endogenous HSP110 levels in these tumors (Figure 4d).

HSP110 affects STAT3 activation induced by IL-6 *in vitro* and *ex vivo* in intestinal crypts

IL-6 is the main inducer of the STAT3 pathway in colon cancer and promotes tumor growth.¹⁸ Although our enzyme-linked immunosorbent assay tests demonstrated that HSP110 did not affect the secretion of IL-6 (data not shown), HSP110 promoted STAT3 phosphorylation induced by IL-6, and, conversely, HSP110 inhibition by HSP110DE9 blocked STAT3 phosphorylation dose-dependently induced by IL-6 (Figure 4e and Supplementary Figure 2C). To further prove this effect, we isolated intestinal crypts from HSP110 knockout animals and induced *ex vivo* STAT3 phosphorylation by adding IL-6 to the explant cultures. While STAT3 phosphorylation was induced in the crypts isolated from the wild-type animals, no P-STAT3 was observed in those isolated from the HSP110 knockout animals (Figure 4f).

HSP110 directly binds to STAT3 and promotes its phosphorylation. Next, we determined whether HSP110 interacted with STAT3 in colon cancer cells. Both proteins co-localized *in vivo* (Supplementary Figure 3A) and associated with one another, as demonstrated by duolink assays (Figures 5a and b). This *in vivo* interaction was confirmed by co-immunoprecipitation experiments (Figure 5c). We further showed that both proteins directly interacted *in vitro* using purified proteins and a biolayer interferometry (BLI) approach (OctetRed96, Figure 5d). HSP110 interacted with STAT3 with a K_D of 17.2 ± 0.17 nM, which is very close to that of HSP110 interacting with HSP70 ($K_D = 18.8 \pm 0.37$ nM), used here as a positive control (Figure 5d and Supplementary Figure 3B). Interestingly, the binding between HSP110 and STAT3 was slightly favored by the presence of ATP

Figure 1. HSP110 induces colon cancer cell proliferation *in vivo* and *in vitro*. **(a)** Comparative analysis of tumor growth (mean tumor volumes) in xenografts derived from human colorectal cancer HCT116 and SW480 cells transfected either with an HSP110 shRNA or a scrambled shRNA. Upper panels, western blot showing shRNA-induced depletion of HSP110. Ten mice per group. A representative experiment is shown ($n=2$). $*P < 0.05$. **(b)** Images of representative excised tumor xenografts from mice shown in (A), scale = 10 mm. **(c)** Xenografts (mean tumor volumes) of HCT116 and SW480 cells either control transfected (empty vector) or transfected with HSP110 or HSP110DE9. Upper panels, western blot showing HSP110 and HSP110DE9 expression. HSC70 is used as a loading control. Ten mice per group, $n=2$. $*P < 0.05$; $***P < 0.001$. **(d)** Hematoxylin/eosin stain, and expression of caspase 3 and Ki67 by IHC in SW480 tumor xenografts at day 16 (a representative image from (c) xenografts is shown), scale bar 100 μ m. Positive-labeled cells were counted within 100 cells in 3 random areas. **(e)** Absolute cell number of SW480 cells determined 72 h after transfection with plasmids coding for control-GFP or HSP110-GFP ($n=3$), $*P < 0.05$. **(f)** Percentage of SW480 in each cell division 72 h after transfection with control-GFP, HSP110-GFP or HSP110DE9-GFP ($n=3$), $*P < 0.05$. Proliferation was assessed as dilution of CellTrace fluorescent dye by flow cytometry. **(g)** Representative cell proliferation histograms. **(h)** The percentage of SW480 cells in each phase of the cell cycle was determined 48 h after transfection with plasmids coding for control-GFP, HSP110-GFP or HSP110DE9-GFP ($n=3$), $*P < 0.05$. **(i)** Dot plots show one representative experiment as performed in (h).

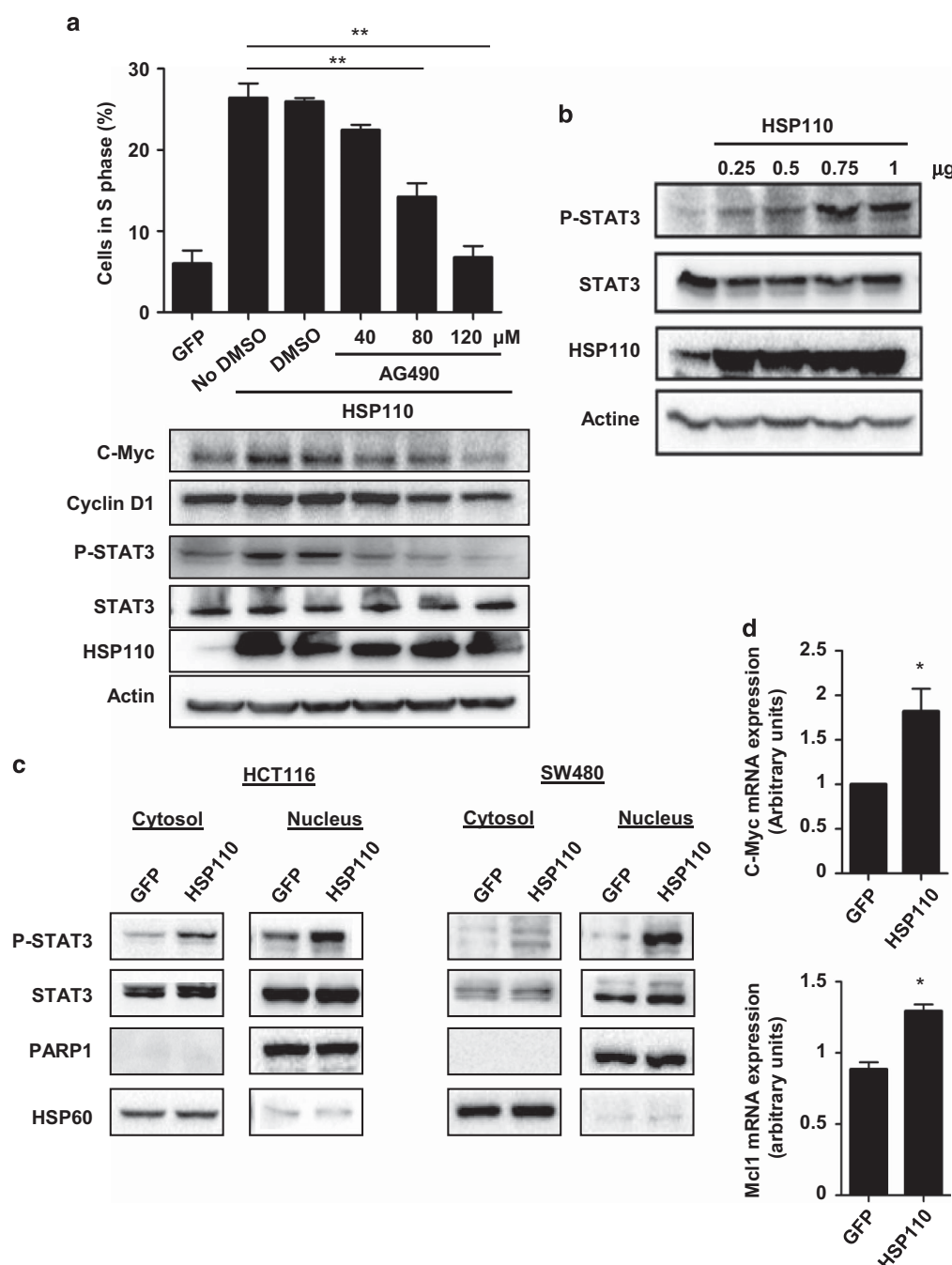


Figure 2. HSP110 effect on tumor growth involves STAT3 activation. **(a)** Percentage of GFP-positive SW480 cells in the S phase assessed by BrdU incorporation and 7-AAD staining, 48 h after transfection with plasmids coding for control-GFP or HSP110-GFP and treated for the preceding 24 h with or without increasing doses of AG490 (40, 80, 120 μ M). $^{**}P < 0.01$ ($n = 3$). Lower panel, immunoblot analysis of c-Myc, cyclin D1, P-STAT3, STAT3 and HSP110. One representative experiment is shown. Actin, loading control. **(b)** Expression of STAT3 and P-STAT3 in SW480 cells transfected with increasing concentrations of HSP110 was analyzed by immunoblot. Actin was used as a loading control ($n = 3$). **(c)** Immunoblot analysis of P-STAT3 content in the nucleus and cytosol of SW480 and HCT116 cells transfected with an empty vector (GFP) or GFP-HSP110. PARP1 (nuclear protein) and HSP60 (cytosolic protein) were used as controls for extract purity. **(d)** The expression of c-Myc and Mcl1 mRNA in HSP110-transfected cells was determined by qRT-PCR. Expression values were calculated relative to RPLP0 and GAPDH RNA. $^{*}P < 0.05$ ($n = 4$).

(adenosine triphosphate), but not ADP (adenosine diphosphate) (Figure 5d, lower panel).

A plausible hypothesis for a chaperone like HSP110 is that, through its association, it renders STAT3 phosphorylation sites more accessible to JAK2. We performed these STAT3 phosphorylation experiments *in vitro* with purified proteins. Our results clearly show that HSP110 facilitates STAT3 phosphorylation (Figure 5e).

Modulation of STAT3 activity is dependent on HSP110 in MSI primary colon cancers

We also assessed P-STAT3 expression in patients' biopsies of primary MSI colorectal tumors previously selected for their low or abundant expression of mutant HSP110DE9, which correlates inversely with the expression of HSP110.⁷ HSP110-low tumors were those with abundant HSP110DE9 (i.e. large deletions in the

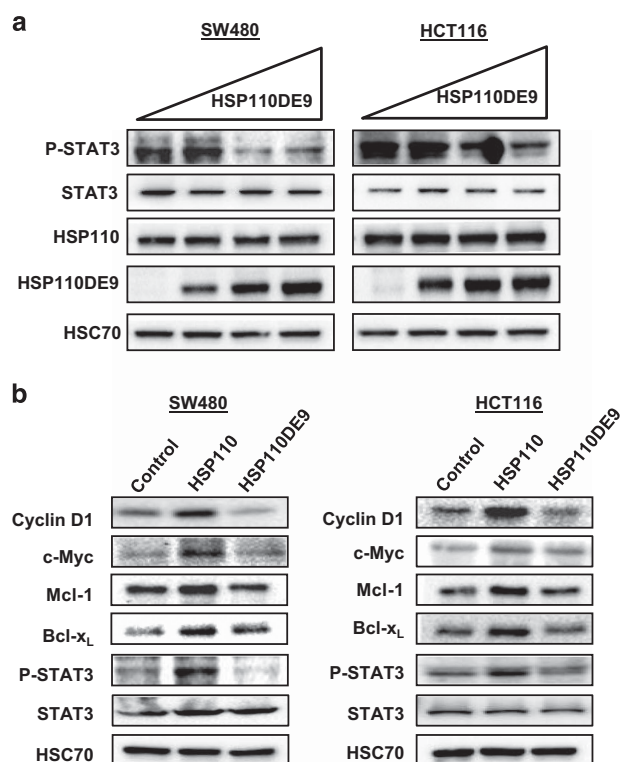


Figure 3. HSP110DE9 blocked HSP110-induced STAT3 phosphorylation. **(a)** Immunoblot analysis of P-STAT3, STAT3, HSP110 and HSP110DE9 in SW480 (left panel) and HCT116 (right panel) cells, 48 h after transfection with plasmids coding for HSP110-GFP and increasing concentrations of HSP110DE9-GFP. HSC70 served as a loading control. **(b)** Immunoblot analysis of cyclin D1, c-Myc, Mcl1, Bcl-xL, P-STAT3 and STAT3 in SW480 (left panel) and HCT116 (right panel) cells, 48 h after transfection by plasmids coding for control-GFP, HSP110-GFP or HSP110DE9-GFP. HSC70 served as a loading control. One experiment of the three performed is shown.

satellite T17 sequence of the HSP110 gene, which favors the alternative splicing process that results in HSP110DE9 expression); HSP110-high tumors were those with low expression of HSP110DE9 (i.e. small deletions in the T17 sequence of HSP110). We analyzed tumors from a cohort of 37 patients; 25 expressing HSP110 and 12 not or barely expressing HSP110. As shown in Figure 6a, most of the tumors positive for HSP110 were also positive for P-STAT3, whereas the majority of tumors negative for HSP110 were also negative for P-STAT3. The difference between these two groups of patients was significant ($P=0.03$, Fisher's exact test). Representative images of primary colon tumors displaying double-positive or double-negative immunostaining are shown in Figure 6b ($\times 100$ magnification).

DISCUSSION

Heat shock proteins are induced by different stresses including anti-cancer drugs. They help cells to survive such adverse situations through their cell-protective properties (anti-apoptotic, chaperone, etc.).¹⁹ Because cancer cells have a heightened need for chaperones for their survival compared with normal cells; there is a strong rationale for using HSP inhibitors as chemo-sensitizing agents in cancer therapy.¹

HSP110 is the only HSP for which a loss-of-function mutation has been found in cancer,⁴ and expression of this inactivating mutation has been associated with an excellent response to chemotherapy.⁷ The association of HSP110 with a poor prognosis

has been confirmed in other types of cancer, such as lymphomas.^{10,20} For example, in B-cell non-Hodgkin lymphomas, HSP110 depletion has been associated with the downregulation of the oncogenes *BCL6* and *c-MYC*.¹⁰ However, the role of HSP110 in colon cancer seems particularly relevant.³ Indeed, HSP110 may also be implicated in colon cancer development as it is abundantly expressed in intestinal epithelial cells and plays a functional role in regulating mucosal homeostasis. Furthermore, HSP110 knockout animals are prone to the development of inflammatory bowel disorders.¹⁵

In this work, we have demonstrated that HSP110 plays a functional role in colon cancer cell proliferation *in vitro* and *in vivo* through IL-6-STAT3 pathway activation. STAT3 must be tightly regulated and different chaperones contribute to this. In the case of HSP90 and the HSP70 super-chaperone complex, the effect is through the regulation of STAT3 stability by controlling its proteasomal degradation.^{21,22} This does not seem to be the case for HSP110 since, as we showed here, STAT3 levels do not change with HSP110 expression (only the phosphorylation status of the transcription factor). Indeed, HSP110 binds to STAT3, thus facilitating its phosphorylation by JAK2 and its translocation to the nucleus, and thereby promoting STAT3 transcription factor activity. Because STAT3 has numerous target genes that play crucial roles in cell proliferation and survival, metastasis and/or angiogenesis, the question remains as to whether HSP110 could also play a role in facilitating transcription factor binding to particular genes.

In HeLa cells, transfection-induced overexpression of HSP110 increases the amount of phosphorylated STAT3.²³ This suggests that modulation of STAT3 activity by HSP110 is not just restricted to intestinal cells.

HSP110 has also been reported to play a role in the Wnt/ β -catenin pathway by inhibiting the hyper-phosphorylation and degradation of β -catenin.¹¹ Although we did not find that β -catenin was affected by either the expression or the depletion of HSP110 in our colon cancer cells (data not shown), this effect may contribute to the overall tumorigenic effect of HSP110.

Interestingly, it has recently been reported that STAT3 is able to induce the transcription of HSP110 in intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases. In this context, HSP110 expression is seen as a protective mechanism induced by epithelial cells in CD1d-mediated inflammation (CD1d presents self and microbial antigens to NK T-cells).¹⁵ Therefore, a feedback amplification loop might exist in cancer cells where HSP110 induces STAT3 activation, which in turn promotes HSP110 expression by inducing its transcription.

STAT3 is a transcription factor that is constitutively activated in a variety of human cancers including colorectal cancer, where it was associated with adverse clinical outcomes.^{16–18} Because accumulating evidence implicates STAT3 as a promising target for cancer therapy, a better understanding of its activation mechanism in human cancer is needed.

HSP110 is also a cancer target. We and others have previously demonstrated that HSP110 was abundantly expressed in colon rectal cancer and associated with a poor prognosis (response to Folfex⁷). Here we showed that HSP110 not only increased resistance to apoptosis induced by the chemotherapy⁴ but was also able to promote the proliferation of cancer cells by facilitating the activation (phosphorylation) of STAT3, which it is known to induce the upregulation of cell proliferation and pro-survival genes. In summary, STAT3 may be implicated in the overall tumorigenic role of HSP110. The association of these two markers of a poor prognosis (HSP110/P-STAT3) in colon cancer deserves to be evaluated. To this end, we have just started a multicenter study including more than 3000 colorectal cancer biopsies.

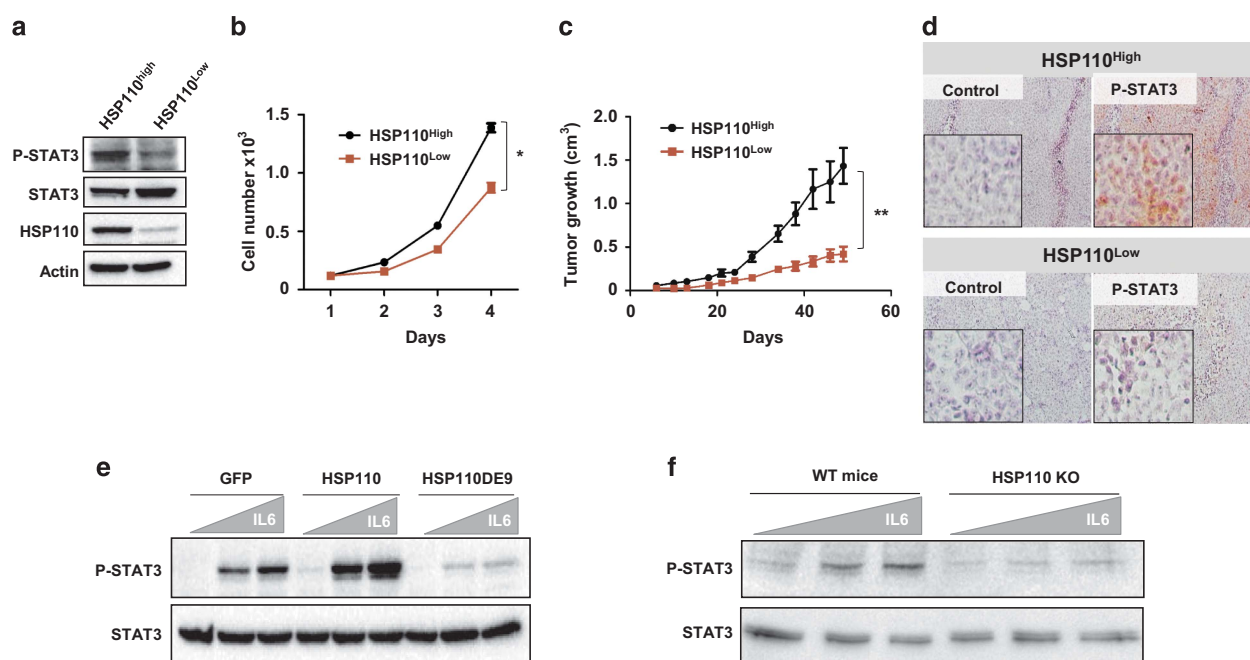


Figure 4. Endogenous HSP110 levels determine the cells' proliferative and P-STAT3 status, *in vivo*, *in vitro* and *ex vivo* in intestinal crypts. **(a)** Immunoblot of P-STAT3 and STAT3 expression in two HCT116 sub-clones selected by their either high or low expression of HSP110 (because they bear either a small or a large T17 deletion as previously described⁷). **(b)** *In vitro* cell growth of the HCT116 sub-clones. * $P < 0.05$. **(c)** Comparative analysis of tumor growth (mean tumor volumes) in xenografts derived from the HCT116 HSP110-high and HSP110-low sub-clones. ** $P < 0.01$. **(d)** Representative images of HCT116 sub-clone xenograft sections stained with P-STAT3 antibody by immunohistochemistry ($n = 5$). P-STAT3 expression was positive in the clone with high HSP110 whereas no expression of P-STAT3 was observed in the clone with low HSP110. Magnification $\times 100$. **(e)** Immunoblot analysis of P-STAT3 and STAT3 in SW480 cells transfected with plasmids coding for control-GFP, HSP110-GFP or HSP110 Δ E9-GFP (as in Figure 1c) and treated for 30 min with or without IL-6 (10 or 100 ng/ml). **(f)** Immunoblot analysis of P-STAT3 in mouse colon crypt biopsies isolated from wild-type or HSP110KO mice, and treated *ex vivo* for 30 min with or without two concentrations of IL-6 (10 or 100 ng/ml). STAT3 served here as a loading control. One representative experiment is shown (4 mice per group).

MATERIALS AND METHODS

Primary colon tumor samples and CRC cell lines

CRC cell lines were purchased from the American Type Culture Collection. All of the cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium as described. All cell lines were mycoplasma free. Primary tumors and normal colon tissues were obtained from patients undergoing surgery in Hôpital Saint-Antoine after informed consent and approval by the institutional review boards/ethics committees of Hôpital Saint-Antoine, Paris, France. MSI status was determined as described previously.⁷

Transfection with shRNAs and xenografts

pEBVsiRNA vectors were cloned and silenced cells were established as described previously.²³ We used the DSIr program to design shRNA sequences to target the *HSP110* gene. RNAi sequences targeting the HSP110 (NM_006644) mRNA stretched across nucleotides 179–197 (pBD3226), 292–310 (pBD3227) and 406–424 (pBD3228). We used cells carrying the pBD650 plasmid that expressed an inefficient shRNA sequence as a control.

We introduced the specific shHSP110 sequences into hygromycin-resistant pEBV plasmids. Cells were plated 24 h before transfection with JetPrime (Ozyme, Montigny-le Bretonneux, France) according to the manufacturer's recommendations. Twenty-four hours later, the cells were trypsinized and seeded in culture medium supplemented with hygromycin (125 μ g/ml for HCT116 cell line or 250 μ g/ml for SW480). After several days, 10⁷ HCT116 and SW480 cells transfected with shRNA were injected subcutaneously into the flank of female nude mice (Charles River Laboratories, Wilmington, USA) at 8 weeks of age. Tumor size was measured with a caliper every 2 days over 29 (SW480 cell line), 38 (HCT116 cell line) or 21 days (HCT116 sub-clone xenografts). Mice were killed when the tumors reached 800 mm³. The mice were treated according to the guidelines of the Ministère de la Recherche et de la Technologie, France. Statistical methods to predetermine sample size in mice experiments were

not used and the experiments were not randomized. During experiments and outcome analysis, the animal group allocations were not blinded.

Transient cell transfection and treatments

Either 1.2×10^5 SW480 cells or 2.5×10^5 HCT116 cells were cultured in a 12-well plate for 24 h. Then, the cells were transfected with 1 μ g of plasmid coding for GFP, GFP-HSP110 or GFP-HSP110 Δ E9 using the HP Xtreme gene DNA transfection reagent (Roche, Boulogne-Billancourt, France) according to the manufacturer's instructions. In some experiments, cells were treated with the Janus kinase 2 protein inhibitor AG490 (Millipore, Molsheim, France) 24 h after transfection for 24 h. To induce STAT3 activation, human cell lines or mouse colon crypts were treated with human (Life Technologies, Saint-Aubin, France) or mouse (Miltenyi, Paris, France) IL-6 (10 or 100 ng/ml⁻¹), respectively.

Analysis of cell survival, cell cycle and cell proliferation

For apoptosis experiments, cells were harvested and stained with Annexin V-FITC and 7-AAD (BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA) according to the manufacturer's recommendations. The cell cycle was analyzed using the APC-BrdU Flow kit from BD Pharmingen. Briefly, cells were incubated with BrdU (10 μ M for 60 min), washed in phosphate-buffered saline, fixed with BD cytofix/cytoperm solution (15 min, RT) and permeabilized with Cytoperm/Permeabilization (10 min). After washing and 5 min of incubation with BD Cytofix/Cytoperm, cells were incubated for 1 h at 37 °C with DNase (300 μ g/ml⁻¹). Cells were then washed and incubated with APC-labeled anti-BrdU antibody (20 min; RT). 7-AAD was used to stain total DNA and the cell cycle was analyzed using an LSRII flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA). Proliferation was determined by staining 10⁵ SW480 cells with the Cell Trace Violet (Invitrogen, Carlsbad, USA), according to the manufacturer's procedure. Divisions were detected over 3 days by flow cytometry with an LSRII cytometer and each generation of cells was analyzed using ModFit software.

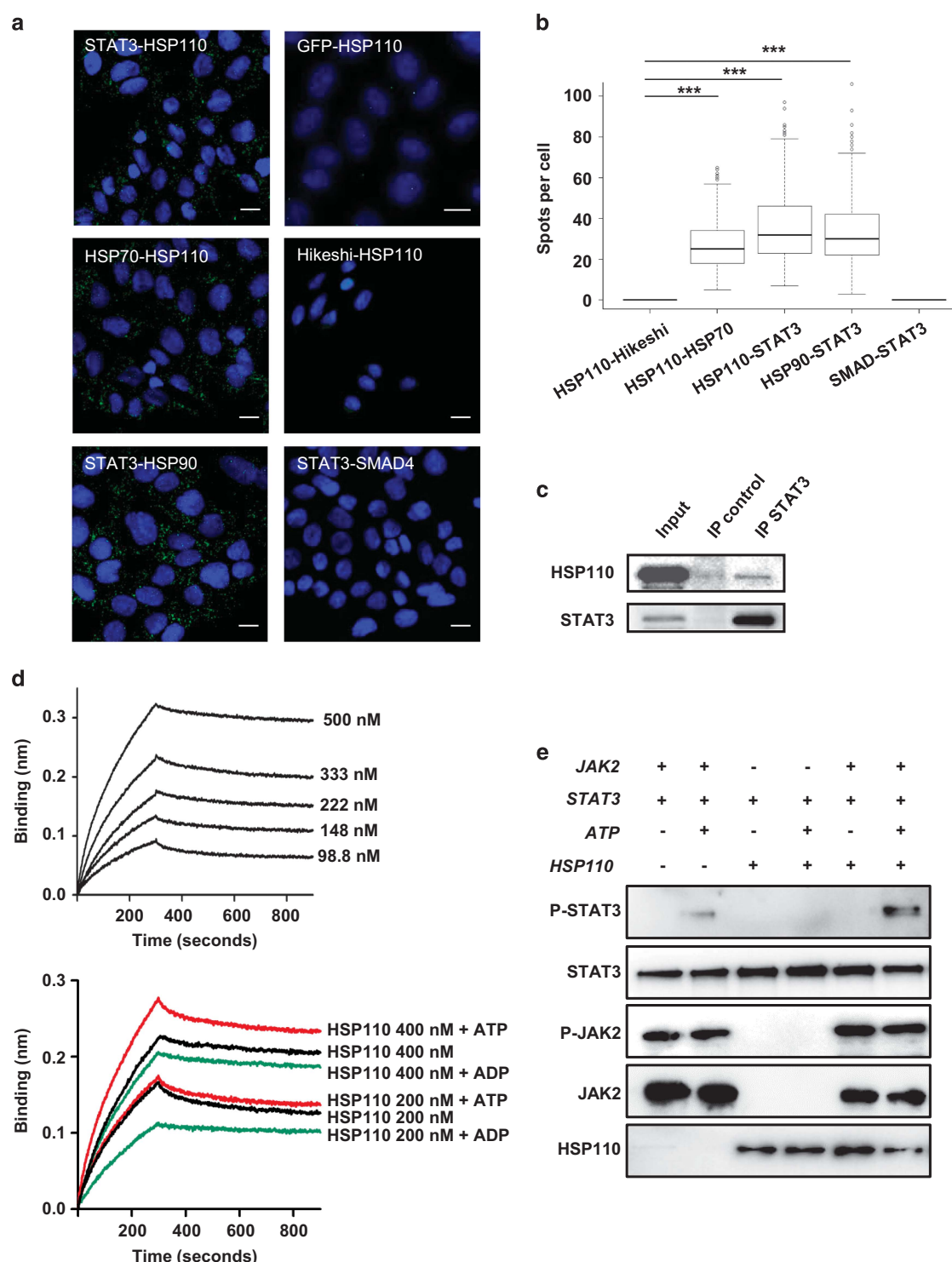


Figure 5. HSP110 interacts with STAT3 and favors its phosphorylation. **(a)** *In vivo* interaction of HSP110 with STAT3 was determined in SW480 by Duolink technology. HSP70 was used here as a positive control of HSP110 interaction, whereas Hikeshi and GFP were used as negative controls. HSP90 was used here as a positive control of STAT3 interaction whereas SMAD4 was used as a negative control. Scale bars: 20 μ m. **(b)** Quantitation of HSP110-Hikeshi, HSP110-HSP70, HSP110-STAT3, HSP90-STAT3, SMAD4-STAT3 spots per cells determined by Duolink technology as in **(b)**. *** $P < 0.001$. **(c)** Immunoprecipitation (IP) of STAT3 in SW480 cells followed by western blot using an anti-STAT3 (IP STAT3) or a non-relevant (IP control) antibody. **(d)** Analysis of the interaction between purified HSP110 and STAT3 by BLI: (upper panel) STAT3 immobilized on the biosensor was dipped into wells containing increasing HSP110 concentrations (from 98.8 to 500 nM). A K_D value of $17.2 \text{ nM} \pm 0.17 \text{ nM}$ (χ^2 : 0.365 and R^2 : 0.991) was obtained with a 1:1 model; (lower panel) when indicated ATP (2 mM) or ADP (2 mM) was added. **(e)** Immunoblot analysis of P-STAT3, STAT3, P-JAK2, JAK2 and HSP110 after *in vitro* kinase assay performed in the presence of recombinant STAT3 as a substrate (100 ng) with or without recombinant JAK2 (50 ng), ATP (250 μ M), or recombinant HSP110 (100 ng) ($n = 3$).

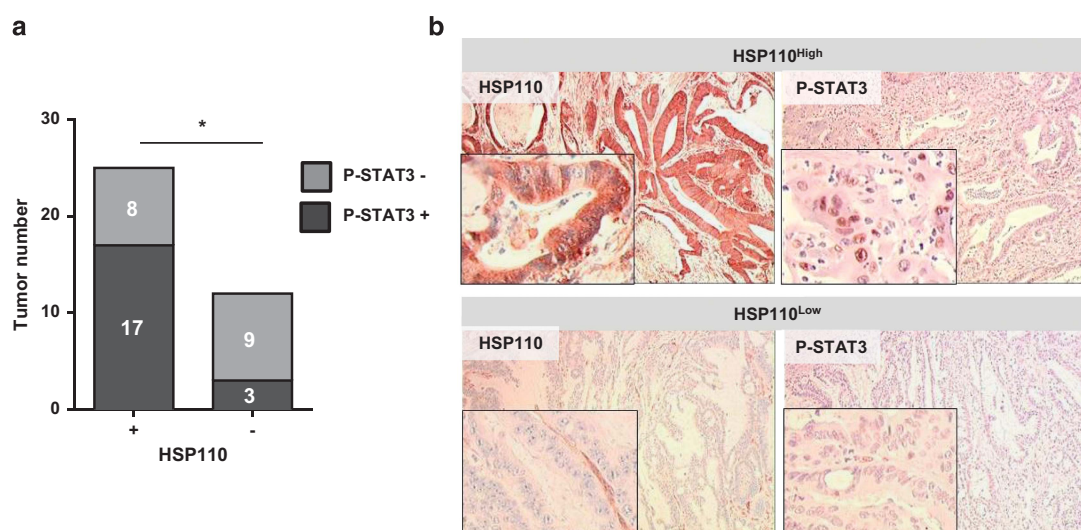


Figure 6. HSP110 associates with P-STAT3 in human biopsies of MSI colorectal cancer patients. **(a)** Schematic representation of HSP110 and P-STAT3 immunostaining in the cohort of patients analyzed. Significant associations were observed for the expression of HSP110 and P-STAT3 ($*P=0.03$, Fisher's exact test). **(b)** Representative images of primary colon tumors displaying double positive or double negative immunostaining are shown ($\times 100$ magnification). The inserts correspond to a detail of the immunostaining ($\times 200$ magnification).

Immunoblot analysis and immunoprecipitation

Cells were washed in PBS and lysed on ice in lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 6.8, 10 mM NaF, 1 mM DTT, and 1% Triton X-100) in the presence of protease (Roche, Boulogne-Billancourt, France) and phosphatase (Sigma-Aldrich, Lyon, France) inhibitors. Proteins were separated by PAGE and transferred following standard protocols before analysis with a chemiluminescence detection kit (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). Concerning the primary antibodies used, Bcl-xL (2764S), c-Myc (9605S), Cyclin D1 (2926S), P-STAT3 (9145S) and STAT3 (9139S) were from Cell Signaling (Danvers, USA); Mcl-1 (sc-819), HSC70 (sc-7298), HSP110 (sc-6241), and GFP (sc-8334) from Santa Cruz Biotechnologies; HSP110 (ab109624) from Abcam (Cambridge, UK); and actin (A1978-200UL) from Sigma (Lyon, France). Cytoplasmic and nuclear extracts were obtained using the 'NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction reagents' kit (Thermo Scientific, Waltham, USA). Immunoprecipitation was completed as previously described²⁴ using an anti-STAT3 (9139S) antibody (Cell Signaling, Danvers, USA).

Immunohistochemistry

Human and mouse xenograft sections of 4 μ m from paraffin-embedded tissue samples were cut onto silane-treated Super Frost slides (CML, Nemours, France) and left to dry at 37 °C overnight. Tumor sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in ethanol. Before immunostaining, antigen retrieval was performed by immersing sections in citrate buffer (pH 6.0) (HSP110), pH 9.0 (caspase 3) or in pH 8.0 EDTA buffer (P-STAT3) (15 min 95 °C), washed twice in PBS for 3 min and treated with 3% H₂O₂-PBS for 15 min in order to inhibit endogenous peroxidases. After being washed in PBS, slides were saturated for 25 min in 3% BSA PBS. Sections were then incubated for 1 h at room temperature with active caspase 3 (dilution 1/150, clone ab52293, Abcam) or Ki67 antibodies (dilution 1/300, clone A21-Y, ThermoFisher) or P-STAT3 antibody (dilution 1/70, clone D3A7, Ozyme). After washing in PBS, secondary antibody (8114 P, Cell signaling, Danvers, USA) was added for 30 min at room temperature. Slides were washed twice for 5 min in PBS and revealed using the Novared kit (Vector, Burlingame, USA). Slides were washed twice in water for 5 min and counterstained with 10% Meyer's hematoxylin. After one wash in water, slides were dehydrated in 100% ethanol and xylene and observed in a blinded manner using the Cell Observer station (Zeiss, Germany).

Immunofluorescence staining

Staining was performed as previously described.²⁵ After fixation and permeabilization, cells were incubated overnight at 4 °C with anti-HSP110 (sc-6241) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) and anti-STAT3

(9139S) (Cell Signaling, Danvers, USA) primary antibodies before incubation with secondary antibodies (488 or Alexa 568, Life Technologies, Saint-Aubin, France).

Duolink assay

Slides were stained with the antibodies: HSP110 (ab109624, Abcam), STAT3 (9139S, Cell Signaling), Hikeshi (14808-1-AP, Proteintech Rosemont, IL, USA), HSP70 (ADI-SPA-810, Enzo Life Sciences), HSP90 (PA3-013, Thermo Fisher), SMAD4 (SC-7154, SC-9996, Santa Cruz Biotechnology) or GFP (Ab1218, Abcam) and then incubated with proximity ligation assay probes (Sigma-Aldrich, Lyon, France) for 1 h at 37 °C. After the washes and incubation with the ligase solution for 30 min at 37 °C, the slides were washed again and incubated with the amplification polymerase solution for 100 min at 37 °C. Nuclei were labeled with DAPI (Sigma-Aldrich). Images were acquired using the Cell Observer station (Zeiss). proximity ligation assay images were analyzed using ICY software. Cells were segmented by the user and proximity ligation assay spots were counted using the spot detector plugin. Statistical analysis was then carried out on R software. A Wilcoxon signed rank test with continuity was used to determine whether samples had a number of spots greater than 0.

Biolayer interferometry

Protein-protein interactions were characterized by BLI on an OctetRED instrument. STAT3 was biotinylated (1:3 ratio) according to the manufacturer's instructions (biotin-PEG4-NHS from Pierce EZ kit). The streptavidin-coated biosensor was dipped into wells containing biotinylated STAT3. For the HSP110/STAT3 interaction: after washing, the functionalized biosensor was dipped into wells containing different concentrations of HSP110 (association phase) in the presence or absence of 2 mM ATP or ADP. For the dissociation phase, the biosensor was dipped into wells containing Tris-buffered saline with or without either 2 mM ATP or ADP. Each KD was determined with a 1:1 stoichiometry model using a global fit with Rmax unlinked by sensor (FortéBio, Data Analysis Software Version 7.1.0.38).

In vitro kinase assay

Recombinant HSP110 (100 ng, OriGene Technologies, Rockville, MD, USA) was added to the kinase reaction buffer in the presence or absence of 50 ng of active JAK2 recombinant kinase (Millipore, Molsheim, France), or 100 ng of recombinant STAT3 (Sigma Aldrich), with or without 250 μ M of ATP (Cell Signaling). After incubation for 30 min at 30 °C, Laemmli's buffer was added to stop the reaction. The STAT3 phosphorylation was then determined by immunoblot analysis as described previously.

Quantitative real-time PCR

Total RNA was isolated with Trizol (Invitrogen) and reverse transcribed with Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) and random hexamers (Promega). C-Myc (qHsaCID0012921) and McI1 (qHsaCED0036603) primers for real-time PCR were purchased from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). The HSP110 primers used were described earlier.⁷ Expression values of transcripts were calculated relative to RPLP0 and GAPDH RNA.

Statistical analysis

Quantitative results are expressed as means $\pm$ s.d. from at least three independent experiments. *In vivo* tumor growth was assessed in 10 mice per group, and reproduced twice. Quantitative data were compared using Student's *t* test. Differences between groups of patients were determined by Fisher's exact test. Graphics were analyzed using the GraphPad Prism program.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Institut National du Cancer, Agence Nationale de la Recherche, Ligue Nationale Contre le Cancer ('Labeled teams' to CG and AD), the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), the Conseil Regional de Bourgogne, the program 'Investissements d'Avenir' ANR-11-LABX-0021-01-LipSTIC LabEx. We thank the FEDER for their support. KB and SC have a doctoral fellowship from La Ligue Nationale Contre le Cancer and KB from La Fondation pour la Recherche Médicale. We thank Prof. Dr Ibrahim M. Adham, Institut für Humangenetik, University of Göttingen for kindly providing the HSP110 KO mice and P Bastable (CHU, Dijon) for the English correction of the manuscript.

REFERENCES

- Jego G, Hazoume A, Seigneuric R, Garrido C. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett* 2013; **332**: 275–285.
- Saibil H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; **14**: 630–642.
- Slaby O, Sobkova K, Svoboda M, Garajova I, Fabian P, Hrstka R *et al*. Significant overexpression of Hsp110 gene during colorectal cancer progression. *Oncol Rep* 2009; **21**: 1235–1241.
- Dorard C, de Thonel A, Collura A, Marisa L, Svrcek M, Lagrange A *et al*. Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. *Nat Med* 2011; **17**: 1283–1289.
- Mattoo RU, Sharma SK, Priya S, Finka A, Goloubinoff P. Hsp110 is a bonafide chaperone using ATP to unfold stable misfolded polypeptides and reciprocally collaborate with Hsp70 to solubilize protein aggregates. *J Biol Chem* 2013; **288**: 21399–21411.
- Shaner L, Morano KA. All in the family: atypical Hsp70 chaperones are conserved modulators of Hsp70 activity. *Cell Stress Chaperones* 2007; **12**: 1–8.
- Collura A, Lagrange A, Svrcek M, Marisa L, Buhard O, Guilloux A *et al*. Patients with colorectal tumors with microsatellite instability and large deletions in HSP110 T17

- have improved response to 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Gastroenterology* 2014; **146**: 401–411 e401.
- Duval A, Collura A, Berthenet K, Lagrange A, Garrido C. Microsatellite instability in colorectal cancer: time to stop hiding! *Oncotarget* 2011; **2**: 826–827.
- Henics T, Nagy E, Oh HJ, Csermely P, von Gabain A, Subjeck JR. Mammalian Hsp70 and Hsp110 proteins bind to RNA motifs involved in mRNA stability. *J Biol Chem* 1999; **274**: 17318–17324.
- Zappasodi R, Ruggiero G, Guarnotta C, Tortoreto M, Tringali C, Cavane A *et al*. HSPH1 inhibition downregulates Bcl-6 and c-Myc and hampers the growth of human aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2015; **125**: 1768–1771.
- Yu N, Kakunda M, Pham V, Lill JR, Du P, Wongchenko M *et al*. HSP105 recruits protein phosphatase 2 A to dephosphorylate beta-catenin. *Mol Cell Biol* 2015; **35**: 1390–1400.
- Colgan SP, Pitman RS, Nagaishi T, Mizoguchi A, Mizoguchi E, Mayer LF *et al*. Intestinal heat shock protein 110 regulates expression of CD1d on intestinal epithelial cells. *J Clin Invest* 2003; **112**: 745–754.
- Berthenet K, Boudesco C, Collura A, Svrcek M, Richaud S, Hammann A Extracellular HSP110 skews macrophage polarization in colorectal cancer. *Oncoimmunology* (in press).
- Boissiere-Michot F, Lazennec G, Frugier H, Jarlier M, Roca L, Duffour J *et al*. Characterization of an adaptive immune response in microsatellite-Instable colorectal cancer. *Oncoimmunology* 2014; **3**: e29256.
- Olzak T, Neves JF, Dowds CM, Baker K, Glickman J, Davidson NO *et al*. Protective mucosal immunity mediated by epithelial CD1d and IL-10. *Nature* 2014; **509**: 497–502.
- Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S *et al*. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* 2009; **15**: 103–113.
- Bollrath J, Pheesse TJ, von Burstin VA, Putoczki T, Bennecke M, Bateman T *et al*. gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell* 2009; **15**: 91–102.
- Waldner MJ, Foersch S, Neurath MF. Interleukin-6—a key regulator of colorectal cancer development. *Int J Biol Sci* 2012; **8**: 1248–1253.
- Lanneau D, Brunet M, Frisan E, Solary E, Fontenay M, Garrido C. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J Cell Mol Med* 2008; **12**: 743–761.
- Zappasodi R, Bongarzone I, Ghedini GC, Castagnoli L, Cabras AD, Messina A *et al*. Serological identification of HSP105 as a novel non-Hodgkin lymphoma therapeutic target. *Blood* 2011; **118**: 4421–4430.
- Prinsloo E, Kramer AH, Edkins AL, Blatch GL. STAT3 interacts directly with Hsp90. *IUBMB Life* 2012; **64**: 266–273.
- Sato N, Yamamoto T, Sekine Y, Yumioka T, Junicho A, Fuse H *et al*. Involvement of heat-shock protein 90 in the interleukin-6-mediated signaling pathway through STAT3. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **300**: 847–852.
- Yamagishi N, Fujii H, Saito Y, Hatayama T. Hsp105beta upregulates hsp70 gene expression through signal transducer and activator of transcription-3. *FEBS J* 2009; **276**: 5870–5880.
- Biard DS, Despras E, Sarasin A, Angulo JF. Development of new EBV-based vectors for stable expression of small interfering RNA to mimic human syndromes: application to NER gene silencing. *Mol Cancer Res* 2005; **3**: 519–529.
- Jego G, Lanneau D, De Thonel A, Berthenet K, Hazoume A, Droin N *et al*. Dual regulation of SPI1/PU.1 transcription factor by heat shock factor 1 (HSF1) during macrophage differentiation of monocytes. *Leukemia* 2014; **28**: 1676–1686.

Supplementary Information accompanies this paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)

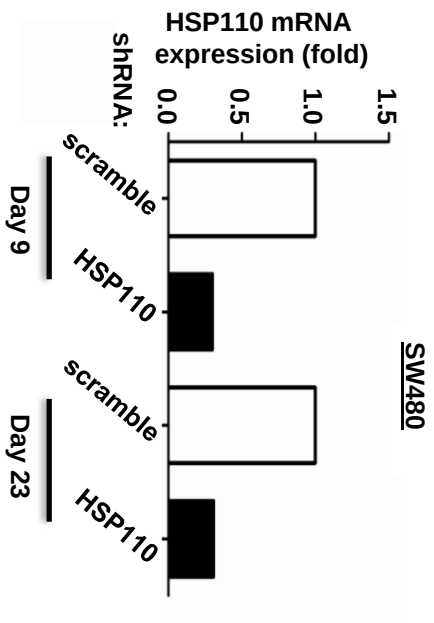
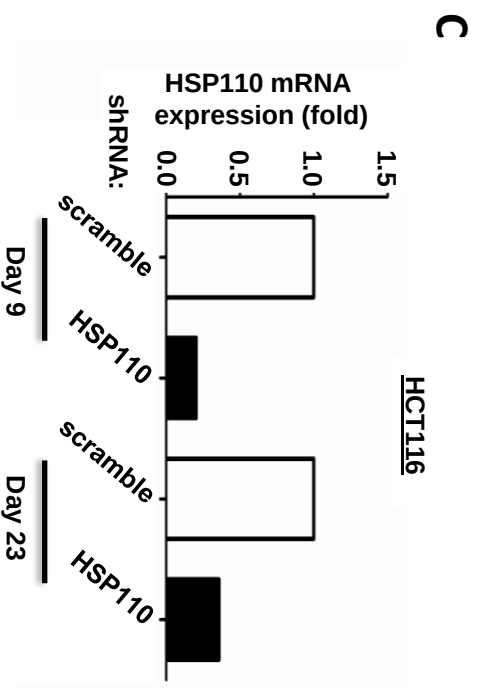
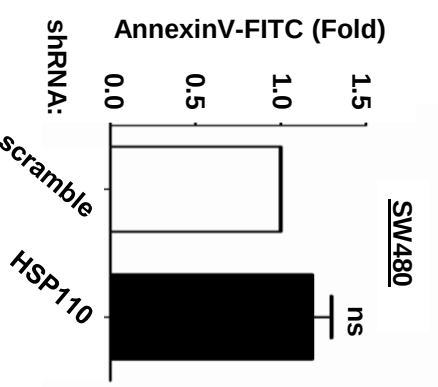
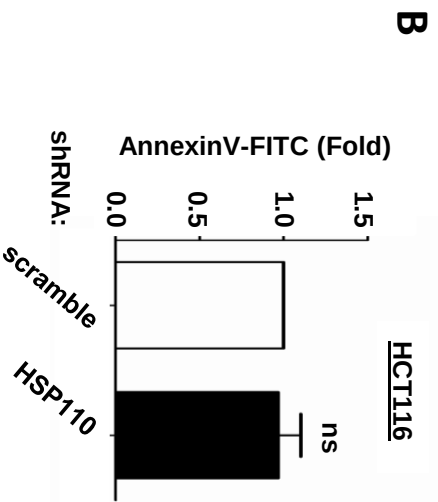
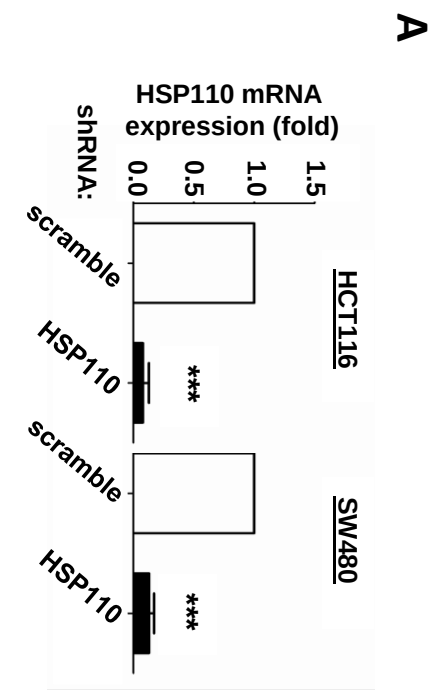


Figure S1

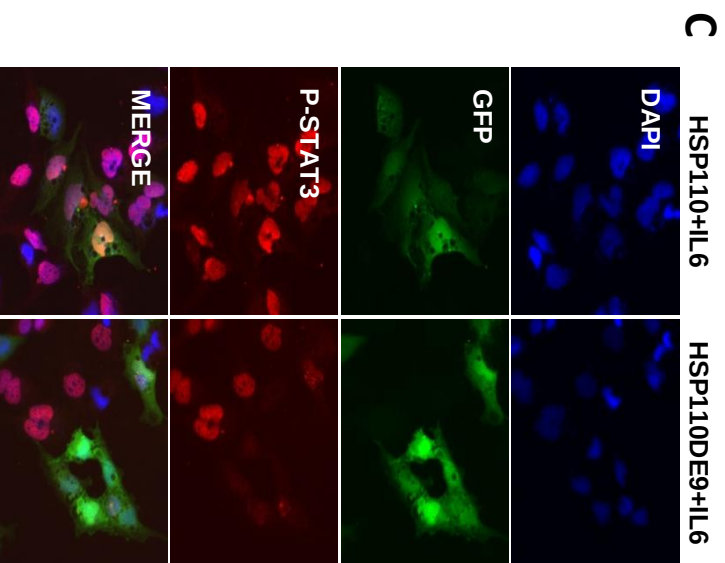
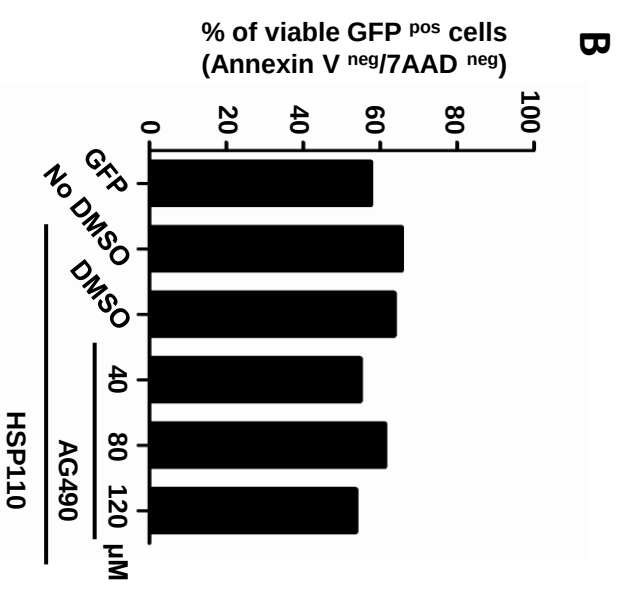
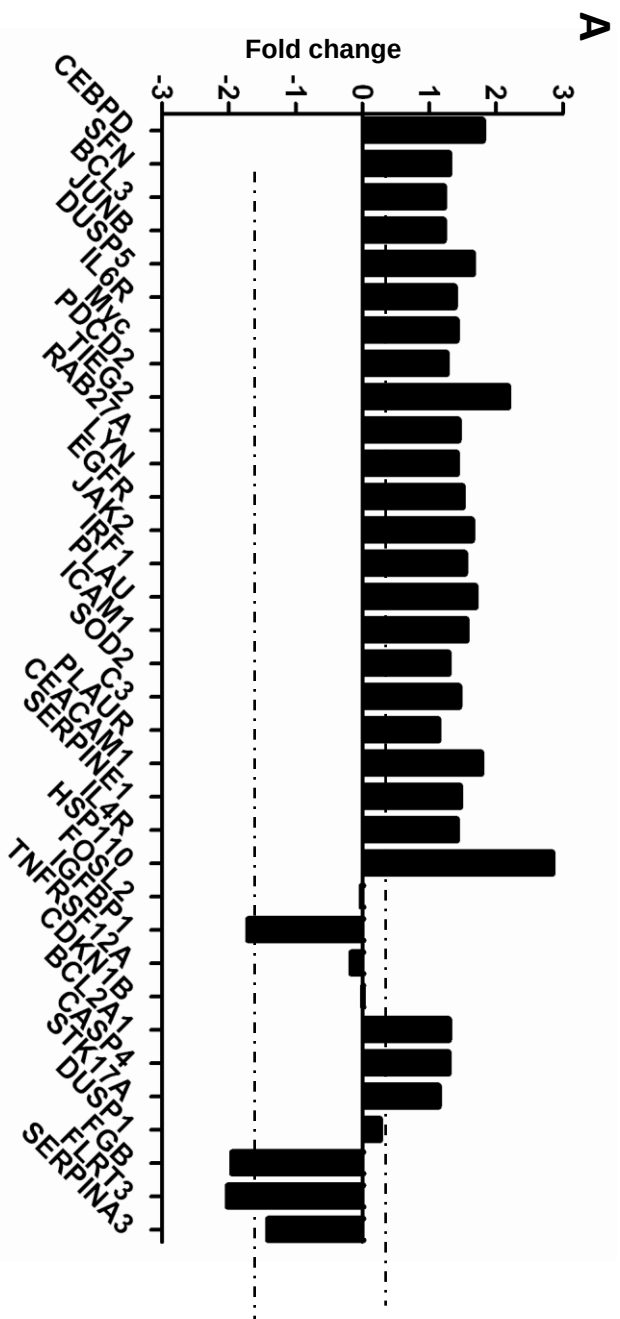
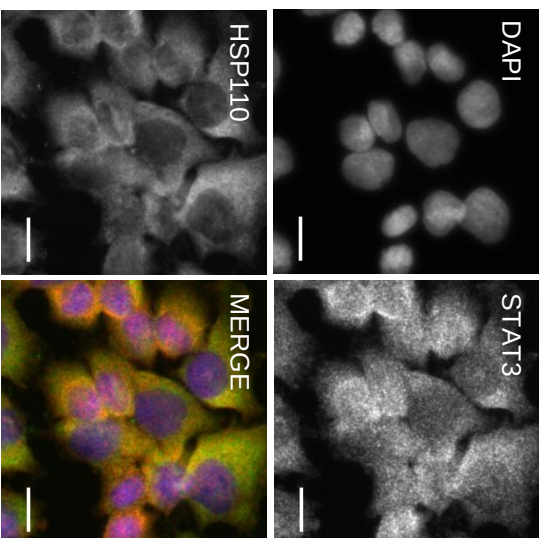
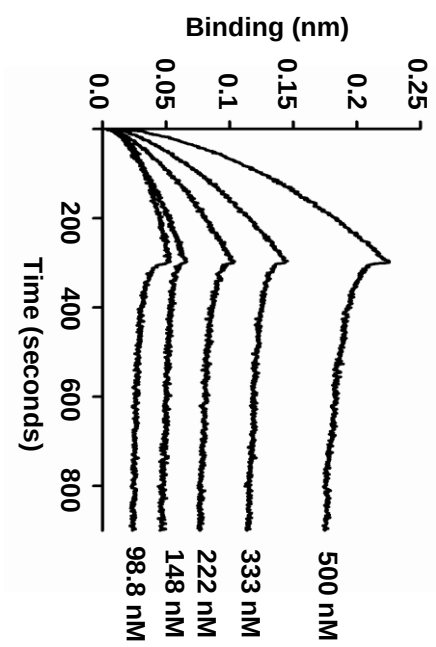


Figure S2

A**B****Figure S3**

SUPPLEMENTARY FIGURES LEGENDS

Supp Figure 1: (A) Expression of HSP110 mRNA determined by qRT-PCR in HCT116 and SW480 transfected with either an HSP110 shRNA or a scrambled, before their injection into mice. *** $p < 0.001$. **(B)** Fold increase of Annexin-V staining in HCT116 and SW480 transfected with either an HSP110 shRNA or a scrambled shRNA, before their injection into mice (ns=not significant). **(C)** Expression of HSP110 mRNA by qRT-PCR in xenografts, 9 and 23 days after cells injection.

Supp Figure 2: Microarray analysis showing modification in the expression of STAT3 target genes in SW480 cells, 48h after transfection with a plasmid coding for HSP110 compared with the empty plasmid. Mean of 2 experiments. **(B)** Percentage of Annexin-V^{neg}/7AAD^{neg} SW480 cells treated by increasing doses of AG480 as in figure 2A. **(C)** Representative microscopy analysis of HSP110 (green) and P-STAT3 (red) in SW480 cells, 48h after transfection with HSP110-GFP or HSP110ΔE9-GFP in the presence of IL-6 (10ng/ml). Scale Bars 20 μ m. Magnification x40.

Supp Figure 3: (A) Representative microscopy analysis of HSP110 (green) and STAT3 (red) in SW480 cells, Scale Bars 20 nm, Magnification x40. **(B)** HSP110 and HSP70 interactions were analyzed with Bio-Layer Interferometry. Immobilized HSP70 was dipped into wells containing increasing concentrations of HSP110 (from 98.8 to 500 nM). A K_D value of $18.8 \text{ nM} \pm 0.37 \text{ nM}$ (X^2 : 0.215 and R^2 : 0.984) was obtained with a 1:1 model.

ARTICLE 2

“Mutation of HSP110 in gastric cancer with microsatellite instability is deleterious for cancer cells and improves disease prognosis”

P. Cervera, A. Lagrange*, A. Bokhari*, et al., soumis pour publication au journal Gastroenterology (*co-premier auteurs)*

Résumé n°2

Dans ce travail soumis pour publication, l'impact de la mutation du microsatellite T₁₇ a été étudié dans les cancers gastriques MSI. A l'instar des CCR, nous montrons que le microsatellite T₁₇ présent au niveau d'une borne d'épissage du gène *HSP110* est fréquemment muté de manière bi-allélique dans les CG MSI (91/97 ; 93,8%). Nos résultats suggèrent que la perte d'expression de la protéine HSP110 a un impact négatif sur la croissance tumorale dans des modèles murins de xénogreffes sous-cutanée. *In vitro*, son inactivation *via* la surexpression de la protéine inhibitrice HSP110DE9 ou *via* l'utilisation d'un shARN (dirigé contre HSP110) entraîne une sensibilisation aux agents anti-cancer utilisés en chimiothérapie (5-FU et OXA) dans le modèle cellulaire gastrique étudié, la lignée TMK1. De manière intéressante, une corrélation a pu être établie entre la taille de la délétion et le niveau d'expression d'*HSP110*. Les patients présentant des tumeurs avec de grandes délétions (≥ 4 paires de base ; 58,5% des patients) semblent bénéficier d'une meilleure survie sans rechute comparé aux patients présentant des tumeurs avec de petites délétions (< 4 paires de base ; 41,5% des patients) et cela indépendamment du stade de la tumeur ou de la chimiothérapie, suggérant HSP110 comme facteur pronostique dans les CG MSI.

MUTATION OF *HSP110* IN GASTRIC CANCER WITH MICROSATELLITE INSTABILITY IS DELETERIOUS FOR CANCER CELLS AND IMPROVES DISEASE PROGNOSIS

Running Head: HSP110 PREDICTS SURVIVAL OF MSI GC PATIENTS

Pascale Cervera^{1,2,3°}, Anaïs Lagrange^{1,2°}, A'dem Bokhari^{1,2°}, Olivier Buhard^{1,2}, Sylvie Dumont^{1,2,3}, Vincent Jonchère^{1,2}, Romane Bertrand^{1,2}, Tatiana Ledent^{1,2}, Thierry André^{1,2,4}, Romain Cohen^{1,2,4}, Laetitia Marisa^{1,5}, Jérémie H Lefevre^{1,2,6}, Yann Parc^{1,2,6}, Carmen Garrido^{7,8}, Jean-François Fléjou^{1,2,3}, Magali Svrcek^{1,2,3}, Agathe Guilloux^{1,9}, Franco Roviello¹⁰, Giovanni Corso¹¹, Raquel Seruca^{12,13,14*}, Ada Collura^{1,2,3*}, Alex Duval^{1,2,3*#}

¹INSERM, UMR S 938 – Centre de Recherche Saint-Antoine, Equipe « Instabilité des Microsatellites et Cancers », Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer, F-75012, Paris, France;

²Sorbonne Université, Université Pierre et Marie Curie – Paris 6, Paris, France;

³AP-HP, Hôpitaux Universitaires Est Parisien, Hôpital Saint-Antoine, Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Paris, France ;

⁴Department of Medical Oncology, Hôpital Saint Antoine, Paris, France;

⁵Programme Cartes d'Identité des Tumeurs (CIT), Ligue Nationale Contre Le Cancer, Paris, France

⁶Department of General and Digestive Surgery, Hospital Saint-Antoine, Paris, France ;

⁷INSERM, U1231, Faculty of Medicine, 21000 Dijon, France ;

⁸University of Bourgogne Franche Comté, 21000 Dijon, France ;

⁹Centre de Mathématiques Appliquées, Ecole Polytechnique and CNRS UMR 7641, 91128 Palaiseau, France ;

¹⁰Department of Medicine, Surgery and Neurosciences, Unit of Surgical Oncology, University of Siena, 53100, Siena, Italy ;

¹¹ Breast Cancer Surgery Unit, European Institute of Oncology, Milan, Italy

¹²Instituto de Investigação e Inovação em Saúde/Institute for Research and Innovation in Health (i3S), University of Porto, Porto, Portugal.

¹³Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto (IPATIMUP), Porto, Portugal ;

¹⁴Faculty of Medicine, University of Porto, Porto, Portugal ;

° Equal contribution, co-first authors

* Equal contribution, co-last authors

Grant support: This work was supported by the Carte d'Identité des Tumeurs program (available: <http://cit.ligue-cancer.net>) from the Ligue Nationale Contre le Cancer.

Abbreviations: CRC, colorectal cancer; GC, gastric cancer; HSPs, Heat Shock Proteins; LS, Lynch syndrome; MMR, DNA mismatch repair; MSI, Microsatellite instability; MSS, microsatellite stable; PCR, polymerase chain reaction; RFS, relapse-free survival; TNM, tumor, node, and metastasis classification; wt, wild type ; 5-FU, 5-fluorouracil.

Corresponding authors: Alex Duval

Address for Correspondance : alex.duval@inserm.fr

Disclosures: The authors have no conflicts of interest to declare.

Author Contributions: PC, AL, AB (acquisition of data; analysis and interpretation of data; drafting of the manuscript; approval of the final version of the manuscript); OB, AG (analysis and interpretation of data; drafting of the manuscript; approval of the final version of the manuscript); SD, VJ, RB, TL, RC, LM, (collection and assembly of data; approval of the final version of the manuscript); TA, JHL, YP, GC, JFF, MS, FR, GC (revision of the manuscript; approval of the final version of the manuscript); RS, AC, AD, (conception of the study; analysis and interpretation of data; drafting of the manuscript ; revision of the manuscript; approval of the final version of the manuscript).

ABSTRACT (260 words, limit 260)

BACKGROUND AND AIMS: Heat shock protein 110 (HSP110) accumulates in colorectal cancer (CRC) cells and enhances their survival. We recently identified HSP110 as the first chaperone to be mutated in human cancer. In CRC displaying microsatellite instability (MSI), *HSP110* mutation abrogates HSP110 expression *via* exon skipping due to somatic deletions in the T17 intron repeat. Here, we investigated whether *HSP110* mutation can also have molecular, functional and clinical impacts in gastric cancer (GC) with MSI.

METHODS: Ninety seven MSI GC (stages 1-4) were screened for somatic allelic deletions in the *HSP110* T17 repeat. We correlated the size of T17 deletions with HSP110 expression in GC cells and with patient survival. We also evaluated tumor growth in GC cell xenografts and the resistance of GC cells to anticancer drugs following inactivation of HSP110.

RESULTS: Bi-allelic T17 somatic deletions were frequently observed in MSI GC (91/97, 93,8%). Shortening of the T17 repeat in tumor DNA correlated with decreased expression of full length HSP110. Patients with large *HSP110* T17 deletions (≥ 4 bp; n=55) had longer relapse-free survival compared to patients with small or no deletions (< 4 bp; n=42) in multivariate analysis (hazard ratio, 0.31; 95% confidence interval, 0.1-0.98; $P = .046$). Inactivation of *HSP110* led to inhibition of tumor growth in GC cell xenografts and to sensitization of GC cells to anticancer agents such as oxaliplatin and 5-fluorouracil.

CONCLUSIONS: *HSP110* is often mutated in MSI GC. Large deletions in T17 cause inactivation of *HSP110* and are associated with reduced growth of GC xenografts and improved patient outcome, regardless of TNM staging.

INTRODUCTION

Gastric cancer (GC) is one of the most common tumors worldwide. Microsatellite instability (MSI) caused by defects in the DNA mismatch repair (MMR) system has been reported in 15-30% of GC (for review, see ¹). Although *Helicobacter pylori* infection may play a role in the impairment of nuclear MMR activity ², MSI in GC mainly occurs because of Lynch syndrome or, more frequently, in a sporadic tumor context following epigenetic silencing of *hMLH1* in the gastric mucosa ³. Similar to colorectal cancer (CRC) and other primary tumors with MSI, the subset of GC with MSI displays characteristic clinical, pathologic and molecular features that are thought to be associated with a distinctive molecular pathway of tumor development ⁴. To date, several genes have been identified as critical targets of defective MMR and are specifically altered in GC with MSI when compared to microsatellite stable (MSS) GC ⁴⁻⁶. MSI GC are prone to frequent mutations in non-repetitive DNA sequences of specific genes such as *KRAS* ⁷. However, these tumors also display somatic mutations in microsatellites contained within genes, including *ATR*, *CHK1*, *MSH3*, *MSH6*, *RAD50*, *RIZ*, *TCF4*, *APAF1*, *CASP5*, *UVRAG*, *EGFR* and several others ¹. More recently, whole genome and exome sequencing of GC samples has revealed novel target genes for mutation, including *ARID1A* and *RNF43* which are mutated in over 50% of MSI GC ^{8,9}. Nevertheless, there is no clear evidence as yet for a pathophysiological or clinical impact of the above target gene mutations in MSI GC.

Conventional therapies for GC include surgery, radiotherapy and chemotherapy with 5-fluorouracil (5-FU) and cisplatin- or oxaliplatin-based regimens ¹⁰. Patients with early-stage GC have a low risk of lymph node metastasis and a good prognosis following endoscopic or surgical treatment, ¹¹ whereas advanced GC patients and those with a recurrence suffer high mortality rates due to chemotherapy resistance ¹². Unfortunately, GC patients are often diagnosed at advanced stages of the disease and therefore have a poor prognosis ¹⁰. Compared to MSS GC, MSI gastric tumors are generally less invasive, display an intestinal histological type and have a distal location ^{3,13}. Several putative prognostic biomarkers have been proposed for GC, including EGFR, HER2 and VEGFA expression, as well as inflammation-related factors ¹⁴. However, there is little information regarding the clinical relevance of these markers in MSI GC. The MSI phenotype is associated with improved prognosis, including higher survival rates for MSI GC patients with advanced disease. The reasons that underlie the better prognosis of MSI tumors are poorly understood. It has been reported that patients with MSI tumors, and notably CRC MSI patients, generally show a poor response to 5-FU-based chemotherapy ¹⁵. In line with this, a recent study of GC patients with stage 2 or 3 tumors found that 5-FU-based adjuvant chemotherapy appeared to benefit the MSS group but not the MSI group ¹⁶. Nevertheless, other authors have reported that survival of GC patients after administration of 5-FU did not correlate with their tumor MSI status ¹⁷.

The expression of chaperones such as Heat Shock Proteins (HSPs) is elevated in many cancer types, with HSP overexpression also being associated with worse survival and poor response to therapy ¹⁸⁻²². Elevated HSP expression plays a key role in protecting tumor cells from spontaneous apoptosis and from apoptosis induced by therapy ²³⁻²⁷. We recently reported the first somatic mutation to affect a molecular chaperone in human cancer ²⁸. This mutation was observed in MSI CRC and involved a T17 DNA repeat located within the splice acceptor site of *HSP110* intron 8. We correlated the size of the allelic deletions in *HSP110* T17 with the level of HSP110 protein expression in the tumor cells. T17 deletion resulted in a

dominant-negative HSP110 mutant protein generated from an aberrantly spliced mRNA lacking exon 9. The truncated HSP110 mutant protein (HSP110DE9) was expressed to the detriment of full-length, wild type HSP110 (HSP110wt). Overexpression of HSP110DE9 and loss of expression of HSP110wt increased the sensitivity of colon tumor cells to anticancer agents, including 5-FU and oxaliplatin. Adjuvant chemotherapy was found to confer a significant survival advantage to stage 2 and 3 CRC patients with no residual tumor HSP110wt expression because of large, bi-allelic *HSP110* T17 somatic deletions²⁹.

In the present study we hypothesized that *HSP110* mutation occurs frequently in GC with MSI and that it has molecular, functional and clinical impacts. MSI GC patients with stage 1-4 disease were evaluated for somatic allelic deletions in the *HSP110* T17 intron repeat and whether the size of deletions affected the level of tumor HSP110 expression. Tumor growth in GC xenografts and *in vitro* resistance to standard anticancer drugs (*e.g.* 5-fluorouracil and oxaliplatin) following inactivation of HSP110 was also examined, together with the effect of *HSP110* mutation on patient survival. Overall, our data indicate that *HSP110* is a frequent target for mutation in MSI GC. Large somatic deletions in T17 lead to inactivation of HSP110 and are associated with improved patient outcome, regardless of TNM staging.

RESULTS

Somatic Deletions in HSP110 T17 in Primary Gastric Tumors with MSI

None of 74 MSS GC samples investigated here harbored a somatic deletion in the *HSP110* T17 DNA repeat, as recently reported for MSS colon cancer³⁰ (data not shown). The large majority of primary MSI gastric tumors (91/97, 93.8%) showed somatic *HSP110* T17 deletions that were up to 6 bp in size and located beyond the T17/T16 polymorphic zone (**Fig. 1A**). In most samples, one mutated allele type was observed and this corresponded to the main clonal population present in the tumors. For cases displaying multi-allelic profiles, the peak associated with the longer deletion that did not appear to result from stuttering of Taq polymerase was used for classification (**Fig. 1B**). None of the primary tumor samples was micro- or even macro-dissected. Therefore, peaks corresponding to wild type alleles reflect the result obtained from routine analysis of the T17 DNA repeat in MSI primary GC. As previously demonstrated in primary CRC, the presence of biallelic mutations for *HSP110* T17 was revealed by performing microdissection of 6 primary MSI GC samples that were contaminated with normal cells (**Fig. 1C** and **Supplementary Figure S1**). In the majority of cases, microdissection led to the disappearance of *HSP110* wild-type allele, as well as the *TGFB2* wild-type allele in cases where this target gene containing an A10 coding repeat was also mutated. The mutation frequencies of 11 other target genes for MSI-driven instability were highly variable in GC (**Fig. 1D**), with that of *HSP110* T17 (91/97, 93.8%; **Fig. 1D**) being higher than that of all coding microsatellite targets reported to date in MSI primary GC.

HSP110 and HSP110DE9 Expression According to Somatic T17 Deletion Status in MSI GC

Using quantitative RTPCR, we next compared the expression of *HSP110* wild type (*HSP110wt*) mRNA with that of *HSP110DE9* mutant mRNA in a series of 30 MSI GCs. Schematic representation of both transcripts is shown in **Fig. 1E**. As with CRC, we observed

that shortening of the *HSP110* T17 repeat correlated with decreased expression of full length *HSP110* mRNA. However, there was no concomitant increase in the *HSP110DE9* transcript level in primary MSI GC, probably because it was degraded by nonsense-mediated mRNA decay due to the premature termination codon present in exon 10 (**Fig. 1E and 1F**). A pronounced increase in the *HSP110DE9*/*HSP110wt* mRNA ratio was observed in MSI GCs with T17 deletions that were 4 bp or larger (**Fig. 1G**).

Chemosensitivity of Gastric Cancer Cells Based on their Expression of HSP110DE9 and HSP110wt

Next, we performed chemosensitivity assays using stably transfected TMK1 GC cells that overexpressed *HSP110wt* or *HSP110DE9* protein. These cells do not display MSI, as previously reported³¹. They were transfected using an EBV-based vector system that allows stable overexpression of genes and polyclonal models, thus avoiding biases inherent with single-cell approaches²⁹. Using this method, we found that TMK1 GC cells became more sensitive to both 5FU and oxaliplatin when they overexpressed *HSP110DE9* compared to *HSP110wt* expression or empty vector (**Fig. 2A-C**). Chemosensitivity assays were also performed using a TMK1 cell line that was depleted for *HSP110* by using dedicated shRNA cloned into the same EBV-based vector. Again, we observed that *HSP110*-depleted TMK1 GC cells became more sensitive to both 5FU and oxaliplatin compared to control TMK1 cells treated with scrambled shRNA (**Fig. 2D-F**).

HSP110DE9 inhibits Tumor Growth in Xenografts Derived from Gastric Cancer Cells

Human TMK1 cell lines that stably overexpressed *HSP110wt* or *HSP110DE9*, or contained the empty vector were injected into nude mice. A markedly slower rate of tumor growth was observed in the xenografts that overexpressed *HSP110DE9* compared to those overexpressing *HSP110wt* or those transfected with empty vector ($P < 0.001$; see **Fig. 3**, upper panel). Both the *HSP110DE9* and *HSP110wt* proteins were expressed in TMK1 xenografts after 44 days of growth (**Fig. 3**, lower panel).

HSP110 T17 Mutation Status and Association with Patient Survival in Stage 1-4 MSI GC

The characteristics of MSI GC patients studied here are shown in **Table 1**. The first and second sets of patients from France and Italy, respectively, showed significantly different molecular and clinical characteristics with regard to *MLH1* methylation status ($P = .008$) and chemotherapy ($P = .006$). They were otherwise similar for other clinical and biological parameters of gender, age, relapse status and *KRAS* mutation. Using univariate Cox modelling of the overall cohort, we determined the threshold value for *HSP110* T17 deletion that resulted in a maximal survival difference (RFS, Relapse-free Survival) between patients with large and small deletions. This was found to be a 4-bp deletion (**Table 2** and data not shown). The validity of this 4-bp cut-off value was confirmed using the wild bootstrap method with adjustment of the p -value for multiple testing ($P_{Cut4} = .038$, $P_{Cut3} = .053$, $P_{Cut5} =$

0.18) by using the wild bootstrap method with adjustment of the *p*-value for multiple testing) see Materials and Methods for further details).

The 82 MSI GC patients for whom survival data was available were therefore classified into those displaying large deletions ($DT \geq 4$ bp; *HSP110* DelL; $n = 48$ of 82; 58.5%) or small deletions ($0 \leq DT < 4$ bp; *HSP110* DelS; $n = 34$ of 82; 41.5%). According to this classification, *HSP110* T17 mutation status was associated with RFS in multivariate analysis (hazard ratio [HR], 0.31; 95% confidence interval, 0.1-0.98; $P = .046$) (**Table 2**). Of note, no significant associations were found between the size of *HSP110* T17 deletions and other molecular or clinical parameters (**Table 3**). Finally, in contrast to *HSP110*, none of the other target genes for MSI examined here (**Fig. 1D**) showed a significant association with survival according to their mutation status in MSI GC (**Table 4**).

DISCUSSION

A comprehensive molecular classification of GC was recently proposed and defined 4 major genomic classes: EBV-infected tumors, MSI tumors, and MSS tumors with or without chromosomal instability³². Identification of these GC subtypes provides a roadmap for patient stratification and for trials evaluating therapeutic agents. Further work is required to identify prognostic factors and therapeutic targets in each of the GC subtypes in order to guide the development of more effective and personalized treatments. MSI tumors display frequent mutations in cancer-related genes. Following on from our recent finding that *HSP110* chaperone is frequently mutated in human CRC, we report here that almost all MSI GC also show somatic deletions in *HSP110* T17. These deletions lead to abrogation of *HSP110* chaperone activity when they reach 4 bp in size, as occurs in about half of MSI GC. In line with previous results in CRC, the present data also indicates that *HSP110* silencing inhibits GC growth and sensitizes GC cells to apoptosis and to the standard chemotherapeutic agents (5-FU and oxaliplatin) used for routine treatment of GC patients. In line with these observations, large T17 deletions (defined as those that reached 4 bp or more) were associated with significantly improved survival of MSI GC patients, irrespective of TNM staging and other important clinical and biological parameters. *HSP110* appeared to be the only target gene for MSI whose mutation impacted GC prognosis, thus highlighting the clinical relevance of this biomarker in MSI GC. Overall, our findings indicate that *HSP110* mutation is likely to be a crucial determinant of tumor prognosis and treatment response in MSI GC, as previously reported for MSI CRC. Regardless of the primary tumor location, long noncoding mononucleotide repeats are hot spots for mutation in MSI tumor cells. Consequently, these microsatellites represent the “Achilles’ heel” of the MSI-driven tumorigenic process when their somatic instability leads to inactivation of oncogenic proteins, such as for the T17 repeat located in intron 8 of the *HSP110* chaperone.

As with CRC and other solid tumors, a possible explanation for the overexpression of *HSP110* in gastric tumors is that GC cells must extensively rewire their metabolic and signal transduction pathways, thereby becoming dependent on molecular chaperones that would otherwise be dispensable for the survival of normal cells. Whereas the clinical benefit of *HSP110* mutation in CRC was only observed in patients who received adjuvant chemotherapy, here we observed a survival benefit for GC patients overall, independent of adjuvant therapy. However, the possibility of an interaction between chemotherapy and

HSP110 T17 mutation for survival, if any, remains to be determined in larger cohorts of MSI GC patients. Of interest, our previous work on MSI CRC found that 5 bp size deletions led to the complete inactivation of *HSP110* and was the optimal cut-off value to classify patients in both univariate and multivariate survival analyses. In the present work on MSI GC we found that a 4 bp deletion cut-off was optimal in term of survival, being associated with the maximal survival difference observed between MSI GC patient groups harboring large or small T17 deletions and with a significant, but not complete decrease in *HSP110* expression. The dependence of MSI tumor cells on *HSP110* activity may therefore be stronger for GC compared to CRC, possibly because of tumor location, physiological conditions or other unknown molecular parameters. Also of interest was the marked decrease in tumor growth observed in xenografts derived from MSS TMK1, suggesting that inactivation of *HSP110* could be relevant for the treatment of both MSI and MSS GC patients.

These results provide evidence for an additional layer of molecular heterogeneity specific to MSI GC, with the potential to serve as a biomarker for prognosis and treatment response as well as a therapeutic target. Inhibition of HSPs is a strategy that is being tested in cancer therapy, with several different inhibitors of HSP90 currently in phase II/III clinical trials ²². In the present work, we have shown that GC seems to be strongly dependent on the presence of another high molecule weight chaperone, *HSP110*. Unfortunately no specific inhibitors of *HSP110* are currently available. The development of drugs that mimic the dominant negative function of mutant *HSP110*DE9 or that block its degradation through nonsense-mediated mRNA decay may allow for improved treatment of both MSI and MSS gastrointestinal tumors. Another key question will be to determine whether, among MSI GC patients, distinct therapeutic protocols could be proposed for subjects with MSI GC displaying small or large *HSP110* T17 deletions. Validation in additional large cohorts of MSI GC patients with a sufficient numbers to examine stage-specific effects will be of paramount importance. But certainly the most tantalizing question provoked by the present study is whether *HSP110* mutation (*e.g.* large T17 deletion, as observed in about half of MSI GC) somehow provides a mechanistic basis for the more favorable outcomes observed in people with MSI GC compared to MSS GC, or the likelihood that these individuals derive less benefit from adjuvant chemotherapy including immune checkpoint inhibitors that are now proposed in the cure of GC.

MATERIALS AND METHODS

Ethics Statement. This study was approved by the institutional review boards/ethics committees of the Saint Antoine Hospital, Paris, France. Informed consent was recorded in each case. Patients who received preoperative chemotherapy and/or radiation therapy were excluded from this study.

Primary gastric tumor samples and CRC cell lines. Primary tumors and normal gastric tissues were obtained from patients undergoing surgery in Hôpital Saint-Antoine, Paris, France and/or from the University of Sienna, Italy. MSI status was determined as described previously (Collura et al.). TMK1 cell lines were purchased from the American Type Culture Collection. All cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle media as described.

Stable cell transfection with shRNAs. Cloning of the pEBVsiRNA vectors and establishment of silenced cells were performed as described previously (Berthetnet, bokhari et al.). The specific shHSP110 sequences cloned into hygromycin-resistant pEBV plasmids were used to transfect TMK1 cell lines with JetPrime (Ozyme) according to the manufacturer's recommendations. Twenty-four hours later, cells were trypsinized and seeded in culture medium supplemented with hygromycin (20 µg/ml).

Stable cell transfection for overexpression and xenografts. TMK1 cell lines were transfected with an Epstein-Barr virus-based vector construction coding for neither HSP110wt, HSP110DE9 or an empty vector as previously described (Collura et al.). To maintain the vector, cells were seeded in culture medium supplemented with puromycin (1 µg/ml). Ten million cells from each cell line transfected with plasmid were injected subcutaneously into the flank of nude mice (Charles River Laboratories, Wilmington, USA). The tumor size was measured 3 times per week for 44 days. Mice were sacrificed when the tumors reached 800 mm³. The mice were treated according to the guidelines of the Ministère de la Recherche et de la Technologie, France.

Analysis of cell survival and apoptosis. Cell survival rates for sensitivity to 5 fluorouracil and oxaliplatin were assessed using WST-1 (Sigma). Briefly, 2X10⁴ cells of each TMK1-transfected cell line were plated per well in 24-well plates in 2 ml of media with or without drugs. After 72h, WST-1 reagent was added and incubated for 4 hours at 37°C. The absorbance was measured at 450nm and the reference wavelength was 750nm. For apoptosis measurements, cells were harvested and stained with Annexin V-FITC and 7-AAD (Beckman and Coulter) according to the manufacturer's instructions. Positive or negative cells were detected by flow cytometry with a Gallios cytometer and analysis was performed using Kalusa software.

Cell Proliferation. Proliferation rates were assessed in culture using WST-1 (Roche, Mannheim, Germany). 2x10⁴ cells were plated per well in 24-well plates in 2mL of media. WST-1 reagent was added and incubated for 4 h at 37°C every day for 5 days. The absorbance was measured at 450nm and the reference wavelength was 750nm.

Immunoblotting. Cells were washed in PBS and lysed on ice in lysis buffer (RIPA, Pierce) in the presence of a protease inhibitor cocktail (Pierce). Proteins were resolved on sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to nitrocellulose membranes with iBlot dry Blotting system (ThermoFisher Scientific). The membranes were incubated with Odyssey blocking buffer (LI-COR Biosciences) for 1 h at

room temperature and then incubated overnight at 4°C with the primary antibodies (HSP110 : ab109624 from ABCAM, 1:100; b-actine : Li-COR Biosciences 926-42210, 1:5000).

HSP110 T17 deletion analysis and Real-Time quantitative RT-PCR analysis. DNA was extracted using the QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen). T17 deletion status was determined as previously described (Dorard et al.). Total RNA was extracted with an RNeasy Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. RNA integrity was evaluated on a 2100 Bioanalyzer using the RNA 6000 Nano LabChip kit (Agilent) for all primary tumor samples. Only samples with RIN > 5 were used. Complementary DNAs were synthesized using the High Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems). For quantitative RT-PCR, the Applied SDS Biosystems analysis software was used. For the competitive detection of *HSP110wt* and *HSP110DE9* in Figure 1E, internal probes were used as described earlier (Dorard et al). Expression values for single *HSP110wt* and *HSP110DE9* transcripts in Figure 1D and Figure 2F were calculated relative to RPLP0 ubiquitous mRNA.

Laser capture microdissection. Six serial, 5 µm thickness paraffin-embedded sections were cut and then mounted onto membrane slides (PALM membrane Slide, Bernried, Germany). Neoplastic cells were microdissected as described earlier ³³.

Statistical analysis. Survival analyses were conducted after stratification to take into account potential differences between samples from different centers. RFS, defined as the time from surgery to the date of first recurrence (relapse or death from GC) or last contact was used as survival criterion and the survival data were censored using a 5-year end point. Univariate and multivariate models were computed using Cox proportional hazards regression. For multivariate analyses, only those variables with information available for all sample groups were included in models. All survival analyses were performed using R package 'survival'.

To test for the existence of a threshold on the effect of HSP110 T 17 deletions on RFS, we first conducted Cox multivariate analysis for each possible value of the cut-off, by introducing a binary variable encoding large and small deletions in addition to other clinical variables. To overcome a possible false detection of a cut-off, which is known to constitute a risk for this approach, (see for instance ³⁴) we applied a multiple testing procedure. More precisely, we applied the min-p bootstrap based method of Dudoit and van der Laan³⁵ with 200 bootstrap replications.

Differences between cohorts from clinical centers (France and Italy) and between *HSP110* T17 deletion groups (small or large) and other clinical or biological annotations were tested for statistical significance using the Cochran–Mantel–Haenszel chi-squared test for categorical variables, or an unpaired Student t test for continuous variables. For all analyses, *p* values less than .05 were considered to represent statistical significance.

Figure Legends

Figure 1. (A) Distribution of mutated *HSP110* T₁₇ alleles in 97 MSI GC. (B) Examples of 6 *HSP110* T₁₇ mutated alleles. DT: size of *HSP110* T₁₇ somatic deletions in tumor DNA in each case (in bp). The polymorphic zone relates to the allelic variations observed for the *HSP110* T₁₇ repeat in MSS patients as described previously²⁹. (C) Fragment analysis of *HSP110* T₁₇ and *TGFBR2* A₁₀ microsatellite profiles (left and right panel) of 3 primary tumor samples before and after microdissection. (D) Mutation of the intronic *HSP110* T₁₇ and of 11 coding microsatellites contained within target genes for MSI in gastric tumors. *HSP110* T₁₇ large deletions were observed in 93.8% of MSI GC patients. (E) Schematic representation of the *HSP110* gene and the effect of deletion mutation on mRNA expression and HSP110DE9 protein expression. (F) Relative mRNA expression levels for *HSP110*wt and *HSP110DE9* as determined by quantitative RT-PCR in normal mucosa (N, n= 15) and gastric tumors with small T17 deletion (< 4 bp, n=7) or large T17 deletion (≥ 4 bp, n=9). (G) Distribution of *HSP110* T17 deletion and *HSP110DE9*/*HSP110*wt mRNA ratio in 30 gastric tumors. Bp = base pairs.

Figure 2. (A) Left panel: chemosensitivity assay using stably transfected GC cell line TMK1 that overexpressed *HSP110*wt or *HSP110DE9* protein. Right panel: Absorbance values (optic density OD) obtained when plating the same number of untreated cells that overexpressed either *HSP110*wt or *HSP110DE9* (upper panel: 1.5X10⁶ cells; bottom panel: measurement of OD at 24 h after plating at T0 10,000 cells) are shown as controls. N=3, *t*-test ***P*<0.01 (B) FACS analysis of apoptosis in TMK1 cells that overexpressed *HSP110*wt or *HSP110DE9* protein. Left panel: Ratio of apoptotic cells (Annexin 5-FITC positive profile) transfected with *HSP110*wt or *HSP110DE9* vector vs cells with an empty vector after 5-Fluorouracil or Oxaliplatin treatment. N=3, *t*-test ***P*<0.01. Right panel: Representative experiment performed in (B). (C) Western blot showing protein overexpression of *HSP110* and *HSP110DE9* in stably transfected TMK1 cells, actin serves as loading control, n=3; one representative experiment is shown. (D) Left panel: chemosensitivity assay for TMK1 stably transfected with EBV-sh *HSP110* vector. N=3, *t*-test ***P*<0.01, ****P*<0.001. Right panel: The absorbance values (optic density OD) obtained when plating the same number of untreated cells that overexpressed either *HSP110*wt or *HSP110DE9* (upper panel: 1.5X10⁶ cells; bottom panel: measurement of OD at 24h after plating at T0 10,000 cells) are shown as controls. (E) FACS analysis of apoptosis in TMK1 cells stably transfected with sh*HSP110*. Left panel: Ratio of apoptotic cells (Annexin 5-FITC positive profile) transfected with sh*HSP110*wt vector vs cells with an empty vector after 5-Fluorouracil treatment, N=3, *t*-test ***P*<0.01. Right panel: Representative experiment performed in (E). (F) The expression of *HSP110* in EBV-sh *HSP110*-transfected cells was determined by qRT-PCR. Upper panel: amplification plots corresponding to the expression values calculated relative to RPLP0 mRNA. Results are expressed as n-fold difference in *HSP110* expression (DCt) in the two conditions (empty vector or sh*HSP110*), whereas DCt was determined in each case by subtracting the average Ct value of the *HSP110*mRNA from the average Ct value of the P0 gene (used as reference). Bottom panel: inhibition of *HSP110* in percentage, n=3, 64,4% are the median of 3 independent experiments.

Figure 3. Upper left panel: Comparative analysis of tumor growth (mean tumor volumes mm³) in xenografts derived from human GC TMK1 cells stably transfected with control (empty vector), HSP110 or HSP110DE9 overexpression vector, respectively. Ten mice per group. A representative experiment is shown (n=2). Upper right panel: Images of representative excised tumor xenografts from mice shown in (A), at the end of experiment (Day 44), scale=10 mm. Bottom left panel: Western blot showing HSP110 and HSP110DE9 expression from two independent xenografts (indicated as (1) and (2)) at the end of the experiment (Day 44). HSC70 is used as a loading control. Bottom right panel: Statistical analysis of tumor size for the two experimental conditions for overexpression of the tests (HSP110 and HSP110DE9) and control (Empty). T-Test, ***P<0.001.

Table 1. Description of the MSI gastric cancer cohorts used in this study.

Table 2. Association of clinical and molecular parameters to outcome (RFS). HR, Cox hazard ratio; CI, confidence interval of HR.

Table 3. Association of clinical and molecular parameters to HSP110 deletion status in MSI gastric cancer patients.

Table 4. Association of MSI target gene mutations to outcome (RFS). HR, Cox hazard ratio; CI, confidence interval of HR.

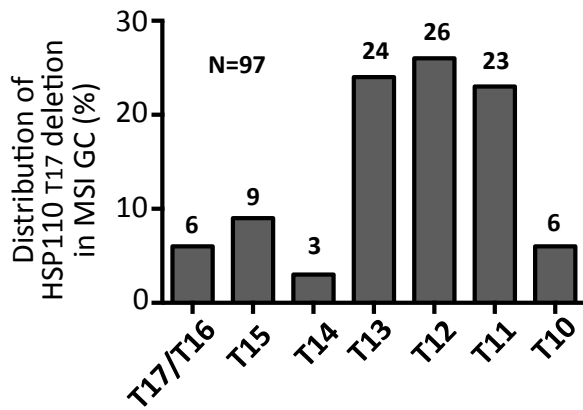
References

1. Velho S, Fernandes MS, Leite M, et al. Causes and consequences of microsatellite instability in gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2014;20:16433-42.
2. Machado AM, Figueiredo C, Seruca R, et al. Helicobacter pylori infection generates genetic instability in gastric cells. *Biochim Biophys Acta* 2010;1806:58-65.
3. Pedrazzani C, Corso G, Velho S, et al. Evidence of tumor microsatellite instability in gastric cancer with familial aggregation. *Fam Cancer* 2009;8:215-20.
4. Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* 2008;358:1160-74.
5. Corso G, Velho S, Paredes J, et al. Oncogenic mutations in gastric cancer with microsatellite instability. *Eur J Cancer* 2011;47:443-51.
6. Velho S, Corso G, Oliveira C, et al. KRAS signaling pathway alterations in microsatellite unstable gastrointestinal cancers. *Adv Cancer Res* 2010;109:123-43.
7. Brennetot C, Buhard O, Jourdan F, et al. Mononucleotide repeats BAT-26 and BAT-25 accurately detect MSI-H tumors and predict tumor content: implications for population screening. *Int J Cancer* 2005;113:446-50.
8. Wang K, Kan J, Yuen ST, et al. Exome sequencing identifies frequent mutation of ARID1A in molecular subtypes of gastric cancer. *Nat Genet* 2011;43:1219-23.
9. Wang K, Yuen ST, Xu J, et al. Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer. *Nat Genet* 2014;46:573-82.
10. Wadhwa R, Song S, Lee JS, et al. Gastric cancer-molecular and clinical dimensions. *Nat Rev Clin Oncol* 2013;10:643-55.

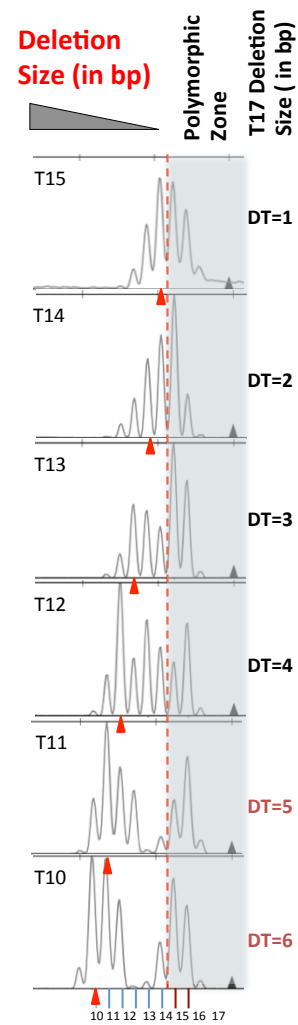
11. Uedo N, Iishi H, Tatsuta M, et al. Longterm outcomes after endoscopic mucosal resection for early gastric cancer. *Gastric Cancer* 2006;9:88-92.
12. Cervantes A, Rosello S, Roda D, et al. The treatment of advanced gastric cancer: current strategies and future perspectives. *Ann Oncol* 2008;19 Suppl 5:v103-7.
13. Kim H, An JY, Noh SH, et al. High microsatellite instability predicts good prognosis in intestinal-type gastric cancers. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26:585-92.
14. Duraes C, Almeida GM, Seruca R, et al. Biomarkers for gastric cancer: prognostic, predictive or targets of therapy? *Virchows Arch* 2014;464:367-78.
15. Carethers JM, Chauhan DP, Fink D, et al. Mismatch repair proficiency and in vitro response to 5-fluorouracil. *Gastroenterology* 1999;117:123-31.
16. An JY, Kim H, Cheong JH, et al. Microsatellite instability in sporadic gastric cancer: its prognostic role and guidance for 5-FU based chemotherapy after R0 resection. *Int J Cancer* 2012;131:505-11.
17. Oki E, Kakeji Y, Zhao Y, et al. Chemosensitivity and survival in gastric cancer patients with microsatellite instability. *Ann Surg Oncol* 2009;16:2510-5.
18. Cornford PA, Dodson AR, Parsons KF, et al. Heat shock protein expression independently predicts clinical outcome in prostate cancer. *Cancer Res* 2000;60:7099-105.
19. Blagosklonny MV. Re: Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:239-40.
20. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;415:530-6.
21. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347:1999-2009.
22. Jegou G, Hazoume A, Seigneuric R, et al. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett* 2013;332:275-85.
23. Nylandsted J, Brand K, Jaattela M. Heat shock protein 70 is required for the survival of cancer cells. *Ann N Y Acad Sci* 2000;926:122-5.
24. Nylandsted J, Rohde M, Brand K, et al. Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:7871-6.
25. Ciocca DR, Rozados VR, Cuello Carrion FD, et al. Hsp25 and Hsp70 in rodent tumors treated with doxorubicin and lovastatin. *Cell Stress Chaperones* 2003;8:26-36.
26. Gyrd-Hansen M, Nylandsted J, Jaattela M. Heat shock protein 70 promotes cancer cell viability by safeguarding lysosomal integrity. *Cell Cycle* 2004;3:1484-5.
27. Joly AL, Wettstein G, Mignot G, et al. Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity. *J Innate Immun* 2010;2:238-47.
28. Dorard C, de Thonel A, Collura A, et al. Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. *Nat Med* 2011;17:1283-9.
29. Collura A, Lagrange A, Svrcek M, et al. Patients with colorectal tumors with microsatellite instability and large deletions in HSP110 T17 have improved response to 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Gastroenterology* 2014;146:401-11 e1.
30. Buhard O, Lagrange A, Guilloux A, et al. HSP110 T17 simplifies and improves the microsatellite instability testing in patients with colorectal cancer. *J Med Genet* 2016;53:377-84.

31. Yao Y, Tao H, Kim JJ, et al. Alterations of DNA mismatch repair proteins and microsatellite instability levels in gastric cancer cell lines. *Lab Invest* 2004;84:915-22.
32. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* 2014;513:202-9.
33. Svrcek M, Buhard O, Colas C, et al. Methylation tolerance due to an O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) field defect in the colonic mucosa: an initiating step in the development of mismatch repair-deficient colorectal cancers. *Gut* 2010;59:1516-26.
34. Lausen B, & Schumacher M, Evaluating the effect of optimized cutoff values in the assessment of prognostic factors. *Computational Statistics & Data Analysis* 1996 ; 21(3), 307-326.
35. Dudoit, S., & Van Der Laan, M. J. Multiple testing procedures with applications to genomics. *Book Springer Series in Statistics*.2008.

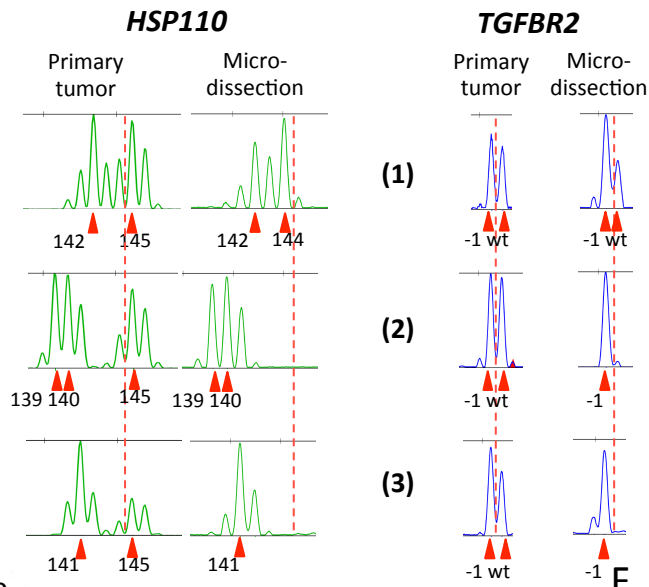
A



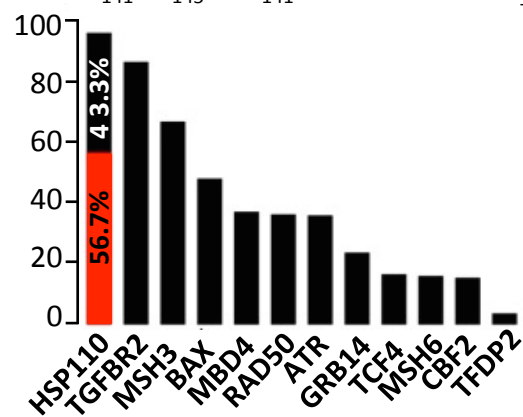
B



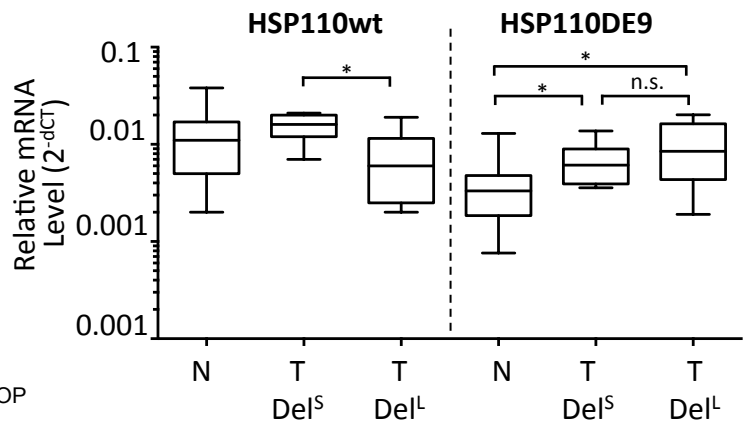
C



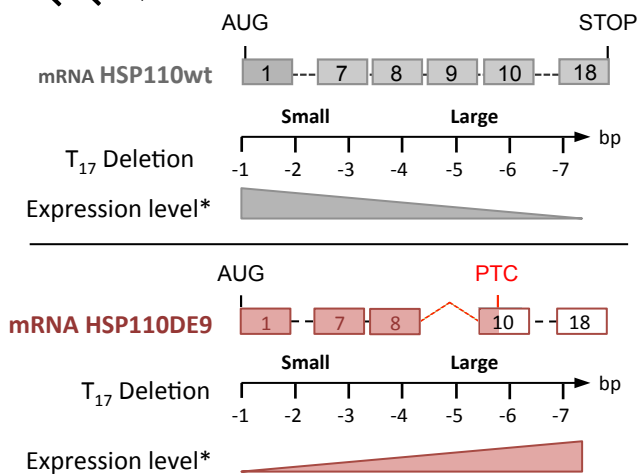
D



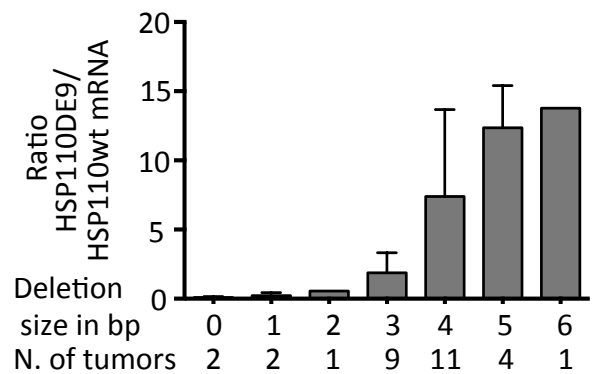
F



E



G



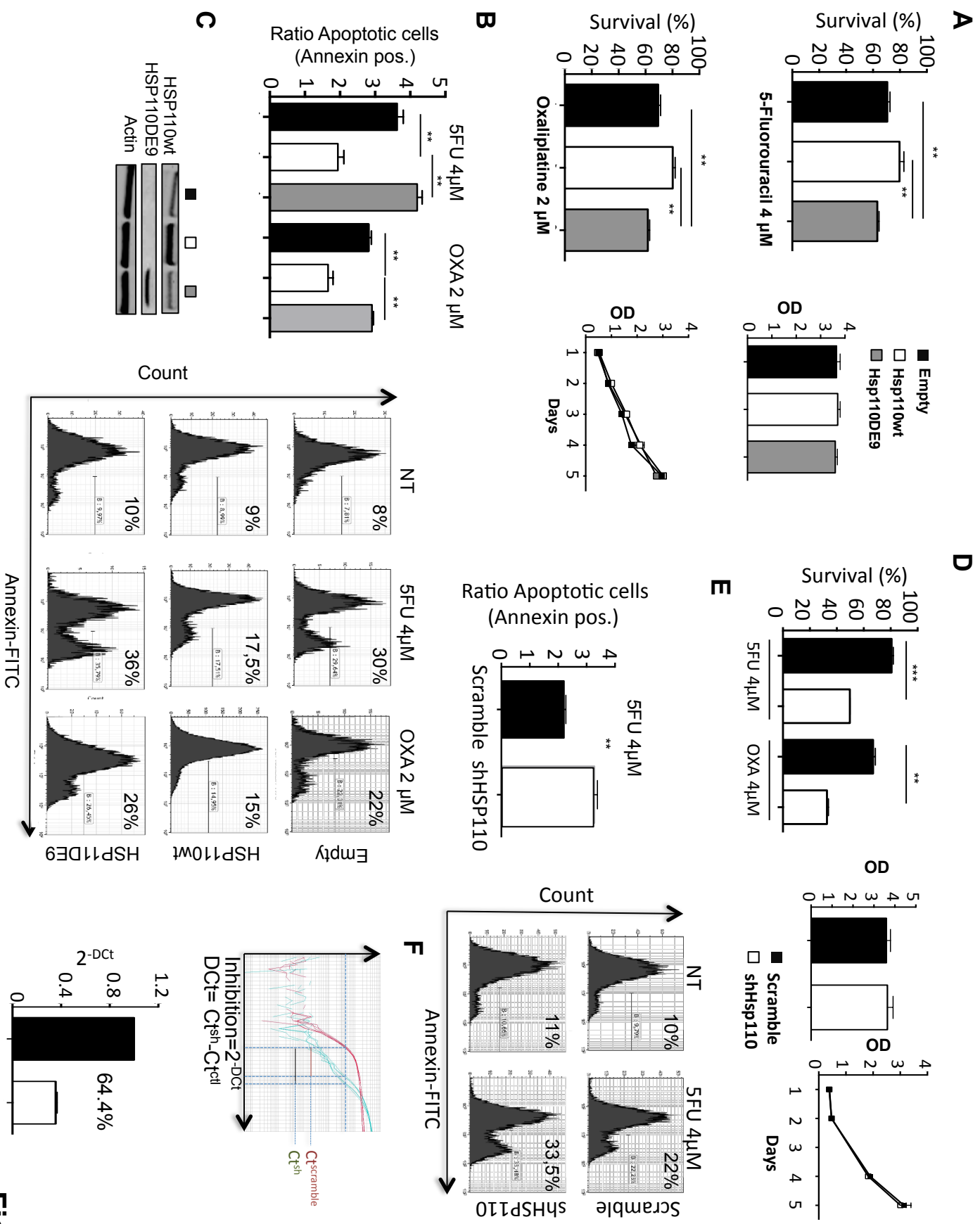


Figure 2

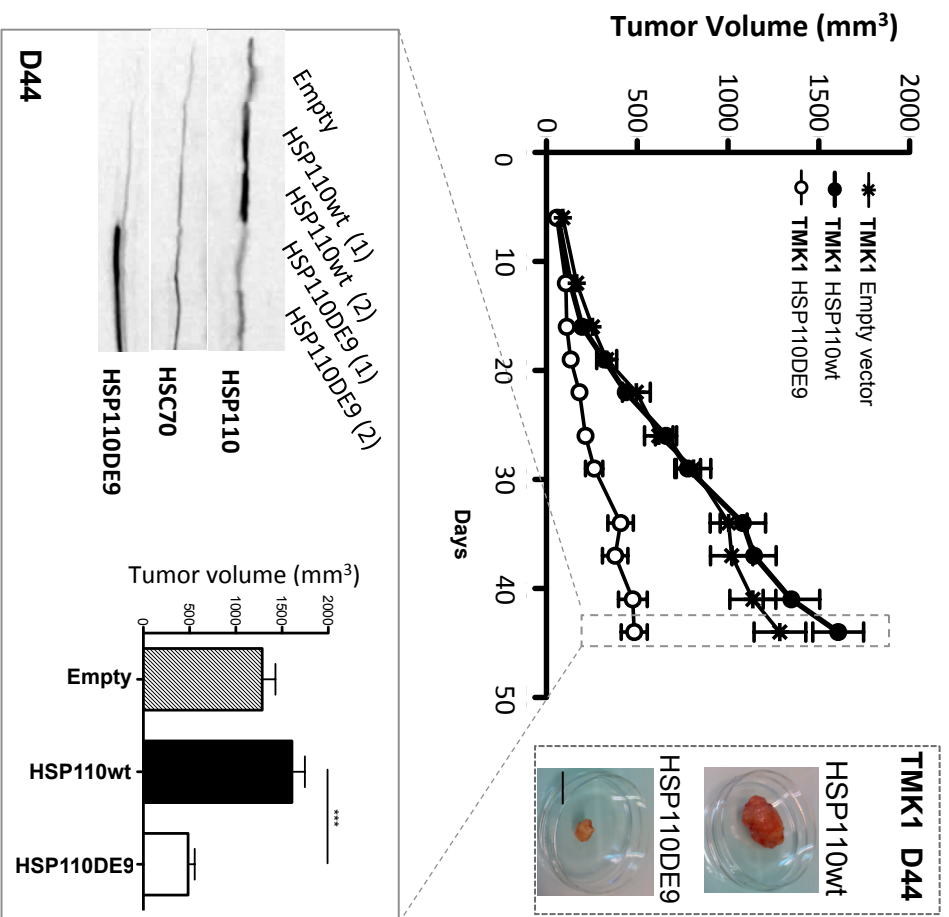


Figure 3

Table 1. Description of MSI cohorte used in this study

		France	Italy		
		n (%)	n (%)		
		(N=49)	(N=48)		
Gender	F	24 (24.7)	33 (34.0)	57	0.064
	M	25 (25.8)	15 (15.5)	40	
		49	48	97	
Tumor stage	1	12 (12.4)	20 (20.6)	32	0.19
	2	21 (21.6)	12 (12.4)	33	
	3	13 (13.4)	14 (14.4)	27	
	4	3 (3.1)	2 (2.1)	5	
		49	48	97	
Lauren classification	Intestinal (1)	40 (42.1)	42 (44.2)	82	0.29
	Diffuse (2)	8 (8.4)	4 (4.2)	12	
	Mixte (3)	1 (1.1)	0 (0.0)	1	
		49	46	95	
Relapse	no	33 (37.1)	37 (41.6)	70	0.8
	yes	8 (9.0)	11 (12.4)	19	
		41	48	89	
Adjuvant chemotherapy	no	33 (35.9)	22 (23.9)	55	0.006
	yes	11 (12.0)	26 (28.3)	37	
		44	48	0	
Resection quality	R0	43 (44.3)	41 (42.3)	84	0.91
	R1	4 (4.1)	4 (4.1)	8	
	R2	2 (2.1)	3 (3.1)	5	
		49	48	97	
KRAS mutation	no	39 (41.1)	38 (40.0)	77	1
	yes	9 (9.5)	9 (9.5)	18	
		48	47	95	
MLH1 Methylation	U	10 (10.5)	1 (1.1)	11	0.008
	M	38 (40.0)	46 (48.4)	84	
		48	47	95	
Age at diagnosis as Lynch marker	≥ 60 yrs	37 (41.6)	46 (51.7)	83	0.41
	< 60 yrs	4 (4.5)	2 (2.2)	6	
		41	48	89	
Age at diagnosis (continuous)		72.61	75.46		0.16

Table 2. Association of clinical and molecular parameters to outcome (RFS), HR, Cox hazard ration; CI, confidence interval of HR

Variables	Cox Univariate analysis				Cox Multivariate analysis				
	Available data			Modality P-value	model P-Value \$	N=82 (number of events: 19)		Modality P-value	model P-Value \$
	n (n events)	HR	(95% CI)			HR	(95% CI)		
HT17_CLASS, Large *	89 (21)	0.40	(0.17-0.98)	0.045	0.038	0.31	(0.10-0.98)	0.046	0.018
Tumor stage 2	89 (21)	3.35	(0.67-16.67)	0.14	0.001	4.17	(0.61-28.40)	0.14	
Tumor stage 3		9.71	(2.14-44.16)	0.003		10.53	(1.69-65.78)	0.012	
Tumor stage 4		15.32	(1.96-119.90)	0.009		28.17	(1.98-401.76)	0.014	
GENDER, M	89 (21)	0.75	(0.30-1.86)	0.54	0.54	0.86	(0.28-2.63)	0.79	
Adjuvant chemotherapy, yes	87 (20)	1.96	(0.78-4.89)	0.15	0.14	0.5	(0.11-2.27)	0.37	
Resection quality, R1	89 (21)	2.35	(0.53-10.29)	0.26	0.059	2.44	(0.35-17.00)	0.37	
Resection quality, R2		4.69	(1.03-21.37)	0.046		2	(0.31-12.95)	0.47	
DiagAge_pools, <60 yrs	85 (20)	0.56	(0.07-4.30)	0.58	0.58	0.25	(0.02-2.72)	0.26	
KRAS mutation, yes	87 (20)	1.45	(0.56-3.79)	0.45	0.45	0.71	(0.20-2.53)	0.6	
MLH1 Methylation, M	87 (20)	3.57	(0.44-28.77)	0.23	0.20				
LAUREN classification, not intestinal (2 and 3)	87 (19)	1.01	(0.23-4.43)	0.99	0.99				

* calculated for mutation classes cutoff=4 bp
\$ score logrank test

Table 3. Association of clinical and molecular parameters to HSP110 deletion status in MSI gastric cancer patients

		HT17 – Large	HT17 – Small *		<i>P-value</i>
		n (%)	n (%)		
		(N=55)	(N=42)		
Gender	F	29 (29.9)	28 (28.9)	57	0.21
	M	26 (26.8)	14 (14.4)	40	
		55	42	97	
Tumor stage	1	19 (19.6)	13 (13.4)	32	0.62
	2	19 (19.6)	14 (14.4)	33	
	3	13 (13.4)	14 (14.4)	27	
	4	4 (4.1)	1 (1.0)	5	
		55	42	97	
Lauren classification	Intestinal (1)	50 (52.6)	32 (33.7)	82	0.16
	Diffuse (2)	5 (5.3)	7 (7.4)	12	
	Mixte (3)	0 (0.0)	1 (1.1)	1	
		55	40	95	
Relapse	no	44 (49.4)	26 (29.2)	70	0.019
	yes	6 (6.7)	13 (14.6)	19	
		50	39	89	
Adjuvant chemotherapy	no	35 (38.0)	20 (21.7)	55	0.28
	yes	19 (20.7)	18 (19.6)	37	
		54	38	92	
Resection quality	R0	46 (47.4)	38 (39.2)	84	0.61
	R1	6 (6.2)	2 (2.1)	8	
	R2	3 (3.1)	2 (2.1)	5	
		55	42	97	
KRAS mutation	no	46 (48.4)	31 (32.6)	77	0.29
	yes	8 (8.4)	10 (10.5)	18	
		54	41	95	
MLH1 Methylation	U	6 (6.3)	5 (5.3)	11	1
	M	48 (50.5)	36 (37.9)	84	
		54	41	95	
Diag age cutoff 60 y	≥ 60 yrs	49 (55.1)	34 (38.2)	83	0.08
	< 60 yrs	1 (1.1)	5 (5.6)	6	
		50	39	89	
Age at diagnosis		73.01795	75.02256		0.34

* calculated for mutation classes cutoff=4 bp

Table 4. Association of MSI target genes mutations to outcome (RFS)

Variables	Available data N (n events)	HR	Cox univariate analysis	Modality P-value \$
			(95% CI)	
ATR Mutation, yes	61 (11)	1.40	(0.40-4.84)	0.60
CBF2 Mutation, yes	77 (18)	0.42	(0.15-1.20)	0.11
BAX Mutation, yes	88 (20)	1.61	(0.64-4.05)	0.32
GRB14 Mutation, yes	82 (19)	1.46	(0.41-5.23)	0.56
MBD4 Mutation, yes	74 (16)	0.93	(0.34-2.57)	0.89
MSH3 Mutation, yes	85 (20)	0.88	(0.33-2.32)	0.79
MSH6 Mutation, yes	81 (19)	1.82	(0.41-7.99)	0.43
RAD50 Mutation, yes	86 (20)	0.79	(0.32-1.94)	0.60
TCF4 Mutation, yes	78 (15)	0.79	(0.22-2.83)	0.72
TFDP2 Mutation, Yes (N=0 for relapse)	78 (16)	26751670,00	(0.00-Inf)	1,00
TGFBR2 Mutation, yes	87 (20)	0.34	(0.04-2.54)	0.29

\$ score logrank test ; HR : Cox hazard ration ; CI : confidence interval of HR.

HT17

TGFB R2

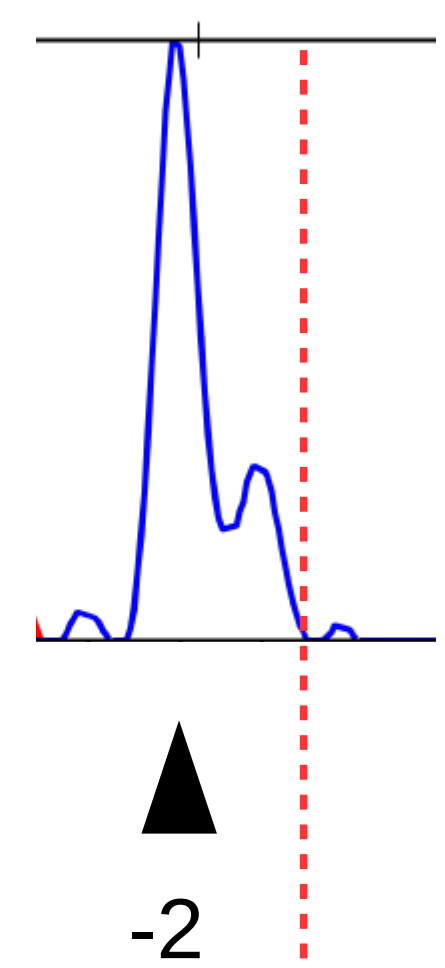
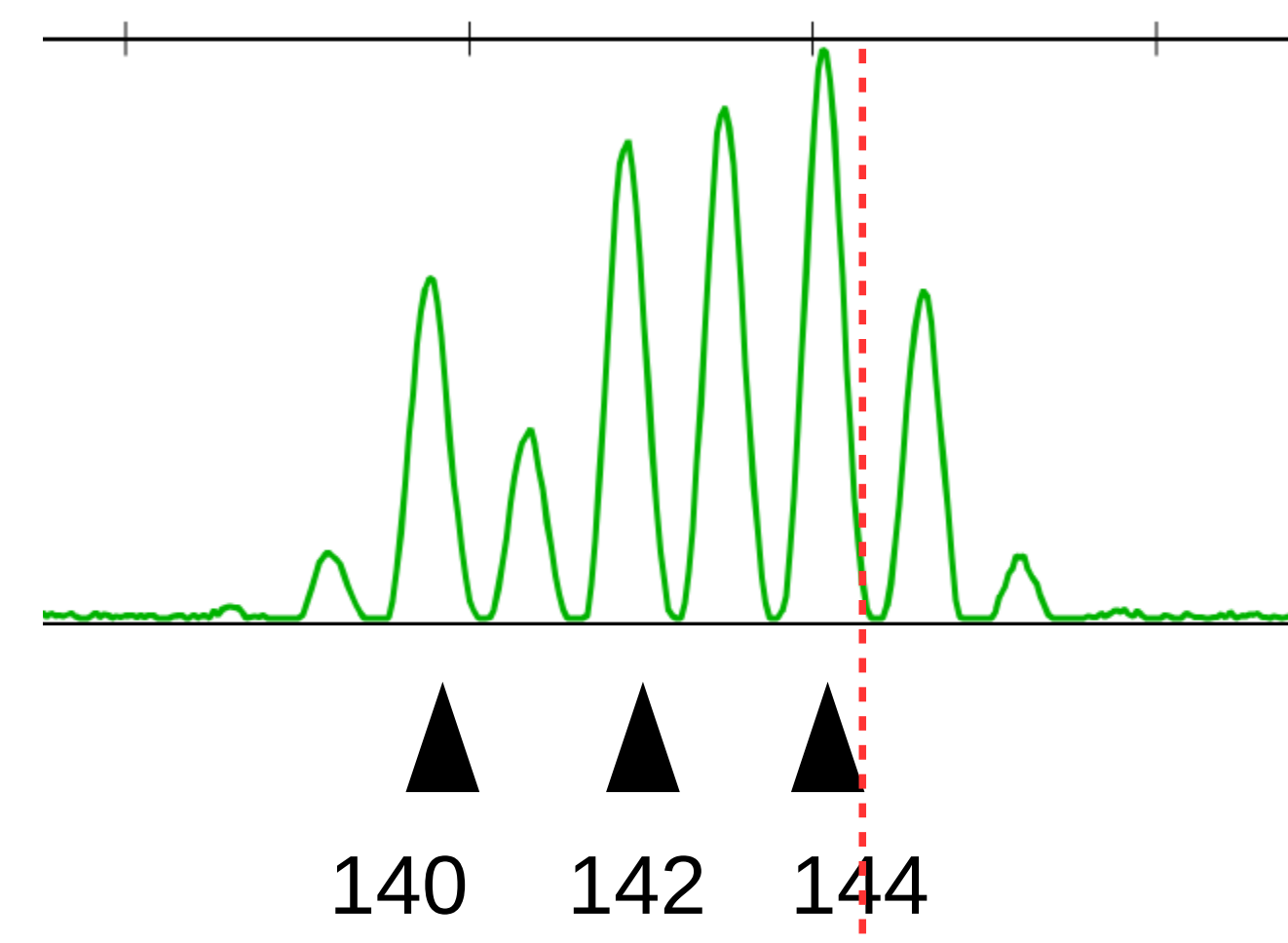
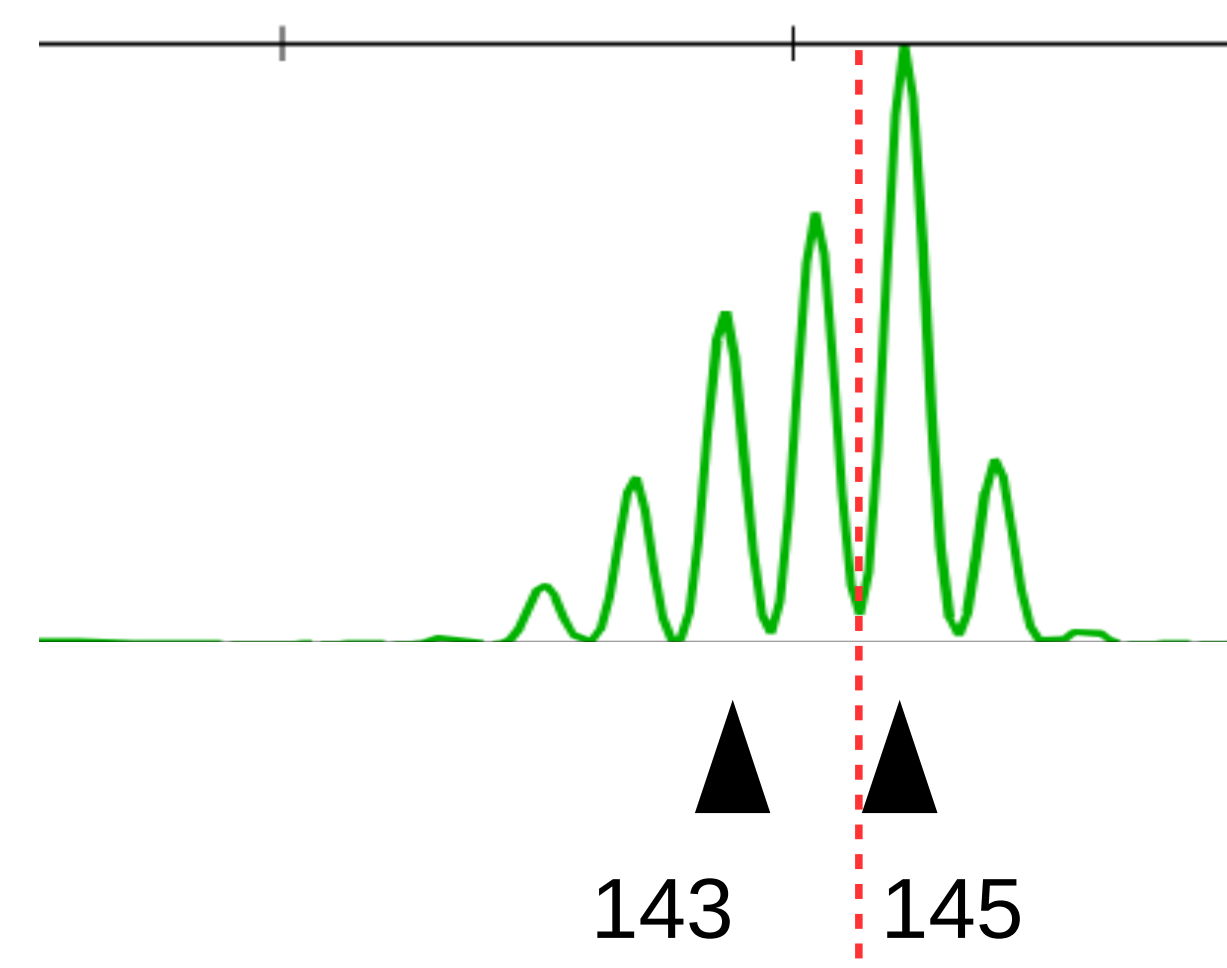
Primary tumor

microdissection

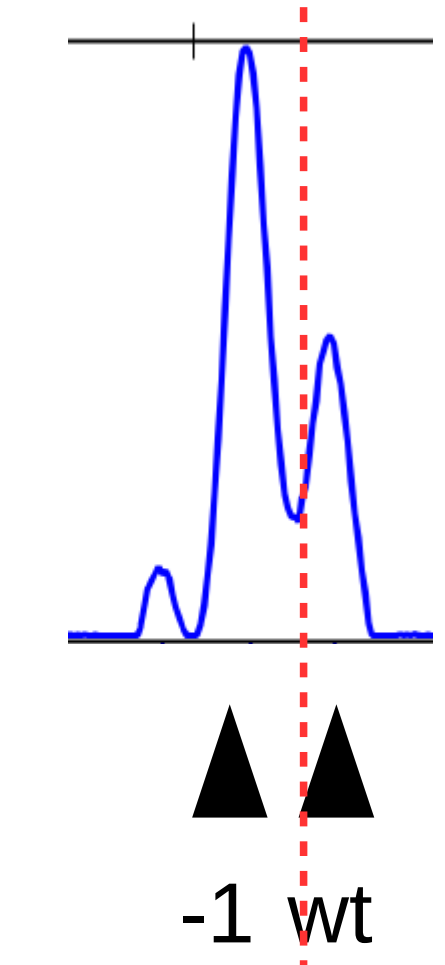
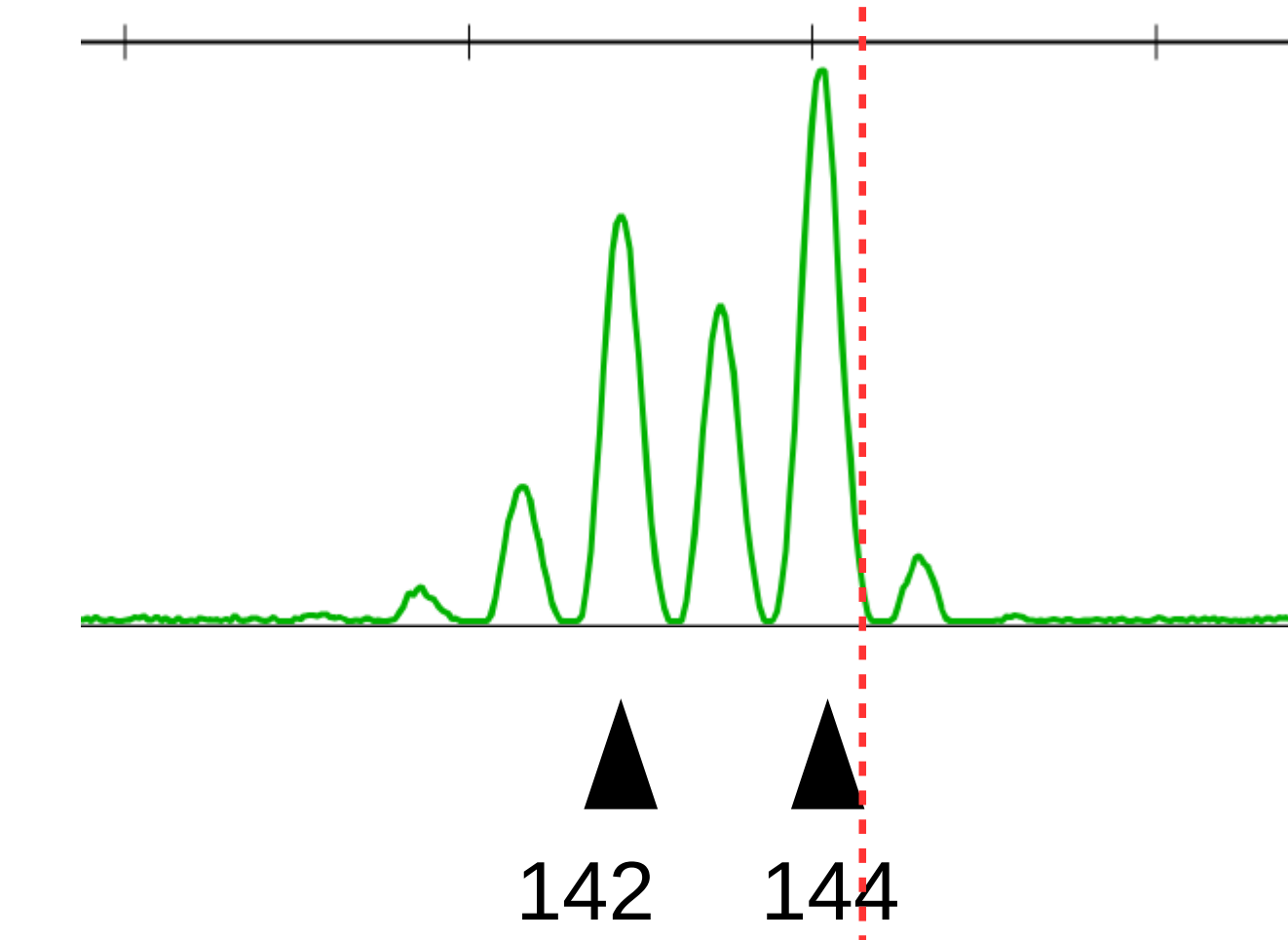
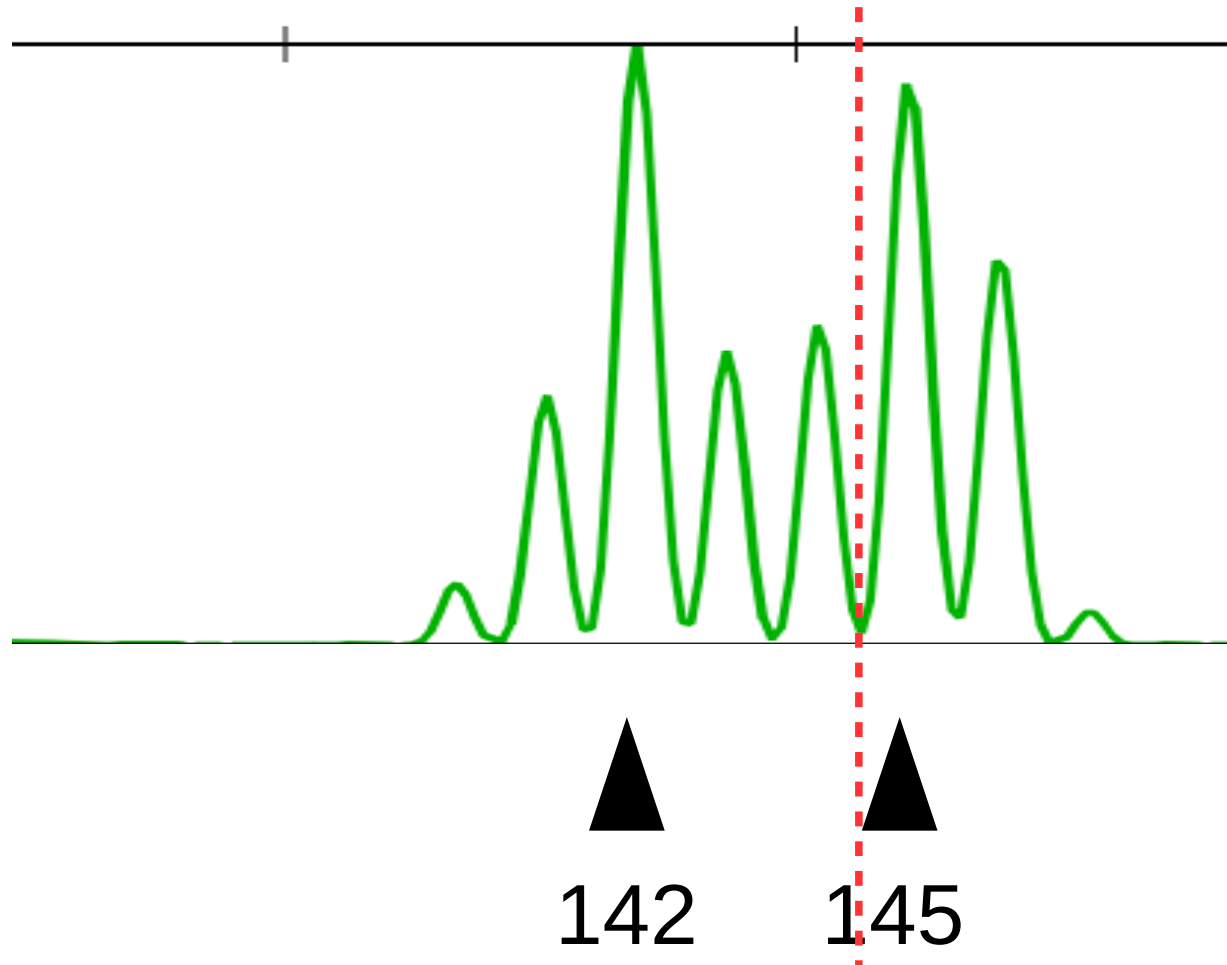
Primary tumor

microdissection

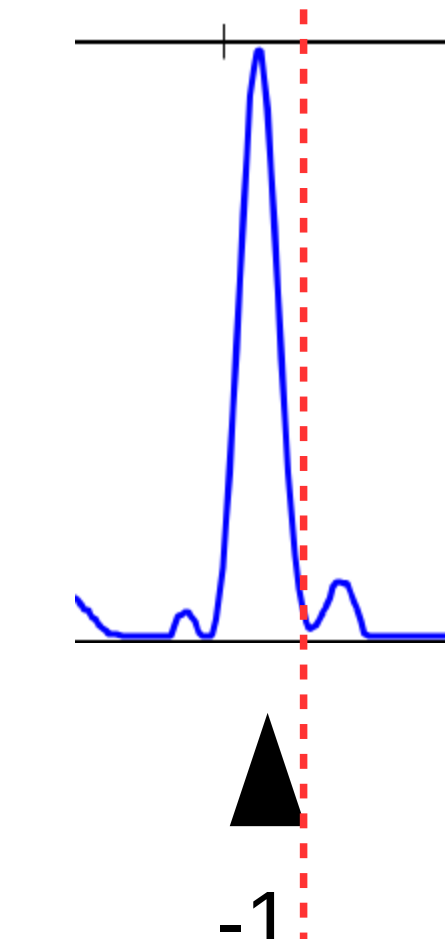
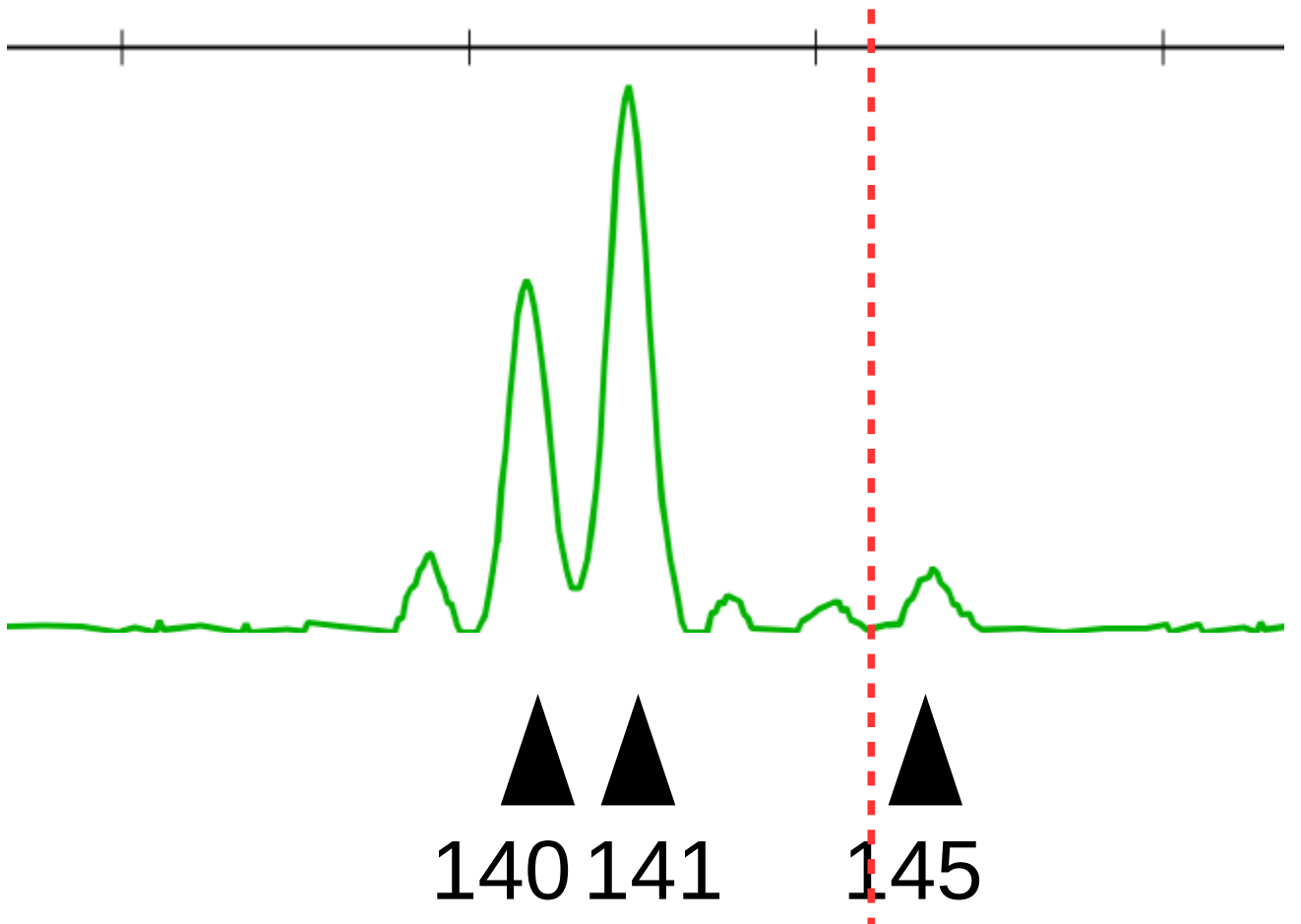
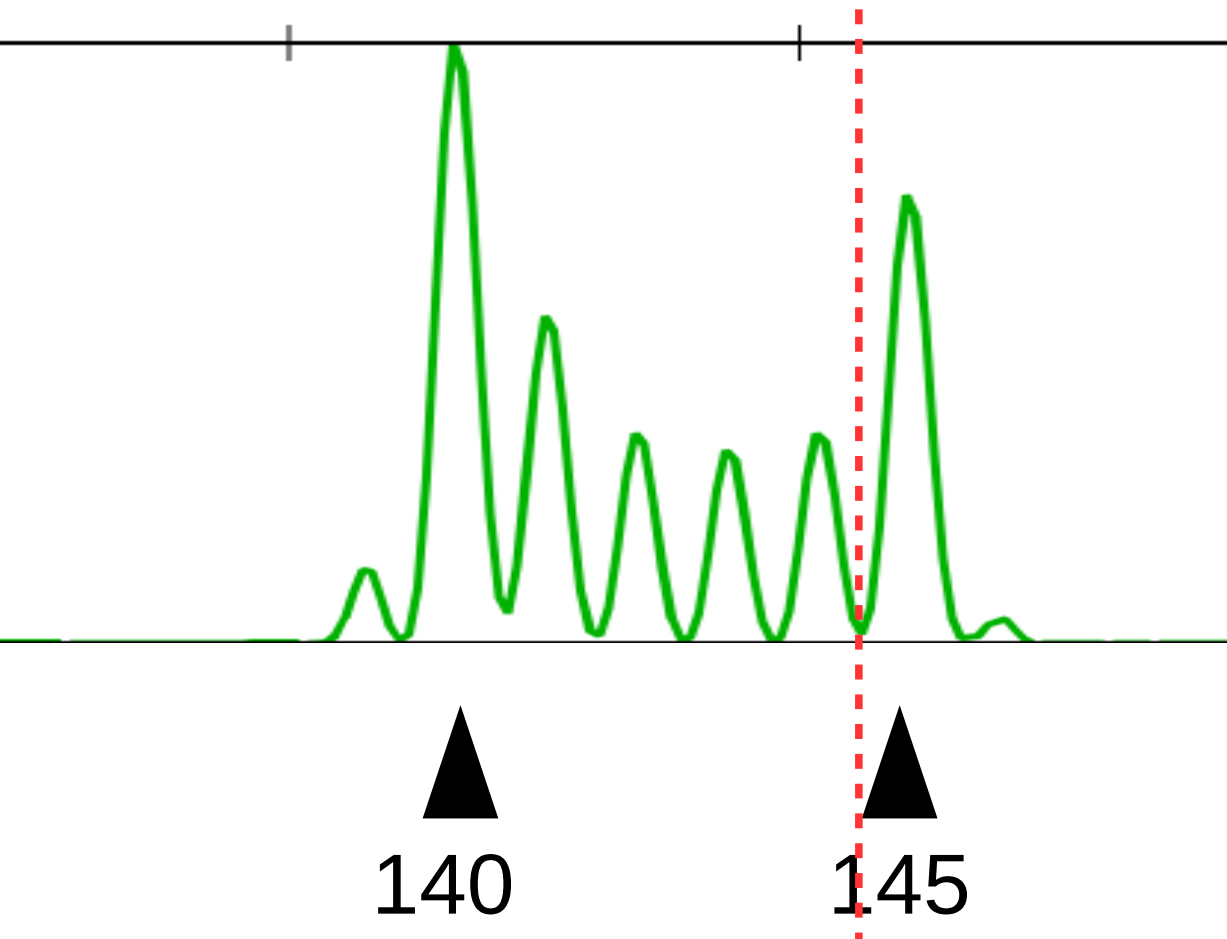
GCSA_20



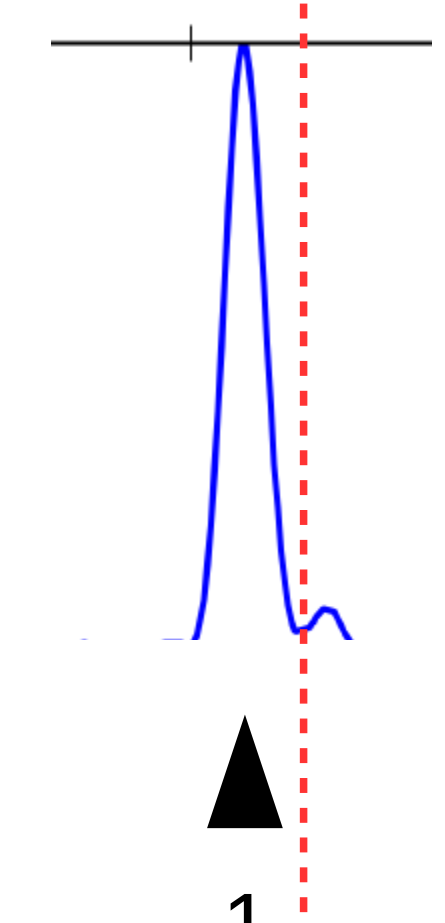
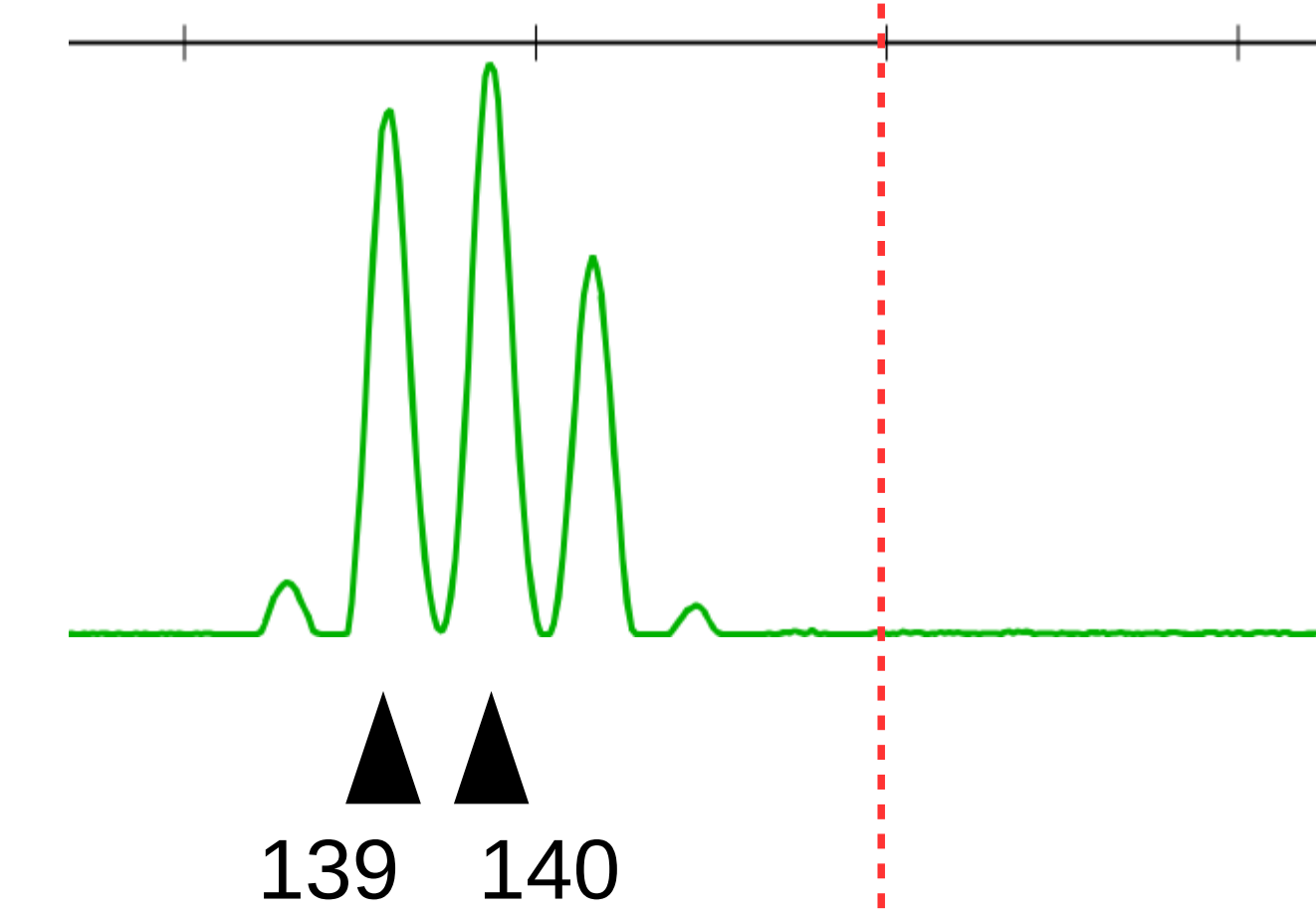
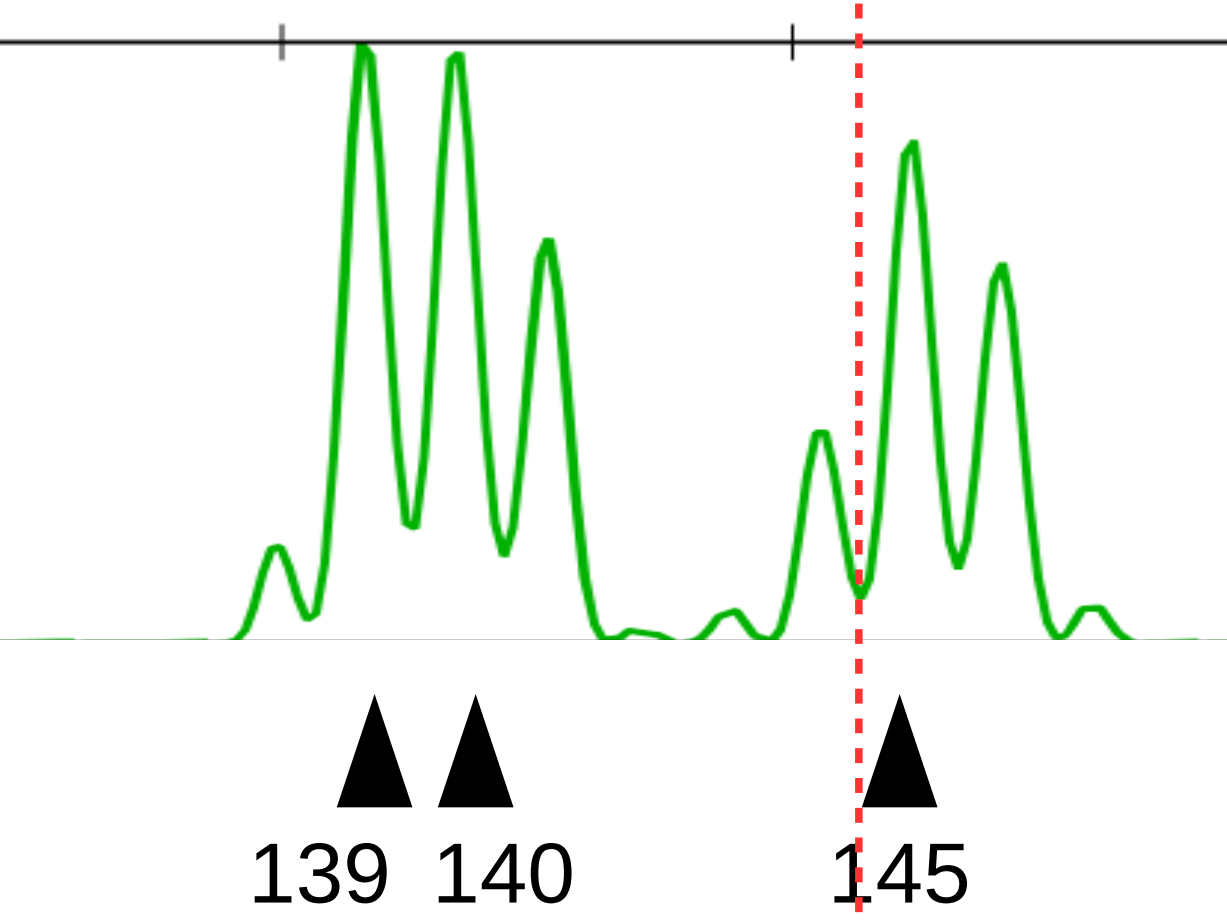
GCSA_28



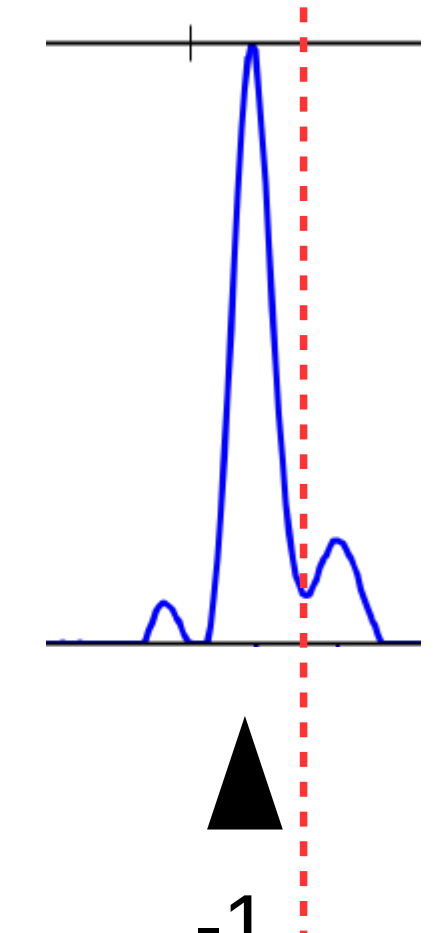
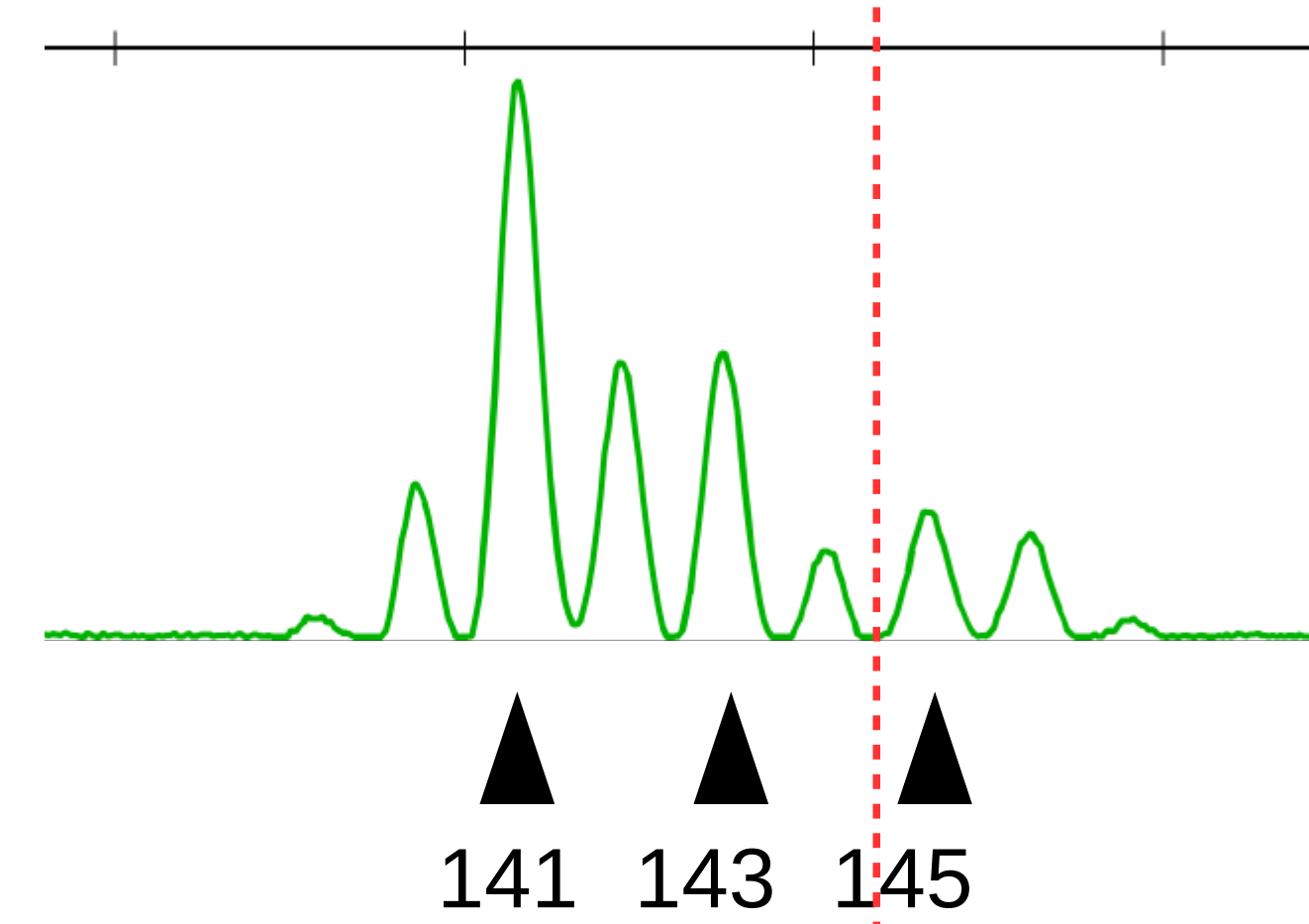
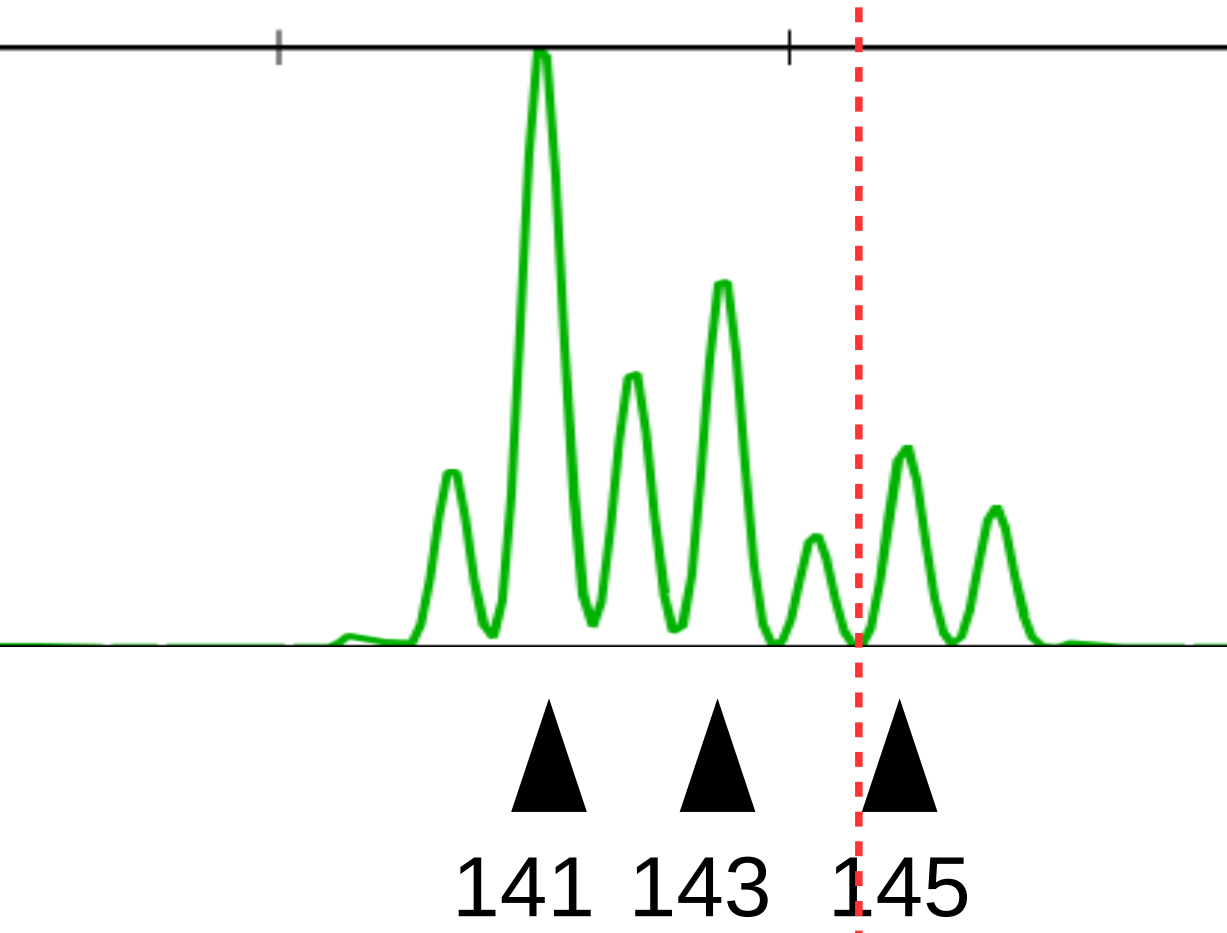
GCSA_30



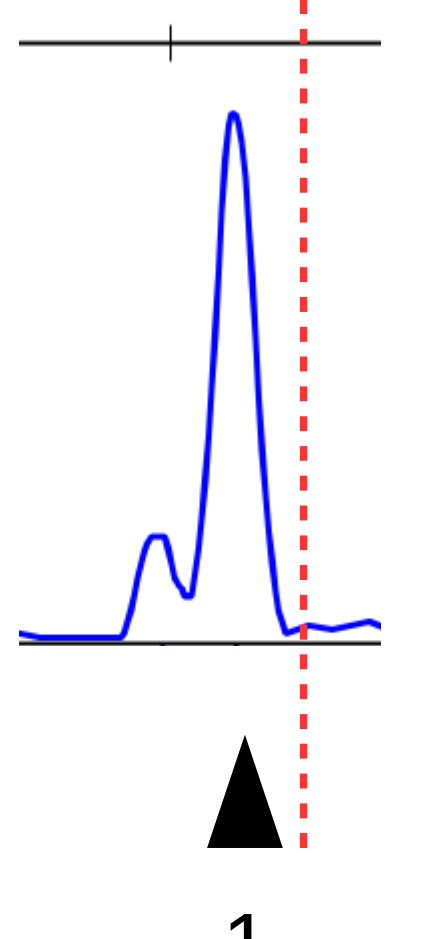
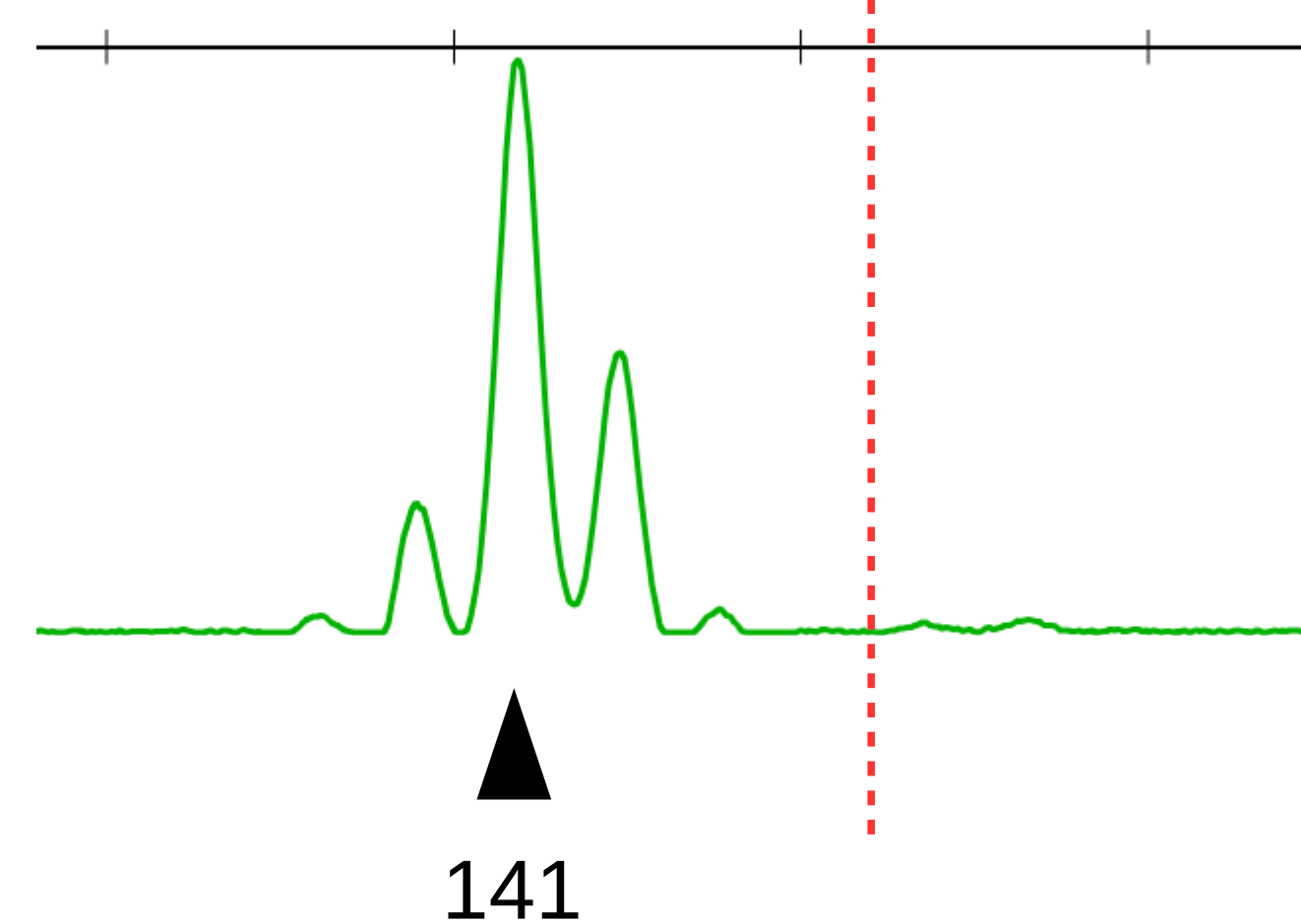
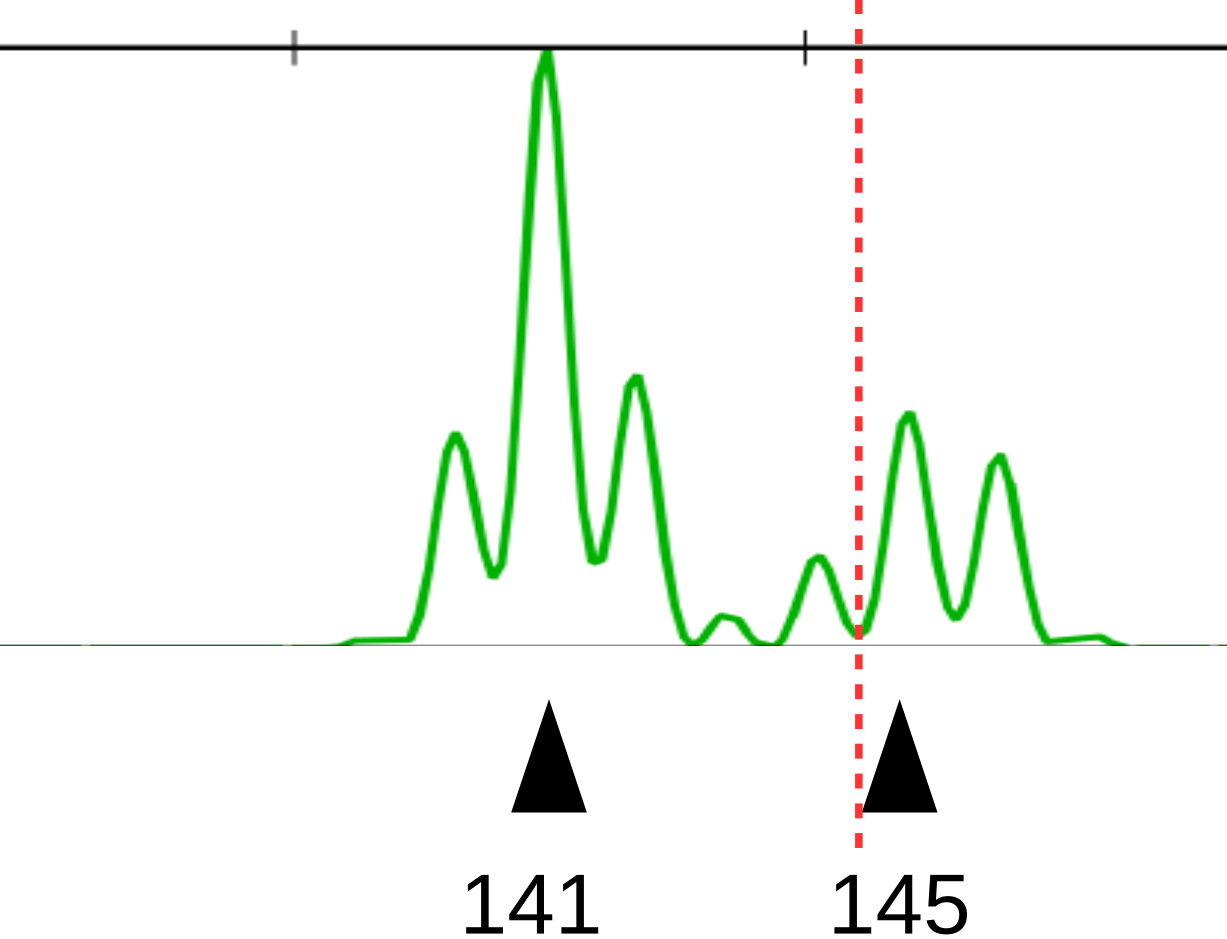
GCSA_25



GCSA_11



GCSA_37



ARTICLE 3

**“Targeting Nonsense-Mediated mRNA Decay is deleterious for MSI
Colorectal Cancer”**

A. Bokhari, A. Lagrange*, V. Jonchère* et al., en cours de rédaction (*co-
premier auteurs)*

Résumé n°3

L'objectif de cette étude, en cours de rédaction et en collaboration avec l'équipe du Dr. Fabrice LEJEUNE (Lille), a été d'évaluer les conséquences de l'inactivation du système NMD dans les cancers colorectaux de type MSI. Ces tumeurs sont définies comme hypermutateurs et caractérisées par un nombre important de mutations non-sens entraînant la production de transcrits mutants contenant un PTC. Nos résultats démontrent que les tumeurs MSI sont caractérisées par la surexpression de nombreux facteurs impliqués dans le NMD, suggérant un effet oncogénique de système. Dans ce travail, nous montrons que l'inhibition du système NMD par ARN interférence ou *via* l'utilisation de molécules inhibitrices de ce système (amlexanox, NMDI-1 et cycloheximide) entraîne une augmentation de l'expression de nombreux transcrits mutants incluant HSP110DE9, ce qui suggère que le NMD protège la cellule tumorale MSI contre de nombreux mutants potentiellement délétères. Par ailleurs, l'administration systémique d'amlexanox, une molécule utilisée en clinique dans le traitement des aphtes et de l'asthme, a pour conséquence une inhibition du NMD *in vivo* et une diminution de la croissance tumorale MSI dans des modèles de xénogreffes sous-cutanée, suggérant que l'inhibition du NMD semble être une piste thérapeutique potentielle dans ce contexte tumoral (Figure 14).

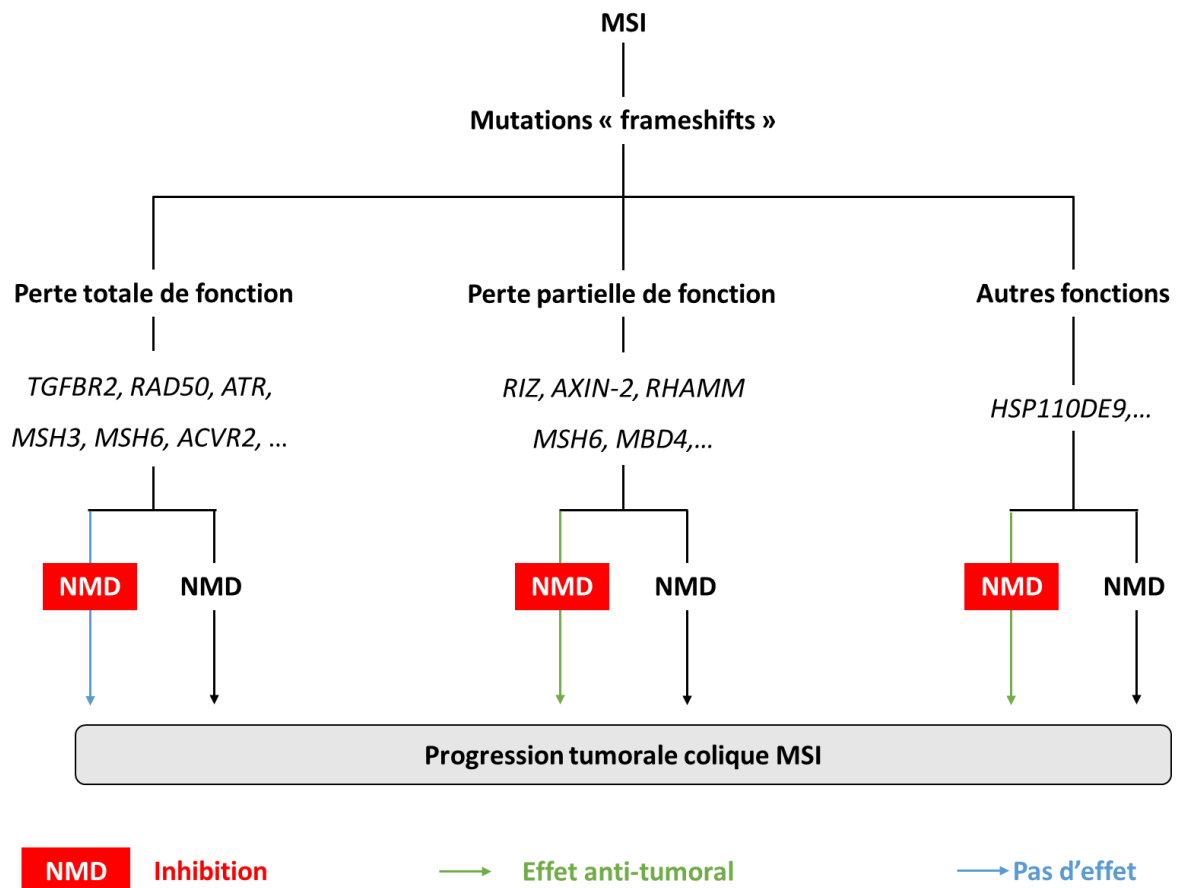


Figure 14 : Modèle d'action du système NMD et de son inhibition dans les cancers MSI.

Les tumeurs coliques dMMR sont caractérisées par la production de nombreux transcrits mutants contenant un PTC. Selon la nature de la mutation (perte totale ou partielle de fonction, ou encore dominant négatif à l'instar d'HSP110DE9), l'inactivation du système NMD semble avoir majoritairement des effets neutres ou anti-tumoraux.

Targeting Nonsense-Mediated mRNA Decay is deleterious for MSI Colorectal Cancer

A'dem Bokhari ¹£, Anaïs Lagrange ¹£, Vincent Jonchere¹£, Magali Svrcek ^{1,2}, Laetitia Marisa ^{1,3}, Olivier Buhard ¹, Malorie Greene ¹, Sylvie Dumont ^{1,2}, Anastasia Demidova ¹, Jieshuang Jia ⁴, Eric Adriaenssens ⁵, Denis S. Biard ⁶, Jean-François Flejou ^{1,2}, Alex Duval ¹, Fabrice Lejeune ^{4,7}, Ada Collura ¹*\$

(1) Sorbonne Université, UPMC Univ Paris 06, INSERM, UMRS 938, Equipe Instabilité des Microsatellites et Cancer, Centre de Recherche Saint Antoine, F-75012 Paris, France

(2) AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Paris, France

(3) Programme "Cartes d'Identité des Tumeurs", Ligue Nationale Contre le Cancer, Paris, France

(4) Institut de Biologie de Lille – UMR CNRS 8161, CS 50447, 59019 Lille, France

(5) Institut Pasteur de Lille – PLEHTA (Plateforme d'expérimentation et de Haute Technologie Animale), 59019 Lille, France

(6) Centre d'Etude Atomique, Direction des Sciences du Vivant, Institut des Maladies Emergentes et des Thérapies Innovantes, Service d'Etude des Prions et des Infections Atypiques, Fontenay-aux-Roses, France.

(7) INSERM U908, Cell plasticity and Cancer, University of Lille 59655 Villeneuve d'Ascq

£ Co-first authors

* These authors co-directed this work and contributed equally to this work

\$ Addresses for Correspondence: Ada Collura

INSERM UMRS 938

Equipe "Instabilité des Microsatellites et Cancer"

F75571 Paris cedex 12

Email: ada.collura@inserm.fr

ABSTRACT

Degradation of mRNAs with a premature termination codon (PTC) partly depends upon NMD (Nonsense-mediated mRNA Decay) activity. To date, the role of this system in cancer remains largely unknown. Here, we analysed the molecular and functional consequences of NMD activity in the subset of colorectal cancer (CRC) that display microsatellite instability (MSI). Compared to MSS (microsatellite stable) CRC, MSI primary tumors showed significant overexpression of key activator of the NMD system, *e.g.* UPF1/2, SMG1/6/7, blocking the expression of dozens of mutant mRNA encoding aberrant proteins with expected residual functional activity and pro- or anti-tumoral impact. Suppression of NMD activity using four tools, *e.g.* UPF1 siRNA, cycloheximide, NMDI-1 and the clinically approved drug amlexanox, led to significant expression of NMD targets including deleterious dominant negative mutant proteins in MSI CRC cell lines, *e.g.* HSP110DE9. The systemic administration of amlexanox allowed efficient blockade of NMD *in vivo*, leading to strong inhibition of MSI but not MSS tumor growth in xenograft models. Overall, our findings indicate that NMD has an oncogenic role during MSI tumorigenesis and its blockade should constitute an attractive strategy for the personalized treatment of MSI CRC patients by favouring the expression of deleterious mutant proteins for tumor cells.

INTRODUCTION

Nonsense-mediated mRNA Decay (NMD) is a post-transcriptional surveillance pathway responsible for the recognition and degradation of mRNAs containing premature termination codon (PTC) during the first round of translation (Popp and Maquat 2013). PTC can be generated by mutations including point mutations, frameshift mutations, and splice-site mutations that induce intron inclusion or exon exclusion and consequently nonsense codon formation. Approximately 30% of genetic disorders, arise from a consequence of a nonsense or frameshift mutation that introduces a PTC (Frischmeyer and Dietz 1999, Keeling and Bedwell 2011). However, there are many cases in which NMD down-regulates mutant proteins with residual activity, for example increasing the defects caused by the original PTC mutation in tumor suppression gene during tumorigenesis (Usuki, Yamashita et al. 2004, Bhuvanagiri, Schlitter et al. 2010). In these cases, NMD suppression can lead to the phenotypic rescue of certain PTC-related mutations (Usuki, Yamashita et al. 2004, Usuki, Yamashita et al. 2006). NMD suppression could also facilitate the production of non-natural polypeptides, putative tumor-specific antigens encoded by frameshift mutations that could act as signals for the immune system (Pastor, Kolonias et al. 2010). NMD may have beneficial or detrimental effects on pathophysiological mechanisms depending on the type of mutation and on the nature of the disease itself. To date, the role of NMD system in cancer remains largely unknown even if studies suggest that in some cases NMD is inhibited in tumors due to elevated expression of *C-MYC* oncogene, a common event in cancers (Wang, Wengrod et al. 2011). A subset of colorectal cancers (CRC) exhibits a so-called hypermutator phenotype that is characterized by widespread instability of DNA repeat sequences (*i.e.* microsatellite instability, MSI) due to mismatch repair (MMR) deficiency (Aaltonen, Peltomaki et al. 1993, Ionov, Peinado et al. 1993, Thibodeau, Bren et al. 1993). Over the past twenty years, many studies on MSI CRCs have reported frameshift truncating mutations, usually loss of function, in coding DNA repeats located within putative tumor suppressor genes (e.g. in *TGFBRII*, *BAX*, *IGFIIR*, *MSH3*, *MSH6*, *RAD50* and others). However, in some cases, other functional consequences have been proposed, depending on the PTC position in the mRNA. It has been suggested, for instance, that some of these mutations have a dominant negative effect (Liu, Dong et al. 2000, Dorard,

de Thonel et al. 2011) or lead to gain of function (Duval, Rolland et al. 2000), suggesting that NMD might play an important role in the selection of target gene mutations with a functional role in MSI-H carcinogenesis (El-Bchiri, Buhard et al. 2005). Little is known about the functional role of NMD in relation to the somatic mutation events found in MSI cancer malignancy (El-Bchiri, Buhard et al. 2005, El-Bchiri, Guilloux et al. 2008). Thus, determining the exact effect of NMD will be critical for the development of pharmacological treatment that could be used as therapies for genetic diseases or cancer.

In the present study, we show that NMD system (Chan, Bhalla et al. 2009) targets many endogenous mutants in MSI cancer that have disparate roles including cancer development. We evaluated an important number of mutations to be partial-loss of function or dominant-negative mutant. One of these mutant is HSP110DE9. This aberrant transcript was reported by our group. Somatic deletions within a T₁₇ intronic microsatellite located in the splice acceptor site of *HSP110* intron 8 in MSI colorectal (CRC) tumors (Dorard, de Thonel et al. 2011) induced exon 9 skipping and PTC formation in exon 10. Strikingly, this frequent *HSP110* mutation was shown to have deleterious effects on normal HSP110 activities such as anti-apoptosis, resistance to anti-cancer drugs and anti-proliferation effect (Dorard, de Thonel et al. 2011, Collura, Lagrange et al. 2014, Berthenet, Bokhari et al. 2016). It is expected that the inhibition of NMD could be deleterious for MSI cancer cells when toxic PTC containing mRNAs are expressed: e.g. deleterious dominant negative mutant, HSP110DE9, or tumor suppressor mutant proteins that have conserved a residual activity (El-Bchiri, Buhard et al. 2005),

We therefore hypothesized that inhibition of NMD activity could be of particular therapeutic interest for MSI tumors. Using amlexanox, an approved drug for therapeutic use in the clinic (Gonzalez-Hilarion, Beghyn et al. 2012) which lacks any evident toxicity (Belenguer-Guallar, Jimenez-Soriano et al. 2014), we were able to block the degradation of mutant mRNAs containing a premature termination codon both *in vitro* (CRC cell lines) and *in vivo* using a transgenic mouse model with a mutant dystrophin transcript. Interestingly, systemic administration of this drug led to the inhibition of MSI, but not

MSS (microsatellite stable) tumor growth in xenograft models. Our results raise the possibility of personalized treatment for MSI colon cancer patients using the clinically approved NMD inhibitor Amlexanox.

RESULTS

The consequence of NMD factors overexpression in MSI primary tumors

NMD related factors expression values for *UPF1*, *UPF2*, *UPF3A*, *UPF3B*, *SMG1*, *SMG2*, *SMG6*, and *SMG7* were determined in primary MSI tumors. We observed that the endogenous expression of *UPF1* was correlated with the tumoral process of primary tumors (from adenoma to carcinoma) (Fig. 1A, left panel). Furthermore, *UPF1* and others NMD factors (*UPF2*, *SMG1*, *SMG6* and *SMG7*) (Fig. 1A, right panel) were more expressed in primary MSI CRC compared to MSS CRC, indicating a putative oncogenic role for NMD activity in MSI tumorigenesis. We also observed that *UPF3A* tends to be down-regulated in MSI primary tumors compare to MSS, coherently with its negative role in NMD [Shum, 2016 #235]. The gene expression profile and the exon sequencing of 47 primary MSI tumors and their paired normal mucosa, showed that coding repeat mutations located before the last exon (NLE), expected to be targeted by NMD, displayed a significant down-regulation compare to genes carrying mutation in the last exon (LE) (Fig. 1B, *** $p < 0.0001$). The down-regulated mutated genes could have conserved a residual activity depending on the microsatellite and the PTC position (Fig. 1C & supplementary Figure S1). Their degradation will have different impact on cancer cell depending on their role and the putative effect of the frameshift alterations. We hypothesized that inhibition of NMD activity could be of particular therapeutic interest for MSI tumors leading to the expression of mutant with anti-oncogenic role as HSP110DE9 dominant-negative mutant.

NMD protects MSI CRC cells displaying *HSP110* T₁₇ deletions from the anti-cancer effect of endogenous mutant *HSP110DE9* during tumor development

We evaluated the expression of *HSP110* wild type and *HSP110DE9* mutant mRNA in MSI and MSS CRC primary tumors and cell lines using quantitative RT-PCR. Although MSI-induced deletions in the *HSP110* T₁₇ repeat lead to the decreased expression of wild type *HSP110* mRNA, we did not detect a concomitant increase of the *HSP110DE9* transcript in primary tumors or in cell lines (Fig. 1D). Using micro-arrays, we then quantified all *HSP110* mRNAs in a large series of primary colon tumors, adenomas and paired normal mucosa, regardless of the presence or absence of exon 9 DNA sequence. This result confirmed that: (i) *HSP110* transcripts were overexpressed in both primary CRCs and adenomas compared to normal mucosa samples; (ii) *HSP110* was expressed at higher levels in MSS compared to MSI primary tumors (Fig. 1E), in line with the loss of expression induced by the mutation.

MSI mRNA mutants are censored by NMD

To study the effect of NMD inhibition on mutants transcripts level, we have designed a plasmid containing the *HSP110DE9* mutation, which is suggested to be targeted by NMD in MSI CRC (Collura, Lagrange et al. 2014). We transfected this NMD reporter gene (Fig. 2A, top panel) in CRC cell line (SW480), which is microsatellite stable. Then, we treated SW480 with four NMD inhibitors : (i) amlexanox, a known inhibitor of NMD (Gonzalez-Hilarion, Beghyn et al. 2012); (ii) a small interfering RNA directed against UPF1 (siUPF1), the key protein for NMD activation ; (iii) the synthetic drug NMDI-1, which can block UPF1 dephosphorylation and maintaining this protein in a non-active state ; and (iv) cycloheximide, a protein synthesis inhibitor. All of these treatments induced a significant expression of exogenous *HSP110DE9* transcript in SW480 colorectal cancer cell line (Fig. 2A, lower panel).

NMD inhibition induced a strong expression of endogenous genes harboring mutations in MSI CRC cell lines

PTC containing mRNA expression values were measured in cells treated with NMD inhibitors using cycloheximide (Fig. 2B), transfected with the UPF1 siRNA (Fig. 2C) or

treated with amlexanox (Fig. 2D). We show that NMD inhibition induced an increase of endogenous mutant mRNA expression, correlated with the mutation state of both alleles, in HCT116 (MSI colon cell line). As expected, endogenous mutant mRNA levels do not change in MSS CRC cell line (SW480) after NMD inhibition.

NMD blockage is responsible to the decreased proliferation rate of MSI CRC cell lines

We next investigated the functional consequence of NMD inhibition on cell proliferation of CRC cell lines. Interestingly, we observed that inhibition of NMD system using UPF1 siRNA leads to a significant decrease in the cell proliferation rate of MSI (HCT116 and RKO) but not MSS CRC cell lines (SW480 and LS513) (Fig. 3A & supplementary Figure S2). Coherently, amlexanox treatment decrease MSI but not MSS proliferation rate (Fig. 3B). These findings suggest that NMD inhibition could be an important new approach for colon cancer therapy particularly in MSI cancer characterized by the accumulation of PTC-mutant transcripts and the putative oncogenic role of NMD in this type of cancer.

Therapeutic inhibition of NMD in MSI colon cancer decreased tumor growth in nude mice model

Amlexanox has been used clinically for decades for the treatment of recurrent aphthous stomatitis. We attempted to inhibit NMD with this drug in a dystrophin transgenic mouse model following systemic administration. Interestingly, amlexanox inhibits NMD *in vivo*, as shown by the significantly higher amount of dystrophin PTC-mRNA in animals exposed to amlexanox compared to those exposed to DMSO (Fig. 4A). To our knowledge, this is the first report that amlexanox is capable of inhibiting NMD *in vivo*.

We next treated nude mice xenografted with HCT116 (MSI) or SW480 (MSS) CRC cell lines with amlexanox (Fig. 4B, upper panel). Treatment with this agent led to a significant inhibition of MSI tumor growth *in vivo* compared to untreated animals receiving mock buffer (Fig. 4B, lower left panel). In contrast, amlexanox had no effect on MSS tumor growth under the same experimental conditions (Fig. 4B, lower right panel).

This result suggest that inhibition of NMD could have therapeutic relevant effect for the treatment of MSI CRC patients.

DISCUSSION

In this work we show that inhibition of NMD activity in MSI cancers appeared to be functionally relevant in both cultured cells and tumor xenografts by adversely affecting cell proliferation and tumor growth. We show that the expression of UPF1 correlate with MSI cancer progression and is overexpressed, as others partners of NMD system, in MSI cancer compare to MSS cancer indicating a putative oncogenic role for NMD activity in MSI tumorigenesis.

The role of NMD in tumors appears to be complex. NMD could have either a beneficial or detrimental effect, depending on the nature of the mutation targeted by NMD and the nature of the disease itself. This two-face nature of NMD has been suggested by several studies investigating the impact of this system in human inherited genetic diseases (Frischmeyer and Dietz 1999) (Holbrook, Neu-Yilik et al. 2004, Wilkinson 2005). It is clear that activating mutations in oncogenes and inactivating mutations in tumor suppressor genes are the hallmarks of human cancer and, as hereditary disorders, cancer is impacted by NMD in distinct ways depending on the targeted mRNA and the location of the PTC. Approximately 5000 human genes, containing mononucleotide repeats (≥ 7 base pairs) located in their coding regions, would be mutated and suggested to be under selective pressure in MSI tumors. Nevertheless, the number of microsatellites in non-coding region that could have functional activity, *e.g.* affecting splicing process and inducing PTC-mRNA as HSP110DE9, is unknown but we estimated this number more important than coding microsatellite (unpublished data from our lab).

Instability of HSP110 T₁₇ microsatellite highlights an unexpected and paradoxical new characteristic of the MSI-driven pathway in colon cancer because of its negative impact on oncogenic process and chemotherapy response. The long non-coding microsatellites

constitute hot spots for mutations in MSI tumors due to MMR deficiency. Because of the large size of microsatellites, we hypothesized that this class of repeats can escape the selection pressure and represent weak spot in MSI tumoral process, when mutations are endowed with a biological anti-cancer activity, as it is the case with HSP110DE9 (Suraweera, Duval et al. 2002). Then, MSI cancer progression would occur between oncogenic and anti-oncogenic mutations, which are suggested to be more important in number. For these reasons NMD role seems to protect this type of cancer (hypermutator phenotype) and its inhibition could be targeted to contrast MSI cancer progression. We proposed a mechanistic model to explain the role of NMD and the effect of its inhibition in MSI tumoral progression (Fig. 5). Further studies are needed to determine the exact role of anti-oncogenic mutations during MSI tumor progression. These mutations might explain some important clinical characteristics of MSI CRC, such as their initial high propensity to arise and proliferate locally, but with subsequently low invasive and metastatic ability.

Several pharmacological agents have been shown to inhibit NMD, including translation inhibitors such as cycloheximide (Carter, Daskow et al. 1995), emetine (Wang, Zavadil et al. 2011), puromycin (Noensie and Dietz 2001), and pateamine A (Dang, Low et al. 2009). However, these drugs are not beneficial for therapeutic use as NMD inhibitors due to their toxicity. Furthermore, kinase inhibitors such as caffeine and wortmannin have been shown to inhibit SMG1 and prevent UPF1 phosphorylation, resulting in partial NMD inhibition (Yamashita, Ohnishi et al. 2001, Usuki, Yamashita et al. 2004). Through a high-throughput drug screen, another NMD inhibitor, called NMDI-1, was recently discovered that also modulates the phosphorylation of UPF1 (Durand, Cougot et al. 2007).

Importantly, the NMD inhibitor amlexanox, that we used here, is already in clinical use for the treatment of recurrent aphthous stomatitis (Ballal and V 2014). It is worth noting that amlexanox was recently reported to inhibit the protein kinases TBK1 and IKK- ϵ in mice (Reilly, Chiang et al. 2013) and may therefore have had effects other than NMD inhibition in the present study. However, we demonstrate here that MSI and not MSS tumor cells were sensitive to this drug suggesting the anti-cancer effect of

deleterious mutant mRNA expression in MSI CRC cells under amlexanox treatment. As said above, these transcripts should include the *HSP110DE9* transcript but also dozens of MSI-driven target gene mutants in MSI CRC cells, making MSI cancers particularly adapted to the treatment with this NMD inhibitor. Moreover, amlexanox caused significant and specific inhibition of MSI tumor growth *in vivo*, while lacking any evident toxicity in mouse models and in patients treated for aphthous ulcers (Belenguer-Guallar, Jimenez-Soriano et al. 2014). Thus, amlexanox offers a potentially new form of personalized therapy for patients with MSI cancer.

In summary, this study has demonstrated a paradoxical anti-cancer effect of MSI tumoral process, counter-regulated by the NMD system. Otherwise, the systemic administration of amlexanox, a clinically approved drug known as a NMD inhibitor, led to efficient blockade of NMD *in vivo* and allowed the inhibition of MSI tumor growth in a mouse model. The mechanisms through which these effects are observed are likely to involve an important number of genes and have to be further investigated. Regardless, this study raises the possibility of personalized treatment for MSI colon cancer patients in the clinic using an NMD inhibitor.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Barry Iacopetta for critical reading of the manuscript. All authors declare no conflict of interest. Funding: This work was supported by grants from the Institut National du Cancer (INCa). A.D.'s group has the label 'La Ligue Contre le Cancer'.

REFERENCES

- Aaltonen, L. A., P. Peltomaki, F. S. Leach, P. Sistonen, L. Pylkkanen, J. P. Mecklin, H. Jarvinen, S. M. Powell, J. Jen, S. R. Hamilton and et al. (1993). "Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer." Science **260**(5109): 812-816.
- Ballal, V. and J. V (2014). "Oral medicine: Amlexanox." Br Dent J **217**(5): 208.
- Belenguer-Guallar, I., Y. Jimenez-Soriano and A. Claramunt-Lozano (2014). "Treatment of recurrent aphthous stomatitis. A literature review." J Clin Exp Dent **6**(2): e168-174.

Bokhari A, Lagrange A, Jonchere V, et *al*.

Berthenet, K., A. Bokhari, A. Lagrange, G. Marcion, C. Boudesco, S. Causse, A. De Thonel, M. Svrcek, A. R. Goloudina, S. Dumont, A. Hammann, D. S. Biard, O. N. Demidov, R. Seigneuric, A. Duval, A. Collura, G. Jegou and C. Garrido (2016). "HSP110 promotes colorectal cancer growth through STAT3 activation." Oncogene.

Bhuvanagiri, M., A. M. Schlitter, M. W. Hentze and A. E. Kulozik (2010). "NMD: RNA biology meets human genetic medicine." Biochem J **430**(3): 365-377.

Buhard, O., F. Cattaneo, Y. F. Wong, S. F. Yim, E. Friedman, J. F. Flejou, A. Duval and R. Hamelin (2006). "Multipopulation analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability status of human tumors." J Clin Oncol **24**(2): 241-251.

Carter, M. S., J. Doskow, P. Morris, S. Li, R. P. Nhim, S. Sandstedt and M. F. Wilkinson (1995). "A regulatory mechanism that detects premature nonsense codons in T-cell receptor transcripts in vivo is reversed by protein synthesis inhibitors in vitro." J Biol Chem **270**(48): 28995-29003.

Chan, W. K., A. D. Bhalla, H. Le Hir, L. S. Nguyen, L. Huang, J. Gecz and M. F. Wilkinson (2009). "A UPF3-mediated regulatory switch that maintains RNA surveillance." Nat Struct Mol Biol **16**(7): 747-753.

Collura, A., A. Lagrange, M. Svrcek, L. Marisa, O. Buhard, A. Guilloux, K. Wanherdrick, C. Dorard, A. Taieb, A. Saget, M. Loh, R. Soong, N. Zeps, C. Platell, A. Mews, B. Iacopetta, A. De Thonel, R. Seigneuric, G. Marcion, C. Chapusot, C. Lepage, A. M. Bouvier, M. P. Gaub, G. Milano, J. Selves, P. Senet, P. Delarue, H. Arzouk, C. Lacoste, A. Coquelle, L. Bengrine-Lefevre, C. Tournigand, J. H. Lefevre, Y. Parc, D. S. Biard, J. F. Flejou, C. Garrido and A. Duval (2014). "Patients with colorectal tumors with microsatellite instability and large deletions in HSP110 T17 have improved response to 5-fluorouracil-based chemotherapy." Gastroenterology **146**(2): 401-411 e401.

Dang, Y., W. K. Low, J. Xu, N. H. Gehring, H. C. Dietz, D. Romo and J. O. Liu (2009). "Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay by the natural product pateamine A through eukaryotic initiation factor 4AIII." J Biol Chem **284**(35): 23613-23621.

Dorard, C., A. de Thonel, A. Collura, L. Marisa, M. Svrcek, A. Lagrange, G. Jegou, K. Wanherdrick, A. L. Joly, O. Buhard, J. Gobbo, V. Penard-Lacronique, H. Zouali, E. Tubacher, S. Kirzin, J. Selves, G. Milano, M. C. Etienne-Grimaldi, L. Bengrine-Lefevre,

Bokhari A, Lagrange A, Jonchere V, et *al.*

C. Louvet, C. Tournigand, J. H. Lefevre, Y. Parc, E. Tiret, J. F. Flejou, M. P. Gaub, C. Garrido and A. Duval (2011). "Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis." Nat Med **17**: 1283-1289.

Dorard, C., A. de Thonel, A. Collura, L. Marisa, M. Svrcek, A. Lagrange, G. Jegu, K. Wanherdrick, A. L. Joly, O. Buhard, J. Gobbo, V. Penard-Lacronique, H. Zouali, E. Tubacher, S. Kirzin, J. Selves, G. Milano, M. C. Etienne-Grimaldi, L. Bengrine-Lefevre, C. Louvet, C. Tournigand, J. H. Lefevre, Y. Parc, E. Tiret, J. F. Flejou, M. P. Gaub, C. Garrido and A. Duval (2011). "Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis." Nat Med **17**(10): 1283-1289.

Durand, S., N. Cougot, F. Mahuteau-Betzer, C. H. Nguyen, D. S. Grierson, E. Bertrand, J. Tazi and F. Lejeune (2007). "Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay (NMD) by a new chemical molecule reveals the dynamic of NMD factors in P-bodies." J Cell Biol **178**(7): 1145-1160.

Duval, A. and R. Hamelin (2002). "Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability." Cancer Res **62**(9): 2447-2454.

Duval, A., S. Rolland, E. Tubacher, H. Bui, G. Thomas and R. Hamelin (2000). "The human T-cell transcription factor-4 gene: structure, extensive characterization of alternative splicings, and mutational analysis in colorectal cancer cell lines." Cancer Res **60**(14): 3872-3879.

El-Bchiri, J., O. Buhard, V. Penard-Lacronique, G. Thomas, R. Hamelin and A. Duval (2005). "Differential nonsense mediated decay of mutated mRNAs in mismatch repair deficient colorectal cancers." Hum Mol Genet **14**(16): 2435-2442.

El-Bchiri, J., A. Guilloux, P. Dartigues, E. Loire, D. Mercier, O. Buhard, I. Sobhani, P. de la Grange, D. Auboeuf, F. Praz, J. F. Flejou and A. Duval (2008). "Nonsense-mediated mRNA decay impacts MSI-driven carcinogenesis and anti-tumor immunity in colorectal cancers." PLoS One **3**(7): e2583.

Frischmeyer, P. A. and H. C. Dietz (1999). "Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease." Hum Mol Genet **8**(10): 1893-1900.

Bokhari A, Lagrange A, Jonchere V, et *al.*

Gonzalez-Hilarion, S., T. Beghyn, J. Jia, N. Debreuck, G. Berte, K. Mamchaoui, V. Mouly, D. C. Gruenert, B. Deprez and F. Lejeune (2012). "Rescue of nonsense mutations by amlexanox in human cells." Orphanet J Rare Dis **7**: 58.

Hamelin, R., A. Chalastanis, C. Colas, J. El Bchiri, D. Mercier, A. S. Schreurs, V. Simon, M. Svrcek, A. Zaanani, C. Borie, O. Buhard, E. Capel, H. Zouali, F. Praz, M. Muleris, J. F. Flejou and A. Duval (2008). "[Clinical and molecular consequences of microsatellite instability in human cancers]." Bull Cancer **95**(1): 121-132.

Holbrook, J. A., G. Neu-Yilik, M. W. Hentze and A. E. Kulozik (2004). "Nonsense-mediated decay approaches the clinic." Nat Genet **36**(8): 801-808.

Ionov, Y., M. A. Peinado, S. Malkhosyan, D. Shibata and M. Perucho (1993). "Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis." Nature **363**(6429): 558-561.

Keeling, K. M. and D. M. Bedwell (2011). "Suppression of nonsense mutations as a therapeutic approach to treat genetic diseases." Wiley Interdiscip Rev RNA **2**(6): 837-852.

Leach, F. S., N. C. Nicolaides, N. Papadopoulos, B. Liu, J. Jen, R. Parsons, P. Peltomaki, P. Sistonen, L. A. Aaltonen, M. Nystrom-Lahti and et al. (1993). "Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer." Cell **75**(6): 1215-1225.

Liu, W., X. Dong, M. Mai, R. S. Seelan, K. Taniguchi, K. K. Krishnadath, K. C. Halling, J. M. Cunningham, L. A. Boardman, C. Qian, E. Christensen, S. S. Schmidt, P. C. Roche, D. I. Smith and S. N. Thibodeau (2000). "Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling." Nat Genet **26**(2): 146-147.

Marisa, L., A. de Reynies, A. Duval, J. Selves, M. P. Gaub, L. Vescovo, M. C. Etienne-Grimaldi, R. Schiappa, D. Guenot, M. Ayadi, S. Kirzin, M. Chazal, J. F. Flejou, D. Benchimol, A. Berger, A. Lagarde, E. Pencreach, F. Piard, D. Elias, Y. Parc, S. Olschwang, G. Milano, P. Laurent-Puig and V. Boige (2013). "Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value." PLoS Med **10**(5): e1001453.

Noensie, E. N. and H. C. Dietz (2001). "A strategy for disease gene identification through nonsense-mediated mRNA decay inhibition." Nat Biotechnol **19**(5): 434-439.

Bokhari A, Lagrange A, Jonchere V, et *al.*

Pastor, F., D. Kolonias, P. H. Giangrande and E. Gilboa (2010). "Induction of tumour immunity by targeted inhibition of nonsense-mediated mRNA decay." Nature **465**(7295): 227-230.

Peccarelli, M. and B. W. Kebaara (2014). "Regulation of natural mRNAs by the nonsense-mediated mRNA decay pathway." Eukaryot Cell **13**(9): 1126-1135.

Popp, M. W. and L. E. Maquat (2013). "Organizing principles of mammalian nonsense-mediated mRNA decay." Annu Rev Genet **47**: 139-165.

Reilly, S. M., S. H. Chiang, S. J. Decker, L. Chang, M. Uhm, M. J. Larsen, J. R. Rubin, J. Mowers, N. M. White, I. Hochberg, M. Downes, R. T. Yu, C. Liddle, R. M. Evans, D. Oh, P. Li, J. M. Olefsky and A. R. Saltiel (2013). "An inhibitor of the protein kinases TBK1 and IKK-varepsilon improves obesity-related metabolic dysfunctions in mice." Nat Med **19**(3): 313-321.

Suraweera, N., A. Duval, M. Reperant, C. Vaury, D. Furlan, K. Leroy, R. Seruca, B. Iacopetta and R. Hamelin (2002). "Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR." Gastroenterology **123**(6): 1804-1811.

Thibodeau, S. N., G. Bren and D. Schaid (1993). "Microsatellite instability in cancer of the proximal colon." Science **260**(5109): 816-819.

Usuki, F., A. Yamashita, I. Higuchi, T. Ohnishi, T. Shiraishi, M. Osame and S. Ohno (2004). "Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay rescues the phenotype in Ullrich's disease." Ann Neurol **55**(5): 740-744.

Usuki, F., A. Yamashita, I. Kashima, I. Higuchi, M. Osame and S. Ohno (2006). "Specific inhibition of nonsense-mediated mRNA decay components, SMG-1 or Upf1, rescues the phenotype of Ullrich disease fibroblasts." Mol Ther **14**(3): 351-360.

Wang, D., J. Wengrod and L. B. Gardner (2011). "Overexpression of the c-myc oncogene inhibits nonsense-mediated RNA decay in B lymphocytes." J Biol Chem **286**(46): 40038-40043.

Wang, D., J. Zavadil, L. Martin, F. Parisi, E. Friedman, D. Levy, H. Harding, D. Ron and L. B. Gardner (2011). "Inhibition of nonsense-mediated RNA decay by the tumor microenvironment promotes tumorigenesis." Mol Cell Biol **31**(17): 3670-3680.

Wilkinson, M. F. (2005). "A new function for nonsense-mediated mRNA-decay factors." Trends Genet **21**(3): 143-148.

Yamashita, A., T. Ohnishi, I. Kashima, Y. Taya and S. Ohno (2001). "Human SMG-1, a novel phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase, associates with components of the mRNA surveillance complex and is involved in the regulation of nonsense-mediated mRNA decay." Genes Dev **15**(17): 2215-2228.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: (A) Microarray analysis of UPF1 expression in normal or tumor MSI/MSS tissues (left panel: [normal mucosa], n=95; [adenoma], n=32; [MSS primary CRC], n=48; [MSI primary CRC], n=40) and other NMD-related factors (right panel). Data are means $\pm$ SEM. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. (B) Microarray analysis associated with Exome sequencing data of 47 MSI tumors to compare the expression of genes with mutation in microsatellite located in last exon (LE; n=98) or before the last exon (NLE; n=569). *** $p < 0.0001$. (C) Representative examples of schematic structure of mutant proteins from 6 mutated genes with NLE mutations and significantly down regulated in MSI tumors. Position of microsatellite (red square); neo-antigenic sequence (grey square); truncated part of the mutated protein (striped square) (D) upper panel: relative expression levels of HSP110wt and HSP110DE9 mRNAs by quantitative RT-PCR in MSS and MSI CRC primary tumors. No Del (MSS CRCs), n=36; DelS (MSI CRCs), n=28; DelL (MSI CRCs), n=7. lower panel: relative mRNA expression levels of HSP110wt and HSP110DE9 determined by quantitative RT-PCR in MSS and MSI CRC cell lines. No T17 deletion [No Del], n=6 CRC cell lines (ISI, SW1116, V9P, ALA, FET, SW480); small T17 Deletion [DelS], n=4 CRC cell lines (HCT8, HCT116, TC71, LIM1215); large T17 Deletion [DelL], n=6 CRC cell lines (TC7, Lovo, KM12, LS411, Ls174T, Co115). Data are means $\pm$ SEM. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. (E) Quantification study of all HSP110 mRNAs. Densities and bar plots of HSP110 log2 intensities in normal colonic mucosa (Muc), adenomas (Ade), MSS tumors (MSS) and MSI tumors (MSI).

Figure 2: (A) Upper panel: schematic representation of the HSP110DE9 specific NMD reporter system used in this work. The NMD reporter gene consisted of an in-frame HSP110 construction contains the cDNA sequence from exon 1 to exon 8, the intron 9, the exon 10, the intron 16 and the exon 18. As in the case of the T₁₇ mutation of HSP110 located near the splice acceptor site of intron 8, a nonsense mutation appear in exon 10 due to the frameshift mutation because of the skipping of exon 9, making the exogenous mRNA a NMD target. This construction is placed in an EBV stable vector. Lower panel: Relative expression of HSP110DE9-PTC mRNA from NMD reporter stably transfected in SW480 CRC cell line treated with several NMD inhibitors (siUPF1, cycloheximide (CHX), amlexanox and NMDI-1). (B) Relative expression levels of *TGFBR2*, *MSH3* or *HSP110DE9* mRNAs determined by quantitative RT-PCR in CRC cell lines. After cycloheximide [CHX] treatment (4h, 400µg/ml). RNA expression from cell lines were analysed with *TGFBR2* probe, [No Del] (SW480 and FET), Heterozygote [Htz] (HCT8 and RKO), Homozygote [Hmz] (HCT116 and LS174T); with *MSH3* probe, [No Del] (SW480 and HCT8), Heterozygote [Htz] = (LS174T), Homozygote [Hmz] (HCT116); with *HSP110DE9* probes, [No Del] (SW480 and FET); [Del^S] (HCT116 and HCT8); [Del^L] (RKO and LS174T). Data are means ± SEM. * p < 0.05; ** p < 0.01. (C) Relative mRNA expression levels of MSI target genes (containing coding DNA repeats) determined by quantitative RT-PCR in HCT116 (MSI) and SW480 (MSS) CRC cell lines transfected with siUPF1 (24h post-transfection) (D) or treated 24h with 5 µM amlexanox. *IGF2R* is used as an intern control (not mutated in HCT116 and SW480 CRC cell line) for experimental conditions.

Figure 3: (A) Cell proliferation of HCT116 (MSI) and SW480 (MSS) colon cancer cells were analysed with XCelligence. Twenty-four hours post-transfection with a control (siCTL) or siRNA against UPF1 (siUPF1), cells were seeded in E-plate 96 to allow the measurement of the proliferation rates during 48H. Data are means ± SEM, *** p < 0.001. (B) HCT116 (MSI) and SW480 (MSS) CRC cancer cells were treated once a day during 4 days with or without 5 µM amlexanox. OD was measured every day after drug treatment using the WST-1 assay. Data are means ± SEM, * p < 0.05.

Figure 4: (A) MDX mice harboring a nonsense mutation in exon 23 of the dystrophin gene were injected subcutaneously with 1.2 mg of amlexanox/kg for 24h. The results for 3 mice injected with DMSO or 3 mice injected with amlexanox are shown. The 3 left lanes represent a serial dilution of RT from an untreated wild-type mouse. Data are means $\pm$ SEM. * $p < 0.1$. (B) Upper panel: schematic representation of the protocol for treating mice with the NMD inhibitor amlexanox. The osmotic pump contained either a mock buffer made with 50% DMSO and 50% PEG400, or amlexanox diluted in the mock buffer in order to deliver 0.15mg of amlexanox per day to each mouse during 28 days. Lower panel: comparative analysis of tumor growth (mean tumor volumes) in mice treated with or without amlexanox. Eight mice per group. Experiments were performed with MSI (HCT116) and MSS (SW480) CRC cells (left and right panels respectively). Data are means $\pm$ SEM. * $p < 0.05$.

Figure 5: Schematic representation of the role of NMD in MSI tumors and the expected therapeutic benefit of NMD blockade in this tumor model. Numerous MSI-driven mutant PTC-mRNAs processed by NMD are generated due to frameshift truncating mutations in coding DNA microsatellites in MMR-deficient colon tumors. These mutations usually result in loss of function effects and they inactivate tumor suppressor genes (e.g. *TGFBR2*, *BAX*...). Although the corresponding mutant PTC containing mRNAs are degraded by NMD or not is of poor functional significance when the corresponding mutant proteins have totally lost their function and therefore do not have residual biological activity. In contrast, it is expected that inhibiting NMD could be deleterious for MSI cancer cells when mutant mRNAs encode for (i) tumor suppressor mutant proteins that have conserved a residual activity (partial loss of function is notably expected when the truncation occurs downstream of important functional domains of the protein); (ii) dominant negative mutant proteins like HSP110DE9.

SUPPLEMENTARY FIGURES LEGENDS

S1: Representative examples of schematic structure of mutant proteins from 79 mutated genes with NLE (not last exon) mutations and significantly down regulated in MSI

Bokhari A, Lagrange A, Jonchere V, et *al.*

tumors. Position of microsatellite (red square); neo-antigenic sequence (grey square); localisation of active sites (blue square)

S2: Inhibition of UPF1 in MSI (HCT116, RKO) and MSS (SW480, LS513) colon cancer cell lines by RNA interference. Suppression of UPF1 mRNA is measured by quantitative RT-PCR 24h (0H) and 72H (48H) post-transfection compared to non-silencing scrambled control siRNA-transfected cells (siCTL). 18S is used as the reference gene. Data are means $\pm$ SEM. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

MATERIALS AND METHODS

CRC cell lines and primary colon tumor samples

CRC cell lines were purchased from the American Type Culture Collection. All cell lines were cultured in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum, and antibiotics. All cell lines were mycoplasma free. Primary tumors and normal colonic tissues were obtained from patients undergoing surgery in our hospital (Hôpital Saint-Antoine, Paris, France). MSI status was determined as described previously (Buhard, Cattaneo et al. 2006).

***HSP110* T17 deletion analysis and Real-Time quantitative RT-PCR analysis**

DNA was extracted using the QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen). T17 deletion status was determined as previously described (Dorard, de Thonel et al. 2011). Total RNA was extracted with an RNeasy Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. RNA integrity was evaluated on a 2100 Bioanalyzer using the RNA 6000 Nano LabChip kit (Agilent) for all primary tumor samples. Only samples with RIN > 5 were used. Complementary DNAs were synthesized using the High Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems). For quantitative RT-PCR, we used the Applied SDS Biosystems analysis software. Expression values of *HSP110wt* and *HSP110DE9* transcripts were calculated relative to RPLP0 ubiquitous RNA, and expression values for *TGFBR2*, *MSH3*, *BAX*, *IGF2R* and *GAPDH* were calculated relatively to 18S ubiquitous

Bokhari A, Lagrange A, Jonchere V, et *al.*

RNA. Primers and internal probes for *HSP110wt* and *HSP110DE9* were as described earlier (Dorard, de Thonel et al. 2011). Primers and internal probes for *TGFBR2*, *MSH3*, *BAX*, *IGF2R*, *GAPDH*, *18S* and *RPLP0* were those proposed by Applied Biosystems (TaqMan gene expression assays). The thermal cycling conditions comprised an initial denaturation step at 95°C for 10 min and 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min.

Cycloheximide and amlexanox treatment *in vitro*

Cells seeded into 6-well culture plates (2×10^5 cells per well) in DMEM media supplemented with 10% FCS containing 10 U.ml⁻¹ penicillin G and 100 µg.ml⁻¹ streptomycin were treated with cycloheximide (400 µg.ml⁻¹, Sigma-Aldrich) for 4h or with amlexanox (5micromolar, Sequoia Research Products) for 24H prior to cell harvest and RNA extraction using RNeasy Mini Kit (Qiagen®).

Transfection with siRNA

The HCT116 CRC cell line was seeded into 6-well culture plates (1×10^5 cells per well) and transiently transfected with 50 nM of siRNA directed against UPF1 or with non-specific siRNA (Thermo Fisher) using the Dharmafect reagent (Thermo Fisher) according to manufacturer's instructions. A siRNA directed against GAPDH (Thermo Fisher) was used as a transfection control. Cells were collected for total RNA extraction 48h post-transfection. Each transfection experiment was performed in triplicate.

Cell Proliferation

Proliferation rates were assessed in culture using WST-1 (SIGMA®). 2×10^4 cells were plated per well in 24-well plates in 2mL of media. For amlexanox treatment, cells were treated once daily for a 4 days period with different concentrations of amlexanox (5 or 25 µM). WST-1 reagent was added and incubated for 4H at 37°C at each time point of the

Bokhari A, Lagrange A, Jonchere V, et *al.*

proliferation test. The absorbance was measured at 450nm and the reference wavelength was 750nm.

Proliferation rates were assessed using XCelligence (OZYME® and ACEA Biosciences®). After transfection with siUPF1, cells were plated in E-plate 96, which differs from standard 96-well plates with its incorporated gold cell sensor arrays in the bottom. The electronic impedance of sensor electrodes is measured to allow monitoring and detection of physiological changes of the cells on the electrodes.

Measurement of *Dystrophin* mRNA levels by RT-PCR

Oligonucleotide sequences used for GAPDH: 5'-CATTGACCTCACTACATGG-3' and 5'-GCCATGCCAGTGAGCTTCC-3'; for dystrophin 5'-TG GTGGGAAGAAGTAGAGGACTG-3' and 5'-GCAGTGCCTTGTTGACATTGTT CAG-3'.

Measurement of HSP110 and NMD factor mRNA expression by transcriptome microarray

A large series of 40 MSI tumors, 48 MSS tumors and 42 normal colonic mucosa were screened for mRNA expression using Affymetrix U133Plus chips as previously described (Marisa, de Reynies et al. 2013) (data partly in GSE33582 data set). Additional adenoma and mucosa samples were added from GSE8671 and GSE4183 data sets. Data were normalized together by Robust Multi-array Average normalization (R package affy). Associations with annotations were assessed by ANOVA or t-test (R package stats). Differential expression of NMD factors between tumor types were assessed by moderated t-test and FDR multiple testing correction (R package limma).

***In vivo* effect of amlexanox**

Xenograft experiment: five weeks old female nude mice (Charles River Laboratories) were injected with 10^7 cells (SW480 or HCT116 CRC cell lines) subcutaneously in the right back side. Around 5 days later, when the tumor reached 4mm, an osmotic pump

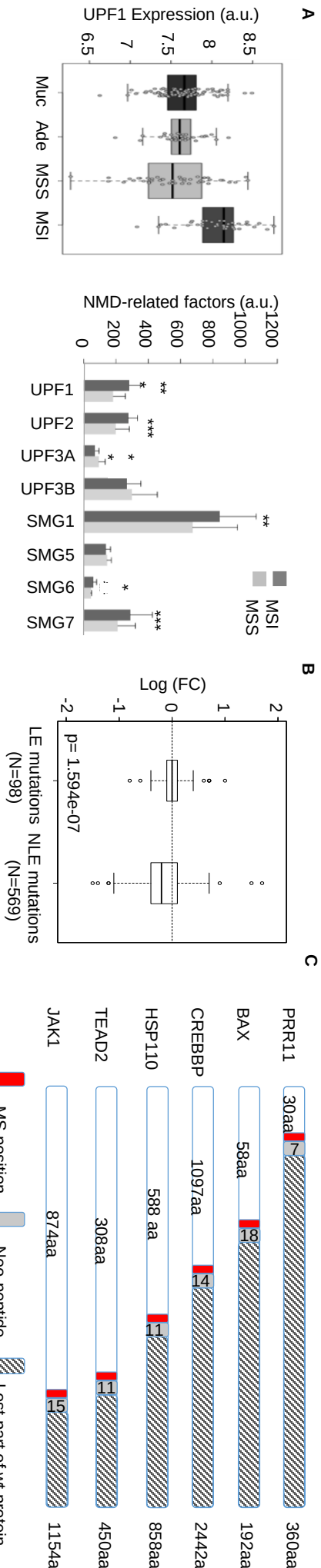
Bokhari A, Lagrange A, Jonchere V, et *al.*

was introduced under the skin of each animal at the left back side. Osmotic pumps contained either a mock buffer made of 50% DMSO and 50% PEG400, or mock buffer with amlexanox. Tumor size was measured 3 times per week during 30 days.

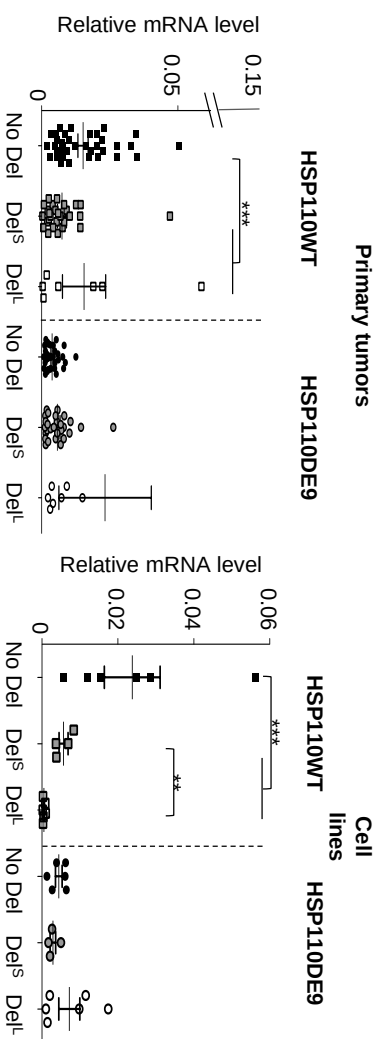
Duchenne muscular dystrophy mouse model (MDX): MDX mice harbouring a nonsense mutation in exon 23 of the dystrophin gene were injected subcutaneously with 1.2mg of amlexanox/kg for 24H prior to collection of back leg muscles, extraction of RNA and performing quantitative RT-PCR.

HSP110DE9-NMD Assays

The HSP110DE9-based NMD reporters were constructed cloning in EVB plasmid a DNA insert contains the sequence from exon 1 to exon 8, intron 8, exon 10, intron 16, exon 18 of HSP110 CDNA under the control of the HSP110 promoter. HCT116 and SW480 cells were transfected with HSP110DE9 specific NMD-reporter using lipofectamine (Invitrogen). Twenty four hours after transfection, cells were incubated with 5 μ M of amlexanox. Twenty four hours later, cells were harvested for analysis of RNA expression.



D



E

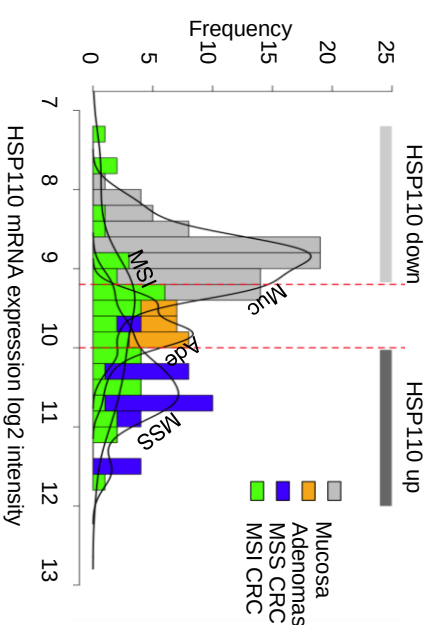
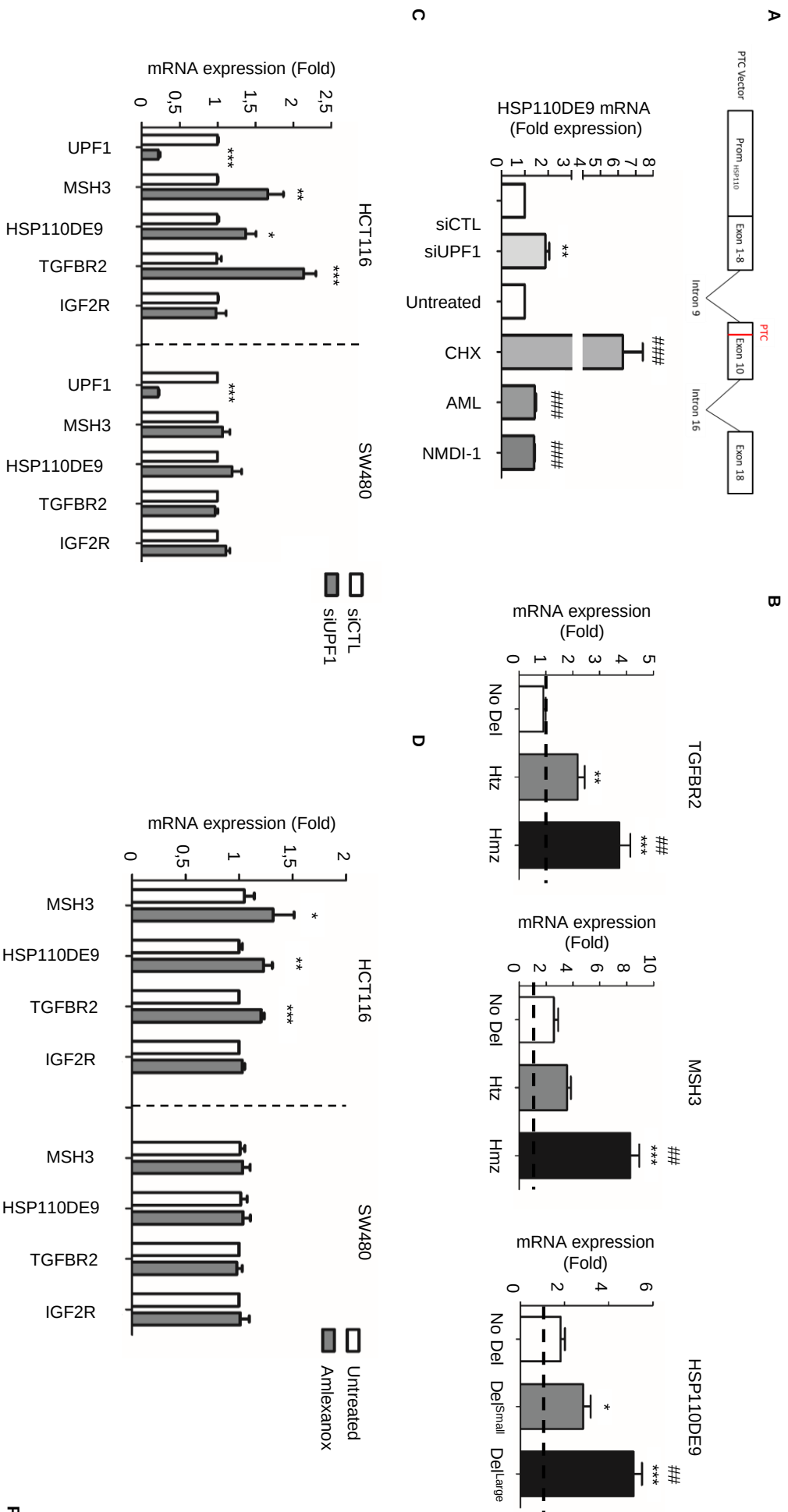
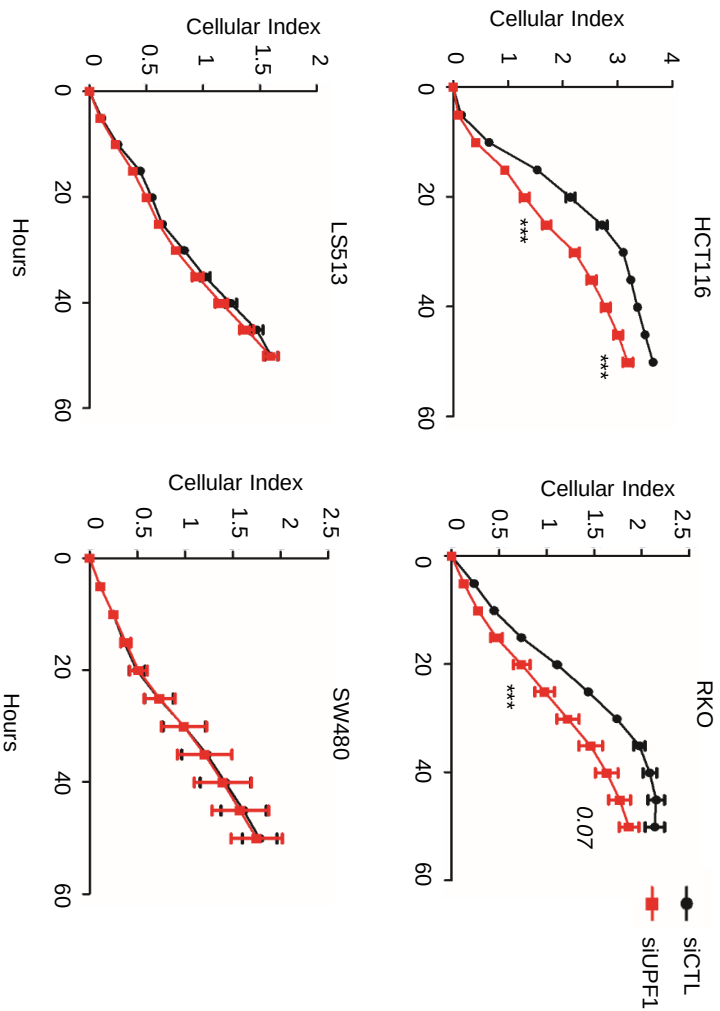


Figure 1



A



B

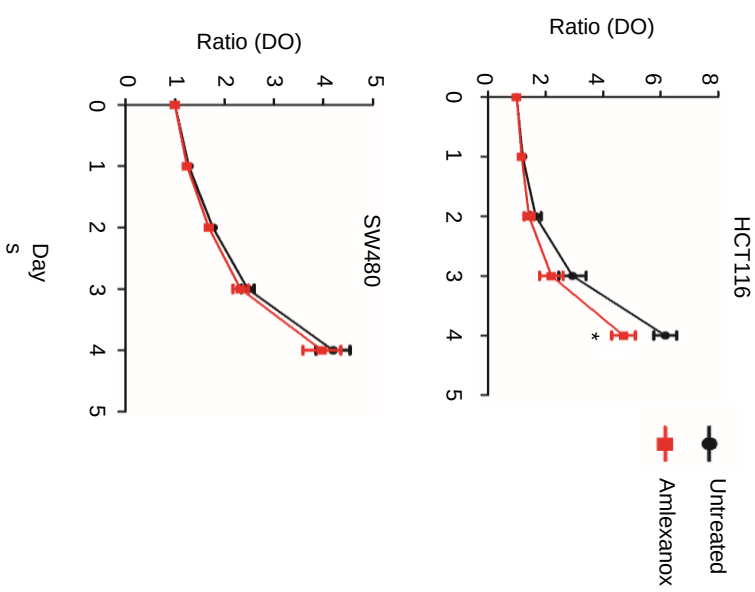


Figure 3

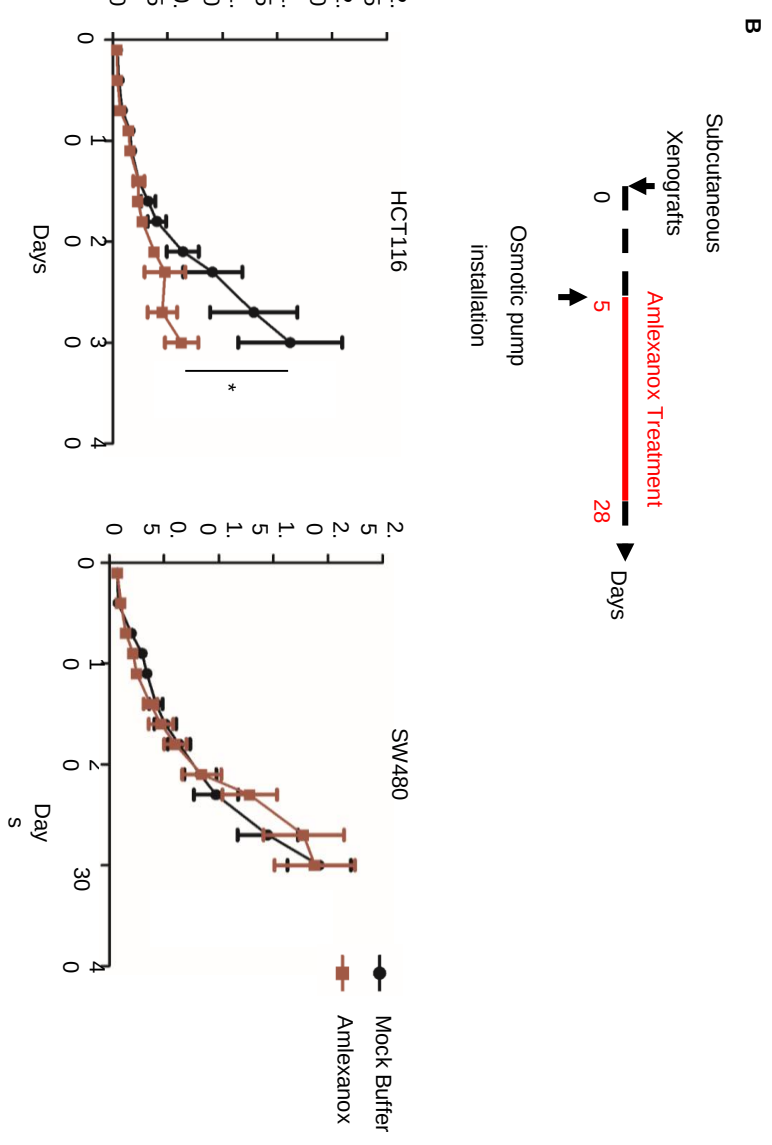
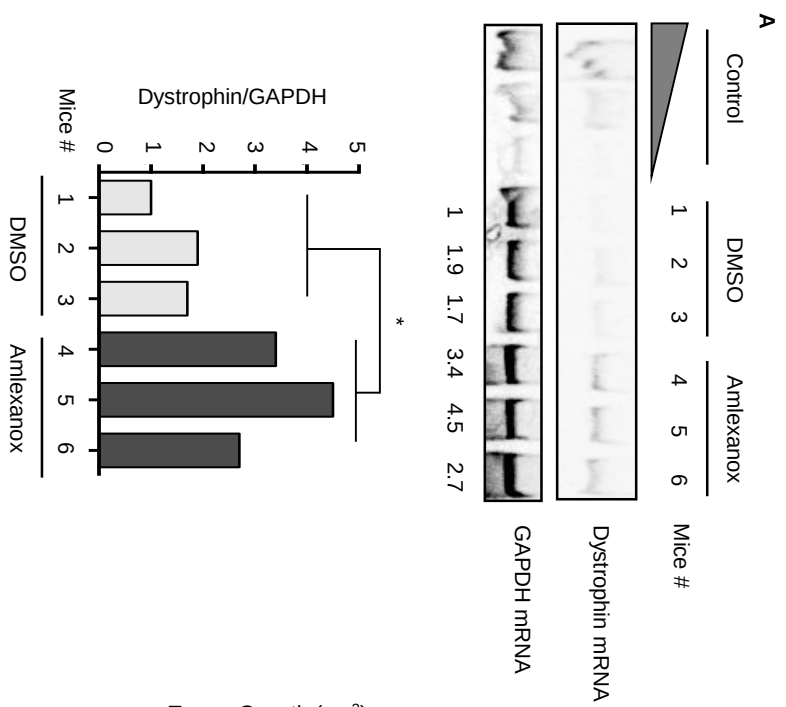


Figure 4

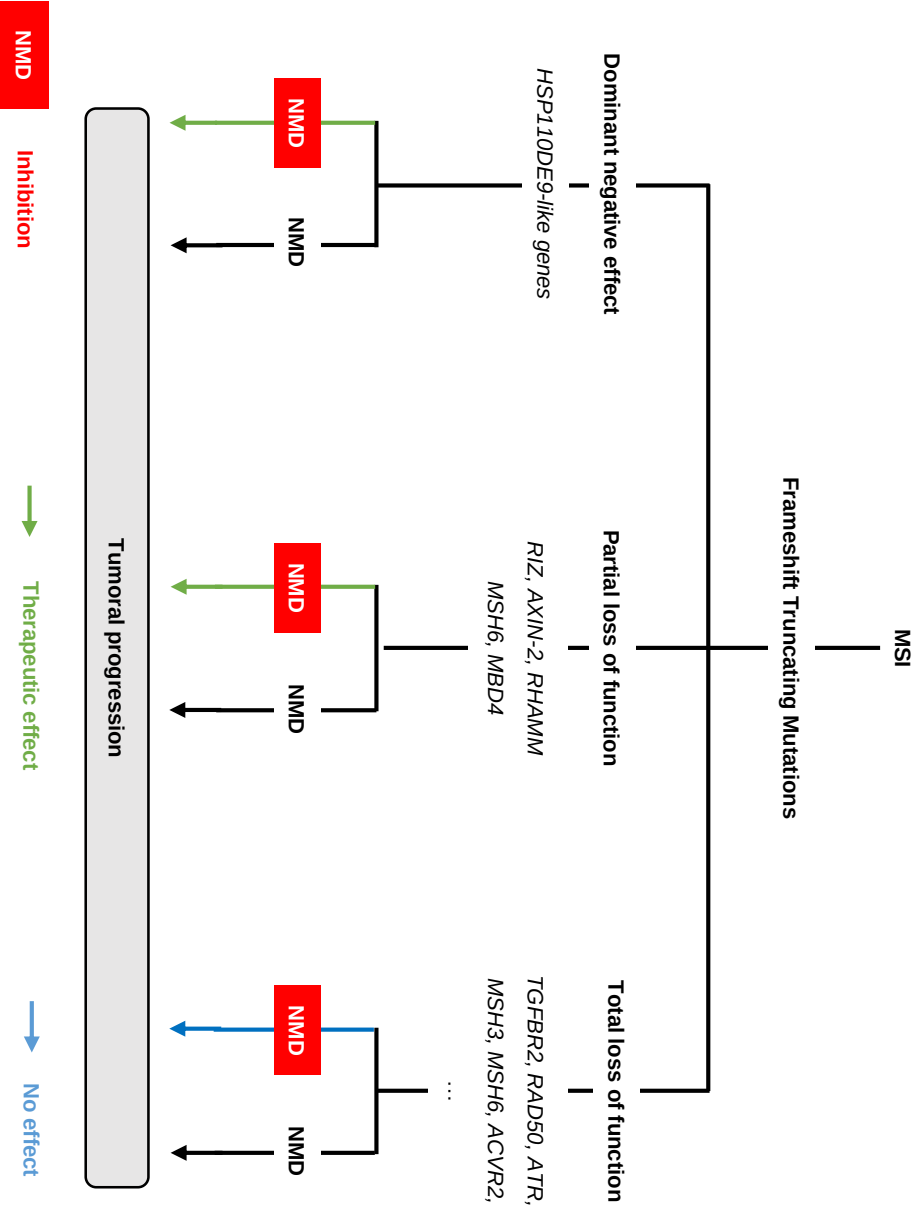
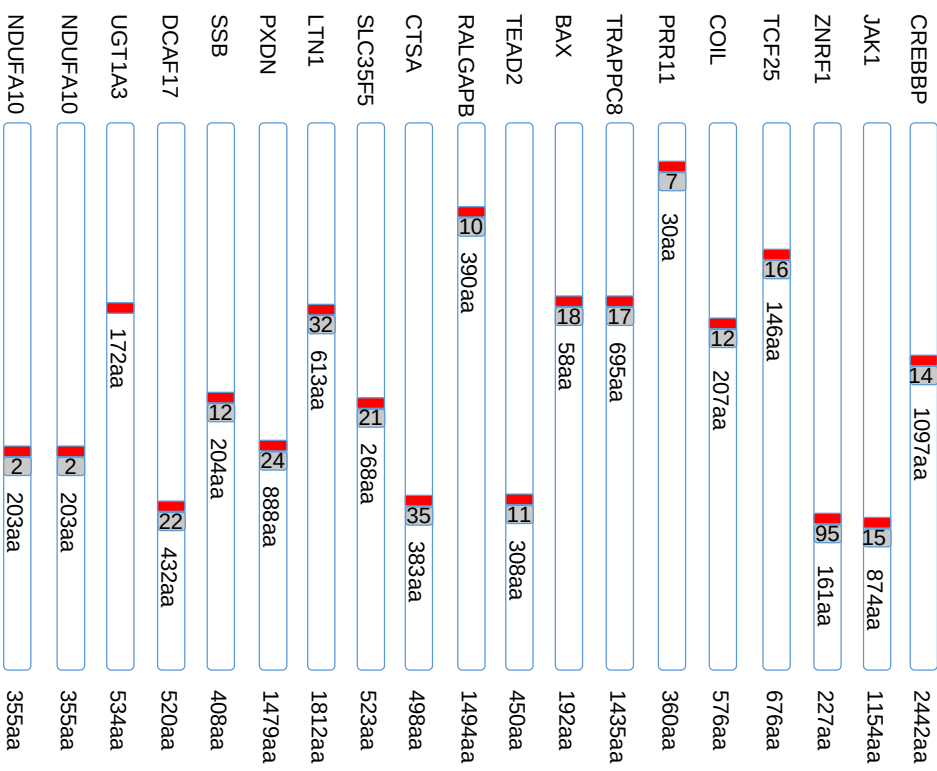
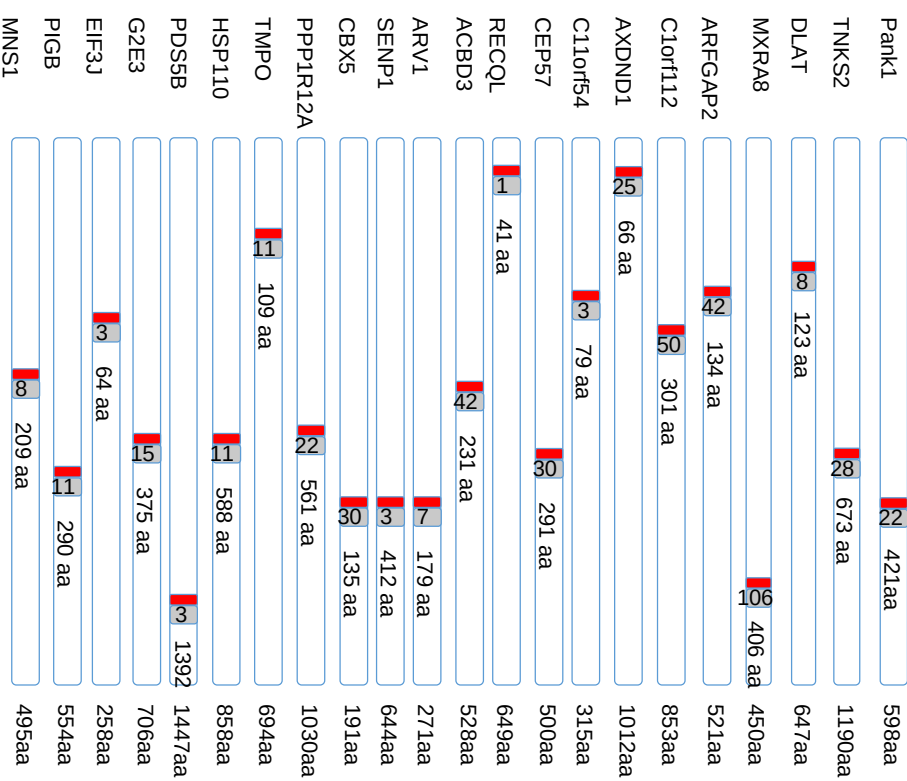
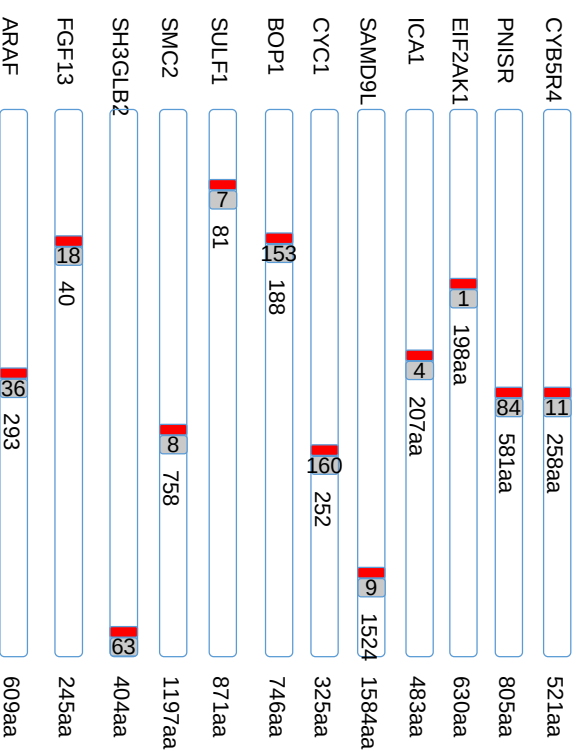


Figure 5



MS position
Neo peptide

Supplementary Figure 1



MS position

Neo peptide

Supplementary Figure 1

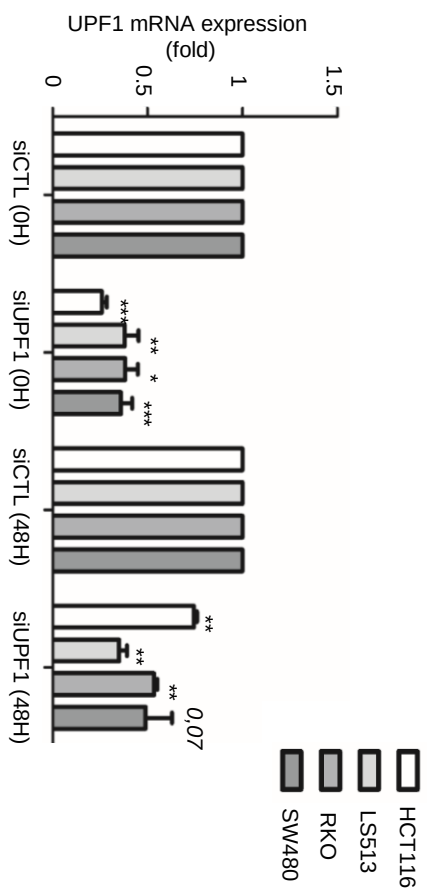


Figure S2

DISCUSSION & PERSPECTIVES

I. La mutation étonnante du gène *HSP110* dans les tumeurs MSI

La mutation du microsatellite T₁₇ d'*HSP110* est la première mutation d'une protéine chaperonne à avoir été rapportée dans une pathologie tumorale. Le microsatellite T₁₇, situé au niveau du site polypyrimidique en amont du site accepteur d'épissage de l'intron 8, est quasi-monomorphe au sein de la population mondiale, indiquant un probable rôle fonctionnel qui permet le bon déroulement de l'épissage du transcrit. Notre laboratoire a montré que les délétions somatiques au niveau de ce microsatellite ont pour conséquence principale, une perte dynamique de l'expression de la protéine sauvage HSP110 dépendante de la taille des délétions, entraînant par conséquent une sensibilité aux agents anti-cancer (facteur prédictif de réponse à la chimiothérapie) ^{1,2}.

Dans mon premier travail, récemment publié dans le journal *Oncogene*, nous avons mis en évidence l'impact négatif de la mutation du gène *HSP110* sur la prolifération cellulaire et sur la croissance tumorale (modèles de xénogreffes sous-cutanées chez la souris *nude*) des cellules cancéreuses colorectales, en absence de toute chimiothérapie. Dans notre travail, nous proposons un modèle dans lequel l'inactivation d'HSP110 semble, pour partie, diminuer la phosphorylation du facteur de transcription STAT3 et par conséquent favoriser une baisse de l'activité de cette voie de signalisation essentielle à la tumorigénèse colique. Du fait de l'implication de ce facteur de transcription dans de nombreux processus incluant la survie cellulaire, la prolifération cellulaire, la formation de métastases ainsi que l'angiogenèse, il serait intéressant d'étudier l'impact de la mutation d'*HSP110* sur ces divers mécanismes.

La diminution de la phosphorylation de la protéine STAT3, résultante de la mutation d'*HSP110* n'est probablement pas la seule voie de signalisation touchée, capable d'impacter la prolifération cellulaire et la croissance tumorale ²¹⁵. Afin d'étudier l'impact de la mutation d'*HSP110* de manière plus générale au cours de l'initiation et de la progression tumorale, un modèle murin *Knock-In* (KI) a été généré au sein du laboratoire afin de reproduire la mutation observée chez l'homme. Ces animaux, viables et sans phénotypes tumoraux, à l'instar de la souris *HSP110*^{KO} ²⁶⁴, ont été croisés avec des souris présentant une inactivation d'un des gènes majeur du complexe MMR, le gène *MSH2* (*Msh2*^{KO}), afin d'établir cette lignée en fond MMR-déficient. Les souris *Msh2*^{KO} développent des lymphomes de manière systématique au niveau du foie, de la rate et du thymus ainsi que des adénocarcinomes intestinaux dans de rares cas au cours de leur première année de vie ²⁶⁵. Pendant ma thèse, je

me suis particulièrement intéressé à la latence et à la nature de la prolifération tumorale survenant dans nos modèles d'étude *Msh2^{KO}Hsp110^{KI/KI}* (n=42) et *Msh2^{KO}Hsp110^{WT}* (n=25). Les résultats obtenus ne montrent pas de différence significative concernant la survie (Figure 15-A), le développement de lymphomes et d'adénocarcinomes intestinaux (Figure 15-B) ou encore de l'agressivité de la tumeur dans nos modèles d'études (Figure 15-C). Par ailleurs, il est à noter que l'étude de l'expression de la protéine HSP110DE9 murine (Figure 15-D) n'a pas abouti à l'identification de la protéine mutante tronquée, suggérant que le NMD puisse être responsable de la dégradation de ce mutant comme démontré sur les modèles cellulaires *in vitro* (Article 3). Afin de confirmer l'impact de la mutation en réponse à la chimiothérapie dans un modèle murin, nos souris *Msh2^{KO}Hsp110^{KI/KI}* et *Msh2^{KO}Hsp110^{WT}* sont actuellement en cours de traitement (5-FU seul).

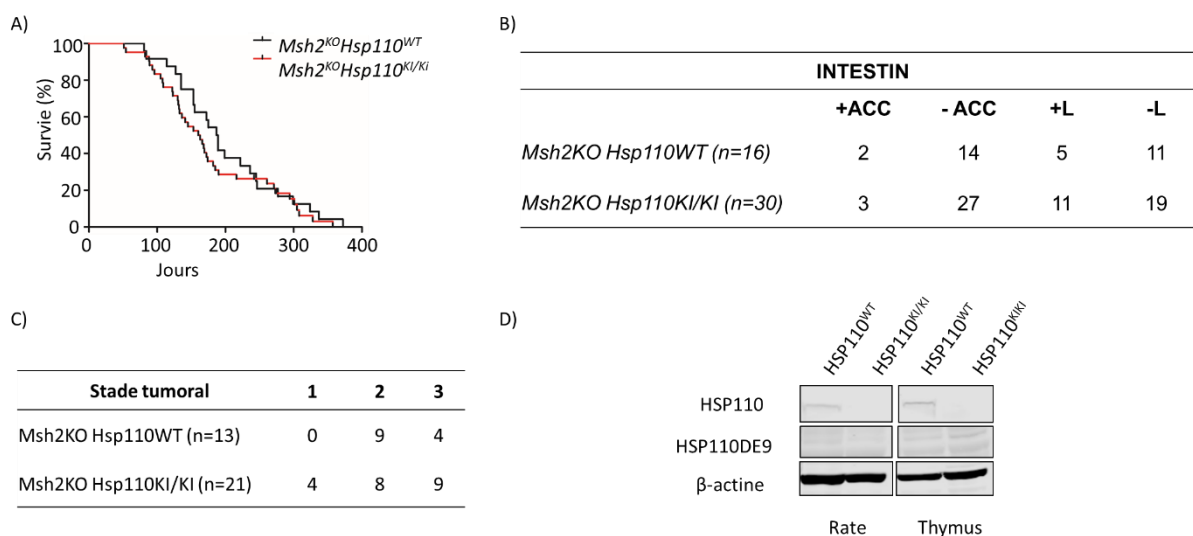


Figure 15 : Evaluation des caractéristiques cliniques et moléculaires des souris *Msh2^{KO}Hsp110^{KI/KI}* comparés aux souris *Msh2^{KO}Hsp110^{WT}*. (A) Etude la survie des souris *Msh2^{KO}Hsp110^{KI/KI}* (n=42) par rapport aux souris *Msh2^{KO}Hsp110^{WT}* (n=25). Test de Mantel-Cox, *p* non significatif (n.s). (B) Tableau de fréquence d'apparition des lymphomes (L) et des adénocarcinomes intestinaux (ACC) dans les cohortes d'études suite à une analyse microscopique des organes lymphoïdes prélevées (foie, rate, thymus) et de l'intestin. Test de Chi², *p* n.s. (C) Analyse du stade tumoral (classification développée au laboratoire) dans nos modèles murins après analyse microscopique du foie, de la rate, du thymus et de l'intestin. Les souris considérées en stade 1 ont une atteinte sus ou sous-diaphragmatique (foie, rate ou thymus). Les souris en stade II sont touchées en sus et sous-diaphragmatique (foie, thymus ; rate, thymus ou foie, thymus et rate). Les souris en stade III présentent une atteinte viscérale au niveau de l'intestin. (D) Analyse par immunoblots de l'expression de la protéine sauvage HSP110 et de son mutant HSP110DE9 dans la rate et le thymus de souris *Hsp110^{KI}* et *Hsp110^{WT}*.

Il est à noter que la souris *Msh2^{KO}* ne semble pas être un modèle murin pertinent pour étudier l'impact de la mutation sur le développement tumoral colique MSI. En effet, ces souris développent majoritairement des lymphomes de type MSI expliquant en partie les résultats obtenus. L'investigation d'un modèle murin plus adapté serait plus pertinente afin d'étudier l'impact de la mutation d'*HSP110* dans l'intestin. Pour ce faire, une collaboration établie avec le Dr. Hein Te Riele (Netherlands Cancer Institute, Amsterdam), nous a permis d'obtenir la souris *Msh2^{LoxP/LoxP} VillinCre^{ERT2}*. Ce modèle d'étude, actuellement dans notre animalerie, permet l'inactivation du gène *Msh2* chez la souris de manière inductible et spécifiquement au niveau de l'épithélium intestinal.

Ainsi, la souris *Msh2^{LoxP/LoxP} Villin^{CreERT2} HSP110^{KI}*, issu du croisement des souris *Hsp110^{KI}* et *Msh2^{LoxP/LoxP} Villin^{CreERT2}*, nous permettra d'évaluer l'impact de la mutation d'*HSP110* dans l'initiation et la progression tumorale colique MSI. Par ailleurs, ce modèle nous permettra aussi d'étudier l'impact de la mutation en réponse à la chimiothérapie (5-FU seul ou en combinaison avec l'OXA) et d'identifier les voies/mécanismes spécifiques à la carcinogénèse colique MSI touchés par la mutation d'*HSP110*.

Outre son rôle dans la phosphorylation du facteur de transcription STAT3, il est aussi intéressant de noter que la protéine sauvage HSP110 sert de facteur d'échange nucléotidique lui permettant de s'associer avec HSP70 ²⁰¹. En outre, HSP70 a été la cible thérapeutique de nombreuses molécules développées afin d'inhiber son activité, compte tenu de son rôle dans la biologie des cancers ^{181,182}. Il est alors probable que la mutation d'*HSP110* puisse impacter certaines fonctions de la chaperonne HSP70. Au vu de ces données, il serait alors intéressant d'étudier les conséquences fonctionnelles de la perte d'expression de la chaperonne HSP110 sur HSP70 et d'autres probables partenaires.

D'un point de vue thérapeutique, les travaux de recherche de notre équipe démontrent un véritable potentiel concernant la mutation d'*HSP110*. La protéine mutante HSP110DE9 est un inhibiteur de la protéine sauvage, capable de s'associer à cette dernière afin de l'empêcher d'exercer sa fonction chaperonne ou co-chaperonne (effet dominant négatif). Il serait intéressant de tirer profit de ce mécanisme d'inhibition de la chaperonne HSP110. Cependant, l'utilisation du mutant HSP110DE9 pour le traitement des patients atteints de CCR présente des inconvénients, notamment en raison de son poids moléculaire. Aussi, l'identification de molécules capables d'invalider la chaperonne HSP110 serait d'intérêt afin d'inhiber le développement tumoral et de sensibiliser les cellules à la chimiothérapie. Une collaboration à visée thérapeutique avec l'équipe de Carmen GARRIDO à Dijon a été mise en place afin d'identifier des chimio-mimétiques et peptido-mimétiques de la protéine mutante HSP110DE9. Qui plus est, une approche anti-sens (ASO) a été initiée au sein du laboratoire, en collaboration avec le laboratoire de Palma ROCCHI à Marseille. Les ASO sont de courtes séquences d'ADN simple brin capable de s'hybrider à l'ARNm entraînant par conséquent sa dégradation ou alors d'affecter le pré-ARN, forçant la rétention ou le saut d'exon selon le modèle expérimental proposé.

Il est intéressant de noter qu'en comparaison des méthodes d'inhibition classiques, les ASO possèdent une stabilité améliorée, leur permettant d'être utilisées en thérapie *in vivo* ²⁶⁶.

A l'instar des cancers colorectaux MSI, nous avons démontré, dans une deuxième étude (Article 2), que la mutation d'*HSP110* au niveau du microsatellite T₁₇ est très fréquente et bi-allélique dans les cancers gastriques MSI, représentant entre 15 et 30% des CG. En accord avec les résultats obtenus sur les modèles cellulaires coliques, l'invalidation d'*HSP110* par ARN interférence (shARN) ou *via* la surexpression du mutant *HSP110DE9* dans le modèle cellulaire gastrique TMK1 (MSS) entraîne une diminution de la croissance tumorale dans des modèles de xénogreffes sous-cutanées et une augmentation de la sensibilité au 5-FU et à l'OXA. Outre l'impact de la mutation sur la lignée TMK1, il serait intéressant d'étudier les mécanismes moléculaires sous-jacents à la mutation dans un modèle cellulaire gastrique de type MSI (SNU-1). Par exemple, l'isolation de sous-clones, présentant différentes tailles de délétions au niveau du microsatellite T₁₇, nous permettra d'étudier l'expression de la protéine sauvage et de la protéine mutante *HSP110DE9* en fonction de la taille de la délétion. Par ailleurs, ces lignées pourront être utilisées afin de déterminer l'impact de la mutation sur des mécanismes tumoraux incluant la réponse à la chimiothérapie (5-FU, OXA, CIS) et la croissance tumorale (modèles de xénogreffes).

Contrairement aux CCR MSI, l'effet pronostique de la mutation du gène *HSP110* dans les CG sur la survie des patients semble indépendant du stade de la tumeur ou du traitement à la chimiothérapie. En outre, un seuil de 4 paires de base (*versus* 5 paires de base pour les CCR MSI) a été associé à une différence de survie maximale entre les patients présentant de petites (48,5%) et de grandes (51,5%) délétions. De manière intéressante, ce seuil ne semble pas être associé à une perte complète de l'expression d'*HSP110*, suggérant que la dépendance des cellules tumorales gastriques à l'activité de la chaperonne est plus importante dans ce contexte tumoral que dans les cellules coliques MSI. Une des explications possibles concerne les conditions physiologiques dans lesquelles sont retrouvées les cellules cancéreuses gastriques. Il a été montré que le *pH* acide auquel les cellules sont exposées, lors de l'infection par la bactérie *Helicobacter Pylori* (associé au phénotype tumoral MSI), peut entraîner une augmentation de l'expression d'*HSP70* ²⁶⁷. Il est alors possible que

d'autres chaperonnes incluant HSP110 puissent être aussi surexprimées, expliquant alors l'effet néfaste constaté pour la cellule tumorale lorsqu'une perte partielle d'expression de la protéine chaperonne HSP110 est observée.

Jusqu'alors tous les résultats obtenus concernant l'étude de la chaperonne HSP110 et de sa mutation suggèrent que l'invalidation de l'activité de cette chaperonne puisse être une voie thérapeutique dans les cancers coliques et gastriques MSI. Il serait pertinent d'étudier les conséquences de l'instabilité du microsatellite T₁₇ dans d'autres localisations tumorales telles que l'endomètre, décrit comme un site majeur de l'instabilité microsatellitaire ^{7,55,268}.

Récemment, une collaboration entre notre équipe et l'équipe de Carmen GARRIDO a également démontré l'impact de la mutation dans la polarisation des macrophages dans les cancers colorectaux de type MSI ²¹⁸. Dans ce travail, il a été montré que la perte d'expression d'HSP110 favorise la polarisation des macrophages vers un profil anti-tumoral/pro-inflammatoire. Par ailleurs, notre équipe a récemment montré que l'expression des points de contrôle du système immunitaire est un paramètre pronostique essentiel dans les tumeurs coliques MSI, caractérisé par un fort infiltrat lymphocytaire (*Marisa L. et al, accepté pour publication, 2017*). Il serait alors intéressant de mettre en évidence l'impact de la mutation d'HSP110 sur d'autres types de cellules immunitaires ainsi que sur l'expression d'ICK, puisque les patients présentant de grandes délétions semblent être associés à un meilleur pronostic de survie. A terme, la souris *Msh2^{LoxP/LoxP} Villin^{CreERT2} HSP110^{KI}*, nous permettra de développer des modèles cellulaires coliques murins de type MSI. L'établissement de lignées de cancer colique MSI murines permettra de réaliser des xénogreffes orthotopiques ou sous-cutanée dans des modèles murins immuno-proficients, afin d'étudier l'impact de la mutation d'HSP110 sur les différents processus associés à la réponse immunitaire *in vivo*.

II. Le rôle du système NMD dans la carcinogenèse MSI

Sur un plan physiopathologique, le rôle du NMD dans le cancer n'est pas simple à envisager. Son activité peut avoir un effet bénéfique ou préjudiciable pour les cellules tumorales en fonction de la nature des mutations et du répertoire des gènes qu'elles affectent de manière somatique dans la tumeur. Plusieurs études ont examinés les effets du système NMD dans divers cancers et maladies génétiques héréditaires humaines ^{248,269,270}. Dans un troisième travail (Article 3), en cours de rédaction, nos données montrent que les facteurs liés au NMD sont surexprimés dans les tumeurs coliques MSI, suggérant plutôt un rôle oncogénique de ce système dans ce type tumoral bien particulier. Par ailleurs, nos résultats indiquent que l'inhibition du NMD pourrait entraîner l'expression de mutants potentiellement délétères pour la cellule tumorale MSI, à l'instar d'HSP110DE9, responsables de la diminution de la croissance tumorale MSI observée dans ces modèles (HCT116), alors qu'aucun effet similaire n'est observé dans les mêmes conditions d'inhibitions avec des cellules tumorales MSS (SW480).

Les tumeurs MSI sont sinon caractérisées par un nombre important de mutations somatiques entraînant un décalage du cadre de lecture au niveau de microsatellites codants. Ces mutations touchent les microsatellites codants, mais aussi les microsatellites non codants, prépondérants au sein du génome, incluant ceux qui peuvent avoir un impact dans différents processus physiologique, comme l'épissage (*c.f.* T₁₇ du gène *HSP110*). La découverte de la mutation d'*HSP110* montre une caractéristique particulière du processus tumoral MSI, puisque cette altération a des effets délétères pour les cellules tumorales et la tumeur en général, alors qu'elle est pourtant observée de manière fréquente dans ces cancers. Ce paradoxe peut s'expliquer si on admet que cet événement et d'autres surviennent de manière inéluctable dans les cellules MMR-déficientes qui ne peuvent conserver à l'état sauvage de telles répétitions génomique de grande taille (pas de contre-sélection possible), même dans un contexte où la survenue de ces altérations est délétère comme c'est le cas pour celle qui concerne *HSP110*. La survenue obligatoire de ce type de mutations somatiques représente donc une faiblesse du processus tumoral MSI, et d'autres gènes qu'*HSP110* sont sûrement concernés. Actuellement, une recherche à haut débit des événements d'épissages aberrants dans les tumeurs coliques MSI a été initiée au laboratoire. Elle permettra d'établir une liste exhaustive

des mutants d'épissage dans ces cancers, et d'identifier à la suite ceux potentiellement délétère pour la cellule tumorale MSI par des approches fonctionnelles. Ce projet repose sur un séquençage par Exome-Seq et RNA-Seq d'une série de 100 tumeurs coliques MSI, 50 tumeurs MSS et des muqueuses coliques non tumorales appariées. A terme, nous espérons que les données obtenues permettront de repérer les répétitions du génome dont l'instabilité peut induire un épissage aberrant de certains exons. De manière générale, l'impact du système NMD sur l'expression de ces mutants d'épissage sera analysée et l'activité de ce système, au cas par cas, sera certainement intéressante à connaître.

De nos jours, il est établi que les mutations au sein de microsatellites codants entraînent un décalage du cadre de lecture, responsable de la synthèse de protéines tronquées avec des propriétés néo-antigéniques, reconnus par le système immunitaire de l'hôte (réponse immune anti-tumorale). Notre équipe a publié, sur une série de petite taille de cas de CCR MSI, que l'expression d'*UPF1* dans les cellules tumorales étaient inversement corrélée au degré d'infiltration de la tumeur par des lymphocytes T cytotoxiques CD3⁺, témoin d'une immunité anti-tumorale de l'hôte ¹⁵. Ces résultats suggèrent que le NMD pourrait d'une certaine manière, de par son activité catabolique au niveau de l'ARN, réguler négativement le flux néo-antigénique produit en conséquence et jouer un rôle de régulateur négatif de l'immunité anti-tumorale dans le modèle MSI. Au vu de ces données, il serait pertinent d'étudier, plus en détails, l'impact de l'inhibition du NMD sur l'immunité anti-tumorale, en commençant par l'exploitation de modèles murins MMR-déficients traités avec des inhibiteurs du NMD comme l'amlexanox.

Par ailleurs, nos résultats suggèrent que l'inhibition du NMD induit, peut-être de manière spécifique, une diminution de la prolifération cellulaire et de la croissance tumorale MSI. Outre l'expression de mutants potentiellement délétères pour la cellule tumorale qui a déjà été évoquée, il n'est pas à exclure que d'autres mécanismes puissent aussi être en jeu, notamment de manière non spécifique et liés aux méthodes d'inhibition utilisées. L'amlexanox est par exemple aussi un anti-inflammatoire utilisé en clinique dans le traitement des aphtes et de l'asthme. Cette molécule, décrite comme un inhibiteur des protéines kinases TBK1 et IKKε ^{271,272}, est aussi capable de bloquer l'interaction entre la protéine de liaison au calcium S100A4 et le facteur EGF (*Epidermal Growth Factor*) par exemple, inhibant la prolifération cellulaire dans des

modèles cellulaires de cancer du sein ²⁷³. Outre le manque de spécificité d'action de l'amlexanox, il convient de dire que les effets inhibiteurs observés de cette molécule sur le NMD ne sont pas très puissants. Il serait nécessaire d'identifier de nouvelles molécules ou procédés plus puissants et spécifiques. Par exemple, l'utilisation d'ASO, ciblant les séquences consensus de dépôts des EJC, pourrait être une approche intéressante afin de cibler spécifiquement la reconnaissance et la dégradation des transcrits mutants contenant un PTC, cibles du NMD ²⁵⁶.

Outre le rôle de du NMD dans la reconnaissance et la dégradation des ARNm contenant un PTC, il est à noter que ce système est aussi impliqué dans d'autres processus en rapport avec l'apoptose et l'autophagie ²²¹. Ces aspects fonctionnels importants n'ont pas été développés dans ce travail. Il sera également essentiel de mieux comprendre l'importance de ces phénomènes dans les cellules tumorales *via* d'autres approches fonctionnelles afin de maîtriser des approches thérapeutiques innovantes basées sur l'inhibition du NMD pour les patients atteints de CCR MSI, ou dans d'autres types tumoraux.

ANNEXES

Annexe 1

**Le rôle de la localisation nucléaire d'HSP110 dans la réponse au traitement
et la progression tumorale colique**

Résultats non publiés

De récentes données cliniques générées au laboratoire, à l'aide du service d'anatomo-pathologie de l'hôpital Saint Antoine (Magali SVRCEK), montrent que l'expression nucléaire d'HSP110 serait associée (i) au mauvais pronostic des patients atteint d'un cancer colique MSI de stade II-III sous chimiothérapie (Figure 16) ; (ii) au processus métastatique (données non montrées). En accord avec ces résultats, une récente étude a démontré l'impact pronostique de l'expression nucléaire d'HSP110 en réponse au traitement dans les cancers gastriques ²¹³. Au vu de ces observations, un nouvel axe d'étude a été initié sur la chaperonne HSP110 afin de comprendre, d'un point de vue fonctionnel, comment l'expression nucléaire d'HSP110 est associée à la réponse aux chimiothérapeutiques et au processus métastatique. Pour répondre à ces questions, j'ai développé des modèles cellulaires coliques (MSI et MSS) de surexpression stable de la forme cytoplasmique d'HSP110 (HSP110 α , isoforme majoritaire et constitutive de cette chaperonne) ainsi que la forme nucléaire (HSP110 β , isoforme nucléaire issu d'un épissage alternatif de l'exon 12 suite à un choc thermique à 42°C). Ces outils cellulaires ont été utilisés pour étudier l'impact de la localisation nucléaire sur la prolifération cellulaire et l'invasion tumorale ainsi que la réponse aux agents anti-cancers.

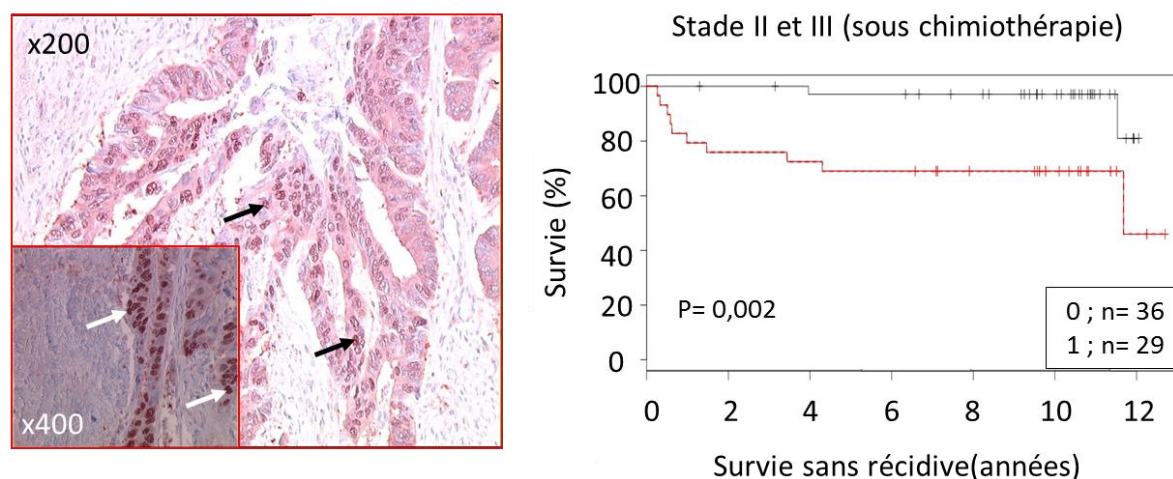


Figure 16 : HSP110 nucléaire, un facteur prédictif de réponse à la chimiothérapie. **(Gauche)** Expression d'HSP110 par immunohistochimie dans des cancers colorectaux MSI. Les flèches blanches (zoom x400) et noires (zoom x200) montrent une expression nucléaire de la chaperonne HSP110. **(Droite)** Analyse clinique de la survie de 65 patients atteints de CCR MSI de stade II et III sous chimiothérapie. Les patients sont groupés en deux catégories en fonction de l'expression nucléaire d'HSP110 (0 : pas d'expression nucléaire ; 1 : expression nucléaire). Test de Mantel-Cox, ** $p < 0,01$.

Suite à la validation de nos modèles de surexpression (Figure 17-A et 17-B), nos résultats montrent que la surexpression des deux isoformes induit une résistance à l'OXA et au 5-FU, sans différence significative selon la localisation de la chaperonne dans les modèles cellulaires de cancers coliques SW480 (MSS) et KM12 (lignée MSI présentant de grandes délétions au niveau du T_{17} , responsable de l'extinction de l'expression d'HSP110 endogène) (Figure 17-C et 17-D). De manière intéressante, la surexpression de la forme β induit une augmentation de l'expression protéique de la chaperonne HSP70, connu pour ses propriétés pro-tumorales ²⁷⁴, dans nos deux modèles cellulaires MSI et MSS (Figure 17-B). Il est aussi à noter que la surexpression de la forme β induit une augmentation de l'expression de l'isoforme α dans la lignée SW480, suggérant une boucle de régulation positive (Figure 17-B). Par ailleurs, il est intéressant de noter que la surexpression de l'isoforme β entraîne une augmentation de la capacité de migration et de prolifération cellulaire dans ces modèles (Figure 17-E et 17-F).

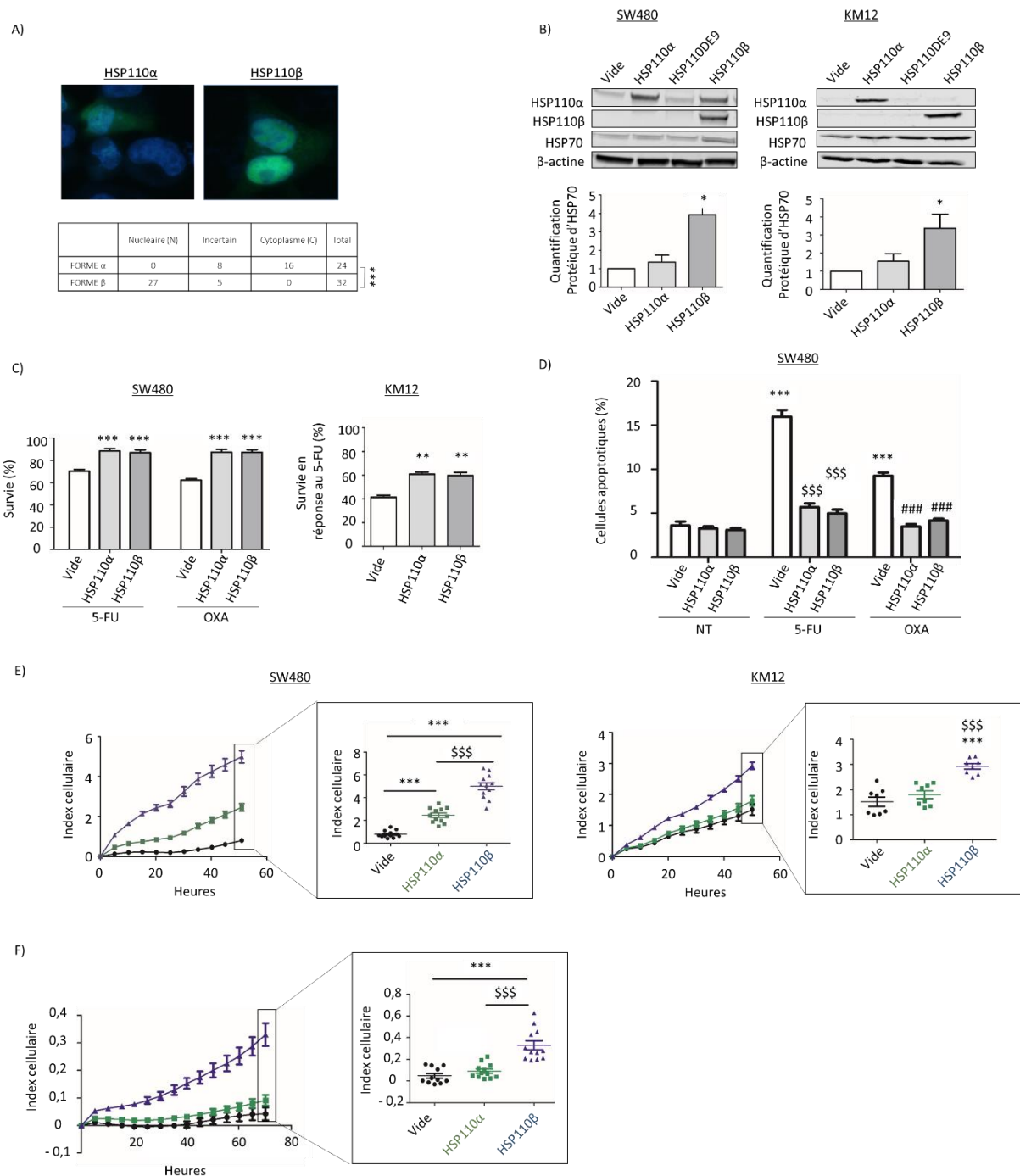


Figure 17 : Etude moléculaire et fonctionnelle de l'impact de la localisation nucléaire d'HSP110 *in vitro*. (A) Etude de la localisation subcellulaire par microscope à fluorescence des isoformes HSP110α et β dans la lignée cellulaire SW480 exprimant un plasmide de surexpression (HSP110α et HSP110β) couplé à la GFP (*Green Fluorescent Protein*). Test de Chi2, $p < 0.001$. (B) (Haut) Analyse de l'expression des différentes isoformes d'HSP110 par immunoblots. (Bas) Quantification de l'expression d'HSP70 dans des modèles cellulaires de surexpression stable des isoformes HSP110α et HSP110β (n=4). Le témoin de charge utilisé est l'actine. Test de student, * $p < 0,05$ (par rapport au plasmide de surexpression vide) (C) Evaluation de la survie

cellulaire (par colorimétrie, WST1, Roche©) après 48H de traitement au 5-FU (20 μ M) et à l'oxaliplatine (5 μ M). n=3 (SW480) ; après 72H de traitement au 5-FU (5 μ M). n=1 (en triplicats) (KM12). Test de student, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (D) Analyse du pourcentage de cellules apoptotiques (par cytométrie en flux, AnnexinV-FITC/7-AAD) après 48H de traitement au 5-FU (20 μ M) et à l'oxaliplatine (5 μ M) dans la lignée SW480. n=3. Test de student, *** $p < 0,001$ (par rapport au plasmide vide non traité (NT)) ; \$\$\$ $p < 0,001$ (par rapport au plasmide vide 5-FU) ; ### $p < 0,001$ (par rapport au plasmide vide OXA). (E) Analyse de la prolifération cellulaire par la technologie XCelligence (c.f. matériels et méthodes de l'article 3) pendant 48H. Test de student, *** $p < 0,001$ (par rapport au plasmide vide) ; \$\$\$ $p < 0,001$ (par rapport à HSP110 α). (F) Analyse de la capacité de migration par XCelligence pendant 72H. Test de student, *** $p < 0,001$ (par rapport au plasmide vide) ; \$\$\$ $p < 0,001$ (par rapport à HSP110 α).

Actuellement, des études fonctionnelles (réponse à la chimiothérapie, prolifération et migration cellulaire) sur d'autres modèles cellulaires MSI (KM12, HCT116 et RKO), surexprimants de manière stable les différentes isoformes, sont en cours de réalisation. A court terme, l'impact de l'expression nucléaire d'HSP110 sur la transition épithélio-mésenchymateuse sera étudié afin d'expliquer la capacité de migration des tumeurs primaires surexprimant la forme nucléaire. Par ailleurs, nous avons fait l'hypothèse que cette protéine nucléaire puisse être impliquée dans la régulation de la structure de la chromatine et de l'expression de certains gènes impliqués dans la progression tumorale. Pour répondre à cette question, une analyse ATAC-Seq (*Assay for Transposase-Accessible Chromatin*), en cours, nous permettra de déterminer les régions de la chromatine possiblement modifiées lorsque HSP110 est présente dans le noyau.

En 2016, nous avons initié un projet pour la synthèse d'anticorps spécifiques dirigés contre les deux isoformes d'HSP110 (HSP110 α et HSP110 β), ce qui nous permettra d'identifier la forme d'HSP110 observée dans le noyau des coupes histologiques analysées. A terme, cette analyse histologique plus robuste permettra de proposer une méthode pronostique pour les patients atteints de cancers coliques. Il est à noter que l'anticorps spécifique dirigé contre l'isoforme HSP110 α a été produit et que celui dirigé contre la forme β sera disponible courant octobre. De manière intéressante, des résultats probants ont été obtenus concernant l'anticorps dirigé contre la forme α , suggérant que la chaperonne HSP110 α est localisée au niveau cytoplasmique dans les tumeurs primaires.

Annexe 2

“HSP110 T₁₇ simplifies and improves the microsatellite instability testing in patients with colorectal cancer”

Olivier Buhard, Anaïs Lagrange, Agathe Guilloux, Chrystelle Colas, Mouna Chouchène, Kristell Wanherdrick, Florence Coulet, Erell Guillerm, Coralie Dorard, Laetitia Marisa, A'dem Bokhari et al., J Med Genet, 2016.

Résumé

En 2006, notre laboratoire a proposé que cinq répétitions microsatellitaires (BAT25, BAT26, NR21, NR24 et NR27) soient utilisées dans une réaction de PCR multiple (pentaplex) afin de faciliter l'identification du phénotype tumoral MSI dans les CCR ¹²⁹. Aujourd'hui, cette méthode est une des références internationales utilisée en routine en clinique, en France comme à l'étranger. Bien que fiable, la méthode pentaplex repose néanmoins sur la co-amplification de cinq marqueurs, pas toujours réalisable en routine. En outre, un manque de sensibilité et de spécificité de cette méthode a été souligné du fait que les marqueurs de la pentaplex présentent (i) un certain polymorphisme dans la population mondiale, masquant un phénotype MSI dans certaines situations (faux négatifs) et (ii) des allèles rares, en dehors des zones de polymorphismes fréquents, mimant des mutations aberrantes du fait de MSI dans d'autres tumeurs (faux positifs). Nos travaux sur HSP110, ont démontré que contrairement aux marqueurs de la pentaplex qui n'ont aucun rôle fonctionnel sur l'expression des gènes qui les contiennent, le microsatellite intronique T₁₇ contrôle l'expression de cette chaperonne. Il a alors été fait l'hypothèse d'une conservation de ce marqueur dans la population mondiale, suggérant son utilisation en tant que candidat à visée diagnostique pour détecter le phénotype MSI dans les CCR. Dans ce travail, le polymorphisme du T₁₇ a été analysé à grande échelle sur un panel de 1 037 individus représentatifs de la diversité génétique des populations humaines. Les résultats démontrent que ce marqueur est en effet très peu polymorphe, et admet seulement 2 allèles sauvages et 3 génotypes (T₁₆/T₁₆, T₁₆/T₁₇, T₁₇/T₁₇) dans les ADN normaux analysés. Dans les ADN tumoraux analysés, ce marqueur a une spécificité proche de 100% pour détecter le phénotype MSI. Il permet, en outre, la détection de nouveaux cas MSI que la pentaplex ne détectait pas (meilleure sensibilité). Le microsatellite T₁₇, seul, semble être donc significativement plus relevant que la pentaplex actuellement utilisée pour identifier le phénotype MSI dans les CCR. Dans ce travail, nous suggérons que cette méthode devienne un nouveau standard international en clinique pour la détection de ce phénotype tumoral dans les CCR.

ORIGINAL ARTICLE

HSP110 T17 simplifies and improves the microsatellite instability testing in patients with colorectal cancer

Olivier Buhard,^{1,2} Anaïs Lagrange,^{1,2} Agathe Guilloux,^{1,2,3} Chrystelle Colas,^{1,2} Mouna Chouchène,^{1,2} Kristell Wanherdrick,^{1,2} Florence Coulet,^{1,2} Erell Guillerm,^{1,2} Coralie Dorard,^{1,2} Laetitia Marisa,^{1,4} Adem Bokhari,^{1,2} Malorie Greene,^{1,2} Nizar El-Murr,^{1,2} Sahra Bodo,^{1,2} Martine Muleris,^{1,2} Isabelle Sourouille,^{1,2} Magali Svrcek,^{1,2,5} Pascale Cervera,^{1,2,5} Hélène Blanché,⁶ Jérémie H Lefevre,^{1,2,7} Yann Parc,^{1,2,7} Come Lepage,^{8,9} Caroline Chapusot,^{8,9} Anne-Marie Bouvier,^{8,9} Marie-Pierre Gaub,¹⁰ Janick Selves,¹¹ Kerry Garrett,¹² Barry Iacopetta,¹³ Richie Soong,¹⁴ Richard Hamelin,^{1,2} Carmen Garrido,^{9,15} Olivier Lascos,^{2,16} Thierry André,^{1,2,17} Jean-François Fléjou,^{1,2,5} Ada Collura,^{1,2} Alex Duval^{1,2}

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103518>).

For numbered affiliations see end of article.

Correspondence to

Dr Alex Duval, INSERM, UMRS 938—Centre de Recherche Saint-Antoine, Equipe 'Instabilité des Microsatellites et Cancers', Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer, Paris F-75012, France; alex.duval@inserm.fr

AC and AD are co-leadership.

Received 13 September 2015

Revised 7 January 2016

Accepted 9 January 2016

Published Online First

1 February 2016



CrossMark

To cite: Buhard O, Lagrange A, Guilloux A, et al. *J Med Genet* 2016;**53**:377–384.

ABSTRACT

Background Every colorectal cancer (CRC) patient should be tested for microsatellite instability (MSI, a marker for defective DNA mismatch repair) as a first screen for Lynch syndrome (LS). In this study, we investigated whether it may be possible to improve the detection of MSI in CRC. We examined whether the HT17 DNA repeat (critical for correct splicing of the chaperone HSP110) might constitute a superior marker for diagnosis of the MSI phenotype in patients with CRC compared with the standard panel of markers (pentaplex).

Methods The HT17 polymorphism was analysed in germline DNA from 1037 multi-ethnic individuals. We assessed its sensitivity and specificity for detecting MSI in a multicentre, population-based cohort of 685 patients with CRC and an additional series of 70 patients with CRC considered to be at-risk of LS. All cases were screened earlier for MSI using pentaplex markers. Cases showing discordant HT17/pentaplex results were further examined for the expression of mismatch repair proteins.

Results HT17 status was analysed independently and blinded to previous results from pentaplex genotyping. HT17 showed no germline allelic variation outside a very narrow range. Compared with the pentaplex panel, HT17 showed better sensitivity (0.984 (95% CI 0.968 to 0.995) vs 0.951 (95% CI 0.925 to 0.972)) and similar specificity (0.997 (95% CI 0.989 to 1.000) for both) for the detection of MSI. Furthermore, HT17 alone correctly classified samples judged to be uncertain with the pentaplex panel and showed excellent ability to detect MSI in patients with LS.

Conclusions HT17 simplifies and improves the current standard molecular methods for detecting MSI in CRC.

INTRODUCTION

Approximately 10%–15% of sporadic colorectal cancers (CRCs) show the microsatellite instability (MSI) phenotype.^{1–3} MSI is also found in the great

majority of tumours in patients with Lynch syndrome (LS, for review, see refs. 4, 5) and is a molecular marker for defective DNA mismatch repair (MMR) in tumours. The European Society for Medical Oncology recommended in 2015 that every CRC patient should be tested for MSI and/or DNA MMR deficiency at the time of diagnosis as a first screen for LS.⁶ CRC with MSI are also reported to have distinctive molecular and clinicopathological profiles, including more favourable prognosis.^{4 7 8} Some workers have also suggested that CRCs displaying MSI do not respond to 5-fluorouracil-based chemotherapy.^{9–11}

Since its initial description, the methods and criteria used to determine the MSI phenotype in CRC have constantly evolved. Currently, the evaluation of MSI status is based on screening tumour DNA for the presence of somatic deletions in long, non-coding DNA repeats. These markers are somewhat polymorphic in the general population, although they exhibit very little variation.¹² In an effort to standardise MSI analysis in CRC, a workshop held at the National Cancer Institute (NCI) in 1998 recommended the use of a panel of five markers.¹³ In 2002, our group proposed a panel of five mononucleotide repeats (pentaplex) that obviated the need to simultaneously analyse germline DNA from each CRC patient.¹² The pentaplex panel was subsequently approved by the NCI¹⁴ for the screening of MSI and we¹⁵ and Xicola *et al*¹⁶ later demonstrated better specificity and sensitivity compared with the NCI panel. The minimum number of markers required to show instability in order for colon tumours to be classified as MSI with the pentaplex panel was initially deemed to be four out of five. However, more recent work found that just two unstable markers are sufficient to classify colon tumours as MSI with this method.¹⁷

We recently reported a high frequency of mutation for the T17 mononucleotide repeat of *HSP110* (HT17) in MSI CRC.¹⁸ Deletions that

Cancer genetics

occur in repeats used as markers in the NCI and pentaplex panels are not associated with any known biological effect. In contrast, deletion of the HT17 repeat in tumour DNA leads to increased synthesis of a variant HSP110 isoform due to exon 9 skipping (HSP110DE9).^{18 19} HSP110 is a conserved and abundant molecular chaperone whose expression is induced by a specific set of stress conditions. Somatic deletions in HT17 were shown to increase the sensitivity of cancer cell lines to anticancer agents.¹⁹ The aim of the present study was to investigate whether the HT17 repeat could be used to further improve and simplify the currently used detection methods for MSI in colon cancer.

PATIENTS AND METHODS

Patients, specimens and determination of their MSI status using pentaplex PCR

The institutional review board/ethics committee of the participating centres approved this study.

The Human Genome Diversity panel (HGDP)^{15 20} and a set of unrelated Caucasian DNA samples selected from the 'Centre d'Etude du Polymorphisme Humain' (CEPH) reference families was used in this study.

All 685 tumour DNAs were obtained from patients with CRC (1998–2007) in one of the six centres involved in the study (see online supplementary table S1). They were collected prospectively and MSI testing was performed routinely for all patients with CRC in these clinical centres at the time of diagnosis. MSI status was determined using pentaplex PCR.¹⁵ The cohort used in this study comprised all CRC samples found to have a positive MSI status (at least two unstable markers; $n=313$), as well as tumours from the same clinical centres that displayed either MSS (0 or 1 unstable marker; $n=366$) or uncertain (incomplete profile; $n=6$) status.

An additional cohort of 70 tumour DNAs were further analysed using the pentaplex panel (see online supplementary table S1). Tumour DNAs from this consecutive series of CRCs were collected prospectively over a period of 6 years in our institute (Saint-Antoine Hospital, 2009–2014). These were derived from patients with CRC who were considered to be at high risk of LS.¹⁴

All pentaplex markers were analysed on an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) (see online supplementary table S1).

Determination of the HT17 status of samples

HT17 status was independently determined for all samples and while blinded to the results from pentaplex genotyping.

PCR products were run on an ABI 3100 Genetic Analyzer with GS400HD ROX size standard and POP-7 polymer (Applied Biosystems). GeneMapper (V4.0) software (Applied Biosystems) was used to analyse the HT17 traces. HT17 traces were considered as acceptable when the amplitudes of the major peaks were between 100 and 6000 fluorescence units. Height ratios between peaks were also calculated, especially between T14 and T16 (R1) and between T15 and T16 (R2). An MSI-HT17 Perl script was designed to analyse HT17 traces automatically (see online supplementary methods S1).

Analysis of discordant results between the pentaplex panel and HT17 and assessment of true-negative (MSS) and true-positive (MSI) cases

All tumour samples that displayed discordant results between the pentaplex panel and HT17 were further analysed to confirm their MSI status. This was done by assessing the expression of

MMR proteins (MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2) using immunohistochemistry (IHC).²¹ Eight cases displayed discordant results but could not be analysed for the expression of MMR proteins by IHC due to a lack of suitable tissue. For these cases we screened for the presence of mutation in 15 genes that contain a mononucleotide repeat sequence in their coding region.⁴ IHC was also used to confirm the MSI status of tumours that displayed either concordant positive (MSI, $n=104$, true-positives) or concordant negative (MSS, $n=18$, true-negatives) profiles for the pentaplex and HT17 markers. Finally, IHC was used to confirm the MMR status of cases from the series of 70 tumours from patients deemed at high risk of LS and displaying positive MSI status with pentaplex and/or HT17.

Statistical analysis

The true MSI/MSS status was known for only 122 out of the 685 patients in our cohort. In this situation where the gold standard (IHC) is only partially observed, sensitivities and specificities of the HT17 and pentaplex tests were assessed using iterative algorithms. We used a latent class model formulation.^{22 23} In the saturated model, the joint distribution of the two tests and of the gold standard was assumed to be multinomial with eight categories, corresponding to all possible observations. The multinomial parameters were the prevalence of MSI status and the sensitivities and specificities of the two tests. Hastings–Metropolis²⁴ and expectation-maximisation²⁵ algorithms were run on the data to estimate the five parameters, two-sided CIs and test p values. A detailed description of the model and related estimation is given in the online supplementary methods S2.

RESULTS

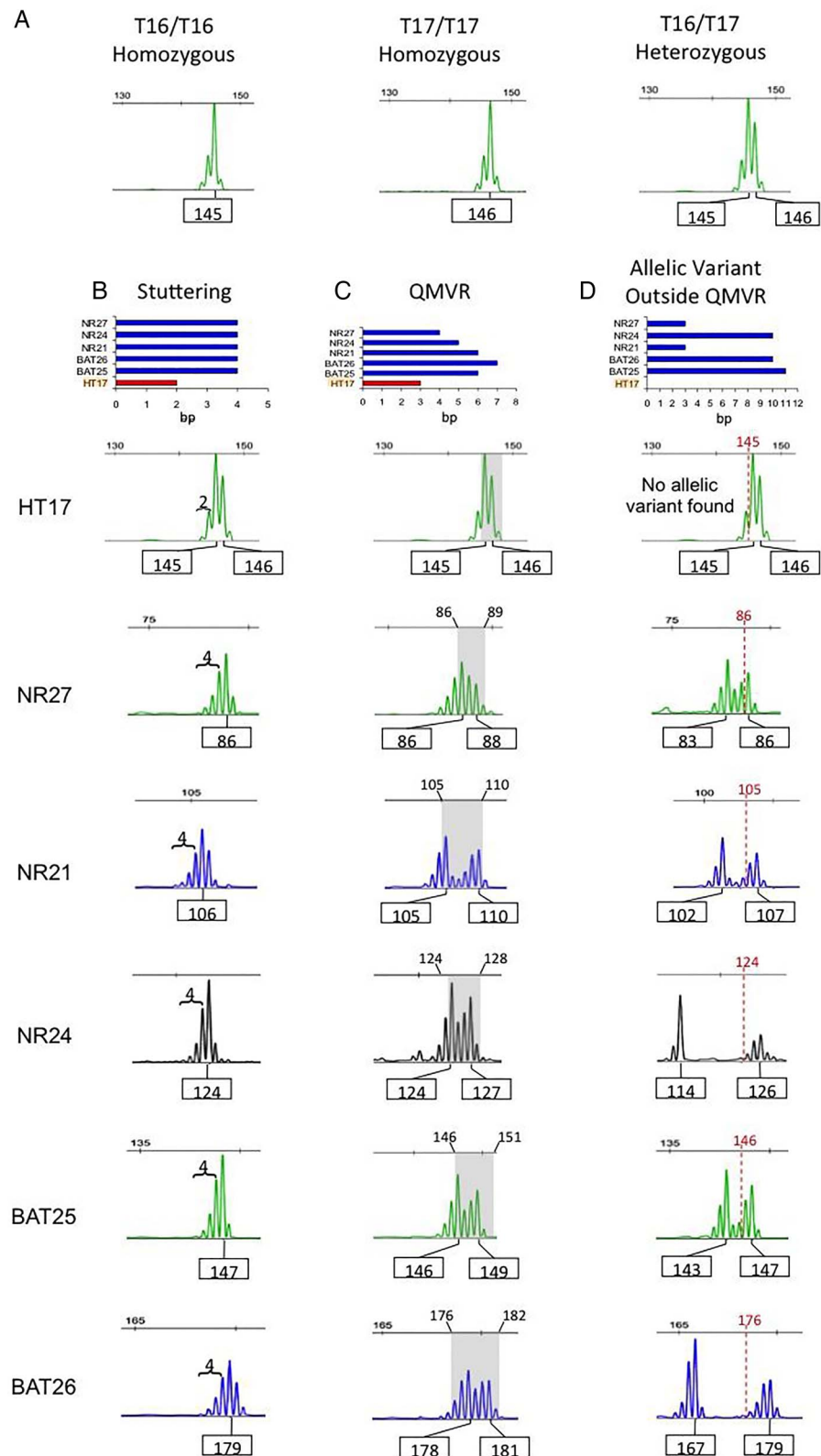
Multi-ethnic germline DNA profiling of the HT17 microsatellite

HT17 genotyping was performed in 1037 samples from the HGDP-CEPH panel representing 54 worldwide populations from 29 geographical regions. Three canonical profiles were observed: T16/T16 (135/1034; 13%), T16/T17 (304/1034; 29.4%) and T17/T17 (595/1034; 57.6%) (figure 1A). The extent of stuttering by Taq polymerase observed for HT17 (2 bp) was only half that observed for the longer MSI markers from the pentaplex panel (4 bp, figure 1B). Moreover, the quasi-monomorphic variation range (QMVR) for each marker in the pentaplex panel was much larger than for HT17 (table 1 and figure 1C). Additionally, all five pentaplex markers displayed allelic variants that were outside their QMVR, whereas no amplification products were observed outside the narrow QMVR for HT17 in the same worldwide populations (table 1 and figure 1D). Overall, the HT17 DNA repeat was remarkably monomorphic, with the size of normal alleles ranging from 145 bp (T16) to 147 bp (T18). Only three individuals (3/1037, 0.3%) displayed the T18 allele (data not shown) (see online supplementary table S2 and figure S1). The data analysis pertains to all samples and thus concerns 2074 alleles. Table 1 summarises the percentage of each allelic size variant within or outside the QMVR for HT17 and for each of the five pentaplex markers in the complete worldwide series.

Determination of HT17 status in colon tumours

In this series of 685 tumours (666 CRCs and 19 adenomas), HT17 status was analysed independently and blinded to previous results from pentaplex genotyping. No aberrant HT17 profiles were detected in 352 of the 366 tumours that displayed unambiguous MSS status with the pentaplex panel. Amongst the

Figure 1 Morphometric analysis of traces for HT17 and for the five pentaplex markers. (A) Canonical profiles for the three main HT17 genotypes observed in the Human Genome Diversity panel-Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (HGDP-CEPH) population are shown, with the respective amplicon sizes indicated in base pairs. (B) Comparative representation of stuttering artefacts for the six markers, including stutters for peaks shorter than the shortest allele annotated in each trace. (C) Comparative representation of the quasi-monomorphic variation ranges (QMVRs) for the six markers. The grey band covers all possible amplicon sizes for each quasi-monomorphic marker. (D) Sample traces are shown of allelic variants outside the QMVR for the six markers. The red dotted lines indicate the minimum size of the QMVR. In (B), (C) and (D), the blue bars are for the pentaplex markers and the red bar is for HT17. The values shown for the bar graphs (B–D) indicate the size in base pairs (stuttering, QMVR) or the shortest size (allelic variant outside QMVR).



remaining 14 cases (table 2), 9 displayed aberrant HT17 alleles that fell outside the QMVR (see online supplementary figure S2A; only four out of nine cases are shown). Owing to the remarkable reproducibility of the only three HT17 genotypes (T17/T17, T16/T17 and T16/T16), we here considered the possibility to also examine the two stutter peaks corresponding to –1 or –2 bp weak allelic shortenings that were associated with

HT17 profiles in germline DNAs. We first calculated the ratios between signal intensities for these –1 and –2 bp stutter peaks and those corresponding to normal alleles, referred to as R1 (for T15:T16 ratio) and R2 (for T14:T16 ratio). The height ratios between the T14 and T15 stutter peaks and the T16 peak in germline DNA never exceeded 0.15 and 0.5 in germline DNAs, respectively, regardless of the HT17 genotype

Cancer genetics

Table 1 Allelic sizes for each marker

HT17			NR-27		NR-21		NR-24		BAT-25		BAT-26	
Size in bp	Nb alleles	Percentage	Size in bp	Percentage	Size in bp	Percentage	Size in bp	Percentage	Size in bp	Percentage	Size in bp	Percentage
140	0	–	81	–	100	–	112	–	133	–	164	–
141	0	–	82	–	101	–	113	–	134	–	165	–
142	0	–	83	0.2	102	0.7	114	0.05	135	0.04	166	0.08
143	0	–	84	1.0	103	1.6	115	0.0	136	0.08	167	0.5
144	0	–	85	1.4	104	0.1	116	0.0	137	0.08	168	0.1
145	574	27.8	86	2.8	105	0.5	117	0.0	138	0.0	169	0.1
146	1497	72.1	87	67.2	106	5.3	118	0.0	139	0.0	170	0.0
147	3	0.1	88	26.6	107	51.7	119	0.0	140	0.0	171	0.2
148	0	–	89	0.8	108	33.7	120	0.0	141	0.2	172	0.2
149	0	–	90	–	109	6.0	121	0.0	142	0.2	173	0.0
			91	–	110	0.2	122	0.0	143	0.4	174	0.0
					111	0.2	123	0.0	144	0.5	175	0.0
					112	–	124	0.4	145	0.2	176	0.08
					113	–	125	27.2	146	1.4	177	1.2
							126	68.9	147	13.7	178	14.5
							127	3.2	148	49.5	179	65.5
							128	0.2	149	27.4	180	15.2
							129	0.0	150	5.5	181	2.3
							130	0.05	151	0.8	182	0.04
							131	–	152	–	183	–
							132	–	153	–	184	–

Allelic sizes were measured from the entire worldwide germline DNA series. For each marker, alleles in the quasi-monomorphic variation ranges (QMVR) are boxed in dark grey cells while polymorphic alleles are in light grey cells.

(see [figure 2](#) and online supplementary figure S2B; only two out of five cases are shown). In contrast, we observed increased values of R1 and/or R2 ratio in the other five primary colon tumour DNAs and these samples were referred to as MSI(R) cases. Importantly, the 14 discordant MSS tumours according to HT17 status were all confirmed to be MMR-deficient by IHC ([table 2](#) and data not shown). Apart from sample PA-059, all 14 tumours showed high levels of contamination with normal DNA (see online supplementary figure S2).

Of the 313 tumours classified as MSI with pentaplex method (ie, at least 2 unstable markers), 309 showed aberrant HT17 profile ([table 2](#)). The four remaining cases displayed high level of contamination with normal DNA and did not show aberrant HT17 profile (see online supplementary figure S3).

Finally, six tumour samples in this series were classified as having an uncertain MSI status with the pentaplex panel ([table 2](#)). Among these, aberrant deletions in HT17 were detected in four cases, all of which were confirmed as being MSI because they displayed frameshift alteration(s) in at least one coding DNA repeat contained in relevant target genes for MSI. In one of these cases, MMR deficiency was further confirmed by IHC ([table 2](#)). In the two remaining samples, neither aberrant HT17 allelic profiles nor frameshift target gene mutations were detected and it was concluded they were likely to be MSS.

Sensitivity and specificity of the HT17 and pentaplex markers for the detection of MSI in colon tumours

The statistical analysis was conducted on 679 tumour samples that showed an unambiguous microsatellite status (MSI or MSS) with pentaplex and that were further analysed with HT17. Eighteen samples displayed discordant results using the two methods (see above). Compared with the reference pentaplex

panel, HT17 offered better sensitivity ($p=0.005$), that is, 0.984 (95% CI 0.968 to 0.995) versus 0.951 (95% CI 0.925 to 0.972), while showing similar specificity ($p=0.5$), that is, 0.997 (95% CI 0.989 to 1.000) (see [table 3](#) and online supplementary figure S2). As expected, when a threshold of three unstable markers rather than two was used to classify MSI with the pentaplex method, the superior sensitivity ($p<0.00001$) and specificity ($p=0.084$) of HT17 became even more apparent (see online supplementary table S3 and [table 3](#)).

Comparative analysis of HT17 and pentaplex for the detection of MSI in individuals at high risk of LS

We next compared the performance of HT17 and pentaplex for the detection of MSI in colon tumours from 70 patients with CRC considered to be at high risk of LS (see online supplementary table S1).

Of these 70 tumours, 46 displayed an unambiguous MSS status with the pentaplex panel (see online supplementary table S1). No aberrant HT17 profiles were detected in 45 of these 46 tumours. Although the remaining displayed high levels of contamination with normal DNA, aberrant HT17 alleles were clearly present and MSI status was confirmed by IHC showing loss of MSH2 expression in the tumour ([table 4](#), sample PAL-024). LS was highly probable in this patient, due to the detection of a heterozygous germline variant in the MSH2 gene that was considered likely to be deleterious ([table 4](#) and data not shown).

Of these 70 tumours, 22 displayed an unambiguous MSI status with the pentaplex panel (see online supplementary table S1). All these 22 tumours also showed aberrant HT17 profiles (see online supplementary table S1 and [table 4](#)) and were confirmed to be MMR-deficient by IHC ([table 4](#) and data not shown).

Table 2 Analysis of samples with discordant or doubtful HT17/pentaplex profiles and assessment of their MSI status*

Sample name	Nb. instable pentaplex markers/ Nb. informative markers	MSI status (pentaplex)	HT17 genotype†	R1 Ratio	R2 Ratio	MSI status (HT17)‡	Nb. mutated target genes	MMR gene affected (IHC)
<i>False-negative pentaplex</i>								
PA-059	1/5	MSS	143/145/146	NA	NA	MSI	ND	MSH2
AU-198	1/5	MSS	141/146	NA	NA	MSI	ND	MLH1
PA-025	0/5	MSS	142/145/146	NA	NA	MSI	ND	MSH6
PA-035	1/5	MSS	142/145	NA	NA	MSI	ND	MSH2
PA-036	0/5	MSS	142/145	NA	NA	MSI	ND	MSH2
PA-050	0/5	MSS	142/145	NA	NA	MSI	ND	MSH2
PA-052	0/5	MSS	142/146	NA	NA	MSI	ND	MLH1
PA-129	1/5	MSS	140/145	NA	NA	MSI	ND	MSH2
PA-142	1/5	MSS	142/146	NA	NA	MSI	ND	MLH1
PA-130	1/5	MSS	145/146	0.17	0.42	MSI (R)	ND	MLH1
PA-131	0/5	MSS	145	0.14	0.52	MSI (R)	ND	MSH2
PA-143	0/5	MSS	145	0.14	0.53	MSI (R)	ND	MLH1
AU-070	0/5	MSS	145/146	0.25	0.65	MSI (R)	ND	MLH1
AU-235	1/5	MSS	145/146	0.24	0.61	MSI (R)	ND	MLH1
<i>Doubtful pentaplex</i>								
AU-154	1/1	MSI/Doubtful	144/145	NA	NA	MSI	2	MLH1
AU-426	1/2	MSI/Doubtful	141/143/146	NA	NA	MSI	2	ND
AU-441	1/2	MSI/Doubtful	140/143/146	NA	NA	MSI	2	ND
AU-452	1/3	MSI/Doubtful	144/145	NA	NA	MSI	1	ND
AU-413	1/4	MSI/Doubtful	145/146	NA	NA	MSS	0	ND
AU-440	1/3	MSI/Doubtful	146	NA	NA	MSS	0	ND
<i>False-negative HT17</i>								
PA-072	4/5	MSI	146	0.14	0.29	MSS	8	MLH1
AU-001	3/3	MSI	146	ND	0.34	MSS	1	ND
AU-423	2/3	MSI	146	ND	0.24	MSS	1	ND
AU-432	2/3	MSI	146	0.11	0.42	MSS	3	ND

*In this study, we assessed the sensitivity and specificity of HT17 for detecting MSI in a multicentre, population-based cohort of 685 patients with CRC. All cases were screened earlier for MSI using pentaplex markers and then tested for HT17 status independently and blinded to previous results from pentaplex genotyping. This table lists all cases from the cohort of 685 patients with CRC that showed discordant HT17/pentaplex results. They include 14 false-negative cases with pentaplex markers, 6 cases annotated as uncertain with pentaplex markers and 4 false-negative cases with HT17.

†HT17 genotypes are identified by PCR fragments length (in base pairs). Mutated alleles are underlined.

‡MSI (R): Profile with no aberrant signal (within the QMVR of HT17) but displaying an aberrant ratio (143/145 and 144/45).

CRC, colorectal cancer; IHC, immunohistochemistry; MMR, mismatch repair; MSI, microsatellite instability; NA, non-applicable (sample showing an aberrant peak outside QMVR); ND, not determined; QMVR, quasi-monomorphic variation range.

One of these 70 tumours was classified as MSI/uncertain with the pentaplex panel (see online Supplementary table S1) and showed aberrant HT17 profiles (see online supplementary table S1 and [table 4](#), sample PAL-001). This patient showed loss of MLH1 expression in the primary tumour by IHC and was confirmed to be from a LS patient due to the presence of a deleterious germline mutation in MLH1 ([table 4](#) and data not shown).

Finally, one case with unambiguous MSI status with the pentaplex panel showed no aberrant HT17 profile (see online supplementary table S1 and [table 4](#)). It displayed high levels of contamination with normal DNA (data not shown). LS was confirmed in this patient by the detection of a deleterious germline mutation in the MSH6 gene ([table 4](#), sample PAL-025 and data not shown).

DISCUSSION

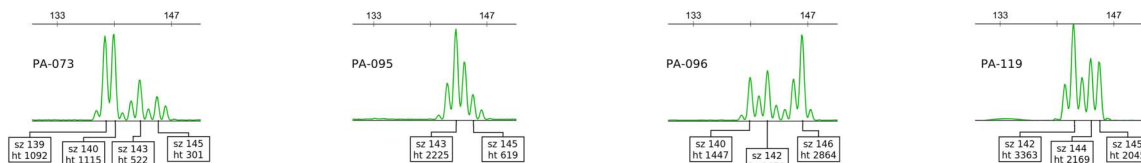
There are increasing calls to identify individuals with LS through universal testing of colon tumours for the distinctive molecular features associated with MMR defects. Currently, two standard reference methods are recommended to detect tumour MMR deficiency: MSI by PCR and loss of MMR protein expression by IHC.⁶ The aim of this study was to investigate whether it may be possible to improve the detection of MSI in CRC. HT17 was found to be highly monomorphic, showing a

narrower QMVR than all five pentaplex markers used routinely in the clinic. It displayed only two different germline alleles in 99.7% of individuals from the same HGDP-CEPH panel used previously to genotype the pentaplex markers. Moreover, HT17 was significantly more sensitive than the pentaplex method for the detection of MSI, while having the same high level of specificity. This was demonstrated in a large, multicentre and population-based cohort of 685 patients with CRC who were not selected for age or family history. Finally, the ability of HT17 alone to detect MSI was confirmed in an independent series of 70 CRC samples derived from patients at high risk of LS. Overall, these results indicate the exceptional relevance of HT17 as a marker for the detection of MSI in colon tumours and hence also as a screening tool for the diagnosis of LS in patients with CRC.

The extremely high sensitivity of HT17 for MSI is due to its quasi monomorphism. This property allows the detection of even very small somatic changes, such as the one base pair insertion/deletion mutation, that arise in tumour DNA because of defective MMR. We postulate that the lack of germline variation in HT17 is primarily due to its demonstrated functional role in *HSP110* splicing.¹⁸ The exceptional conservation of HT17 in germline DNA allowed us to refine the interpretation of HT17 profiles in colon tumours by developing a quantitative method

Cancer genetics

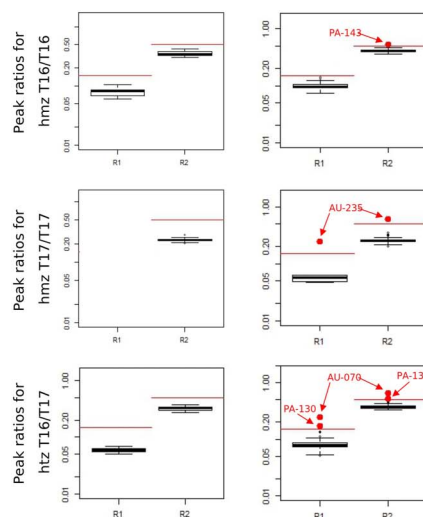
A MSI cases



B

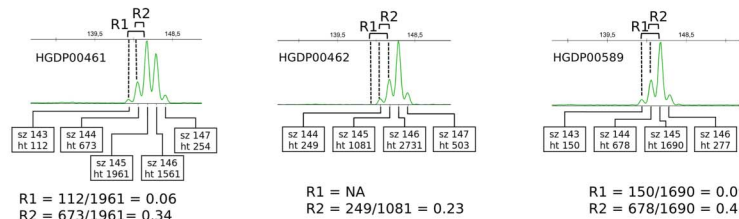
Normal cases

MSS



C

Normal Cases

 $R1 \leq 0.15$
 $R2 \leq 0.5$


Aberrant Cases

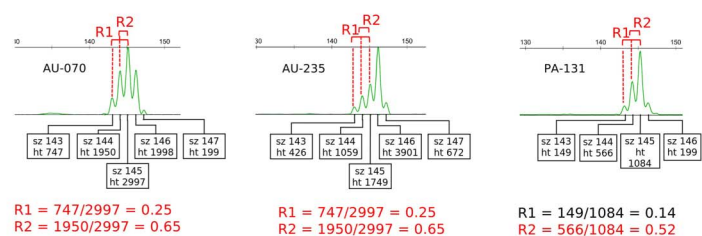
 $R1 > 0.15$
 $R2 > 0.5$


Figure 2 Analysis of discordant results between the pentaplex panel (false negatives) and HT17. (A) Four HT17 traces are shown, deriving from two samples that present with a low tumoral DNA content (PA-073 and PA-095) and two samples that present with a high tumoral DNA content (PA-096 and PA-119). (B) Distribution of R1 and R2 ratios for Human Genome Diversity panel-Centre d'Étude du Polymorphisme Humain (HGDP-CEPH) normal and the MSS series are plotted separately according to the three main genotypes for HT17. The red lines indicate thresholds for the determination of instability (0.15 for R1, 0.5 for R2). The red dots represent the position of five false-negative cases when microsatellite instability (MSI) was evaluated with the pentaplex panel. (C) Traces of three aberrant cases for the R1 and/or R2 ratios, plotted below traces of three normal samples (HGDP-CEPH panel) of the same genotype, are shown for comparison. The R1/R2 values shown in red exceed the respective thresholds.

termed MSI-Ratio. In contrast, microsatellite markers from the NCI and pentaplex panels are not endowed with any known biological activity and display frequent germline allelic variants.

These numerous variants impede the detection of short somatic deletions or insertions caused by defective MMR within their QMVRs, especially in early CRCs.^{15 17}

Table 3 Sensitivities, specificities and positive and negative predictive values for the determination of MSI by pentaplex markers and by HT17

Pentaplex cut-off*	Model estimator	Markers	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	PPV (95% CI)	NPV (95% CI)
Cut-off=2						
	Hasting–Metropolis	Pentaplex	0.95 (0.93 to 0.97)	1.00 (0.99 to 1.00)	1.00 (1.00 to 1.00)	0.96 (0.96 to 0.96)
		HT17	0.98 (0.97 to 0.99)	1.00 (0.99 to 1.00)	1.00 (1.00 to 1.00)	0.99 (0.98 to 0.99)
	Expectation–maximisation	Pentaplex	0.94	1	1	0.94
		HT17	0.99	1	1	0.99
		Cut-off=3				
	Hasting–Metropolis	Pentaplex	0.93 (0.90 to 0.96)	1.00 (0.99 to 1.00)	1.00 (1.00 to 1.00)	0.95 (0.95 to 0.95)
		HT17	0.99 (0.98 to 1.00)	1.00 (0.99 to 1.00)	1.00 (1.00 to 1.00)	0.99 (0.99 to 0.99)
	Expectation–maximisation	Pentaplex	0.94	1	1	0.94
		HT17	0.99	1	1	0.99

* The number of unstable markers that were used as a cut-off to define tumour samples as MSI with the pentaplex method. MSI, microsatellite instability.

Table 4 Comparative analysis of T17 and pentaplex for the detection of MSI in patients with CRC considered to be at-risk of Lynch syndrome

Sample name	MSI status (pentaplex)	MSI status (HT17)	MMR gene affected (IHC)
<i>Concordant pentaplex/HT17 status</i>			
PAL-002	MSI	MSI	MLH1
PAL-003	MSI	MSI	MSH2
PAL-004	MSI	MSI	MSH2
PAL-005	MSI	MSI	MLH1
PAL-006	MSI	MSI	MLH1
PAL-007	MSI	MSI	MLH1
PAL-008	MSI	MSI	MLH1
PAL-009	MSI	MSI	MLH1
PAL-010	MSI	MSI	MSH6
PAL-011	MSI	MSI	MSH2
PAL-012	MSI	MSI	MLH1 and MSH2
PAL-013	MSI	MSI	MLH1
PAL-014	MSI	MSI	MLH1
PAL-015	MSI	MSI	MMR-proficient
PAL-016	MSI	MSI	MSH2
PAL-017	MSI	MSI	MLH1
PAL-018	MSI	MSI	MLH1
PAL-019	MSI	MSI	MLH1
PAL-020	MSI	MSI	MSH2
PAL-021	MSI	MSI	MLH1
PAL-022	MSI	MSI	MSH2
PAL-023	MSI	MSI	MLH1
<i>Uncertain pentaplex status</i>			
PAL-001	MSI/Uncertain	MSI	MLH1
<i>False-negative pentaplex status</i>			
PAL-024	MSS	MSI	MSH2
<i>False-negative HT17 status</i>			
PAL-025	MSI	MSS	MSH6

CRC, colorectal cancer; IHC, immunohistochemistry; MMR, mismatch repair; MSI, microsatellite instability.

A major limitation for the routine detection of MSI using PCR is contamination of the tumour DNA with DNA from non-tumour cells. In this study, HT17 allowed the diagnosis of MSI in 15 primary tumours that were not detected by the pentaplex panel. Fourteen of these samples displayed high levels of contamination with normal DNA, thus highlighting the utility of HT17 for the detection of MSI in this situation. The five MSI samples in which an aberrant HT17 profile was not detected also displayed very low tumour DNA content, illustrating the need for a minimum tumour cell content with this marker as well. Another limitation encountered in routine screening for MSI relates to the detection of rare germline allelic variants outside QMVRs, thus mimicking MSI.^{15 17} Consequently, aberrant variants must be observed in several markers in order to correctly diagnose MSI in a given sample, although the minimum number of unstable markers remains controversial. Our genotype analysis of the HT17 showed that allelic variants outside QMVRs are extremely rare, thus explaining its exceptional specificity even when used alone.

In conclusion, the HT17 profile in tumour DNA is easy to read and interpret, in contrast to the pentaplex markers. The quasi-monomorphism of HT17 is likely to explain the very high sensitivity and specificity of this single marker for the detection of MSI in CRC. Recently, it was reported that MSI status predicted clinical benefit of immune checkpoint blockade with

pembrolizumab, an anti-programmed death 1 immune checkpoint inhibitor, in metastatic patients. These recent findings highlight the clinical interest to phenotype MSI colon tumours using a simple, highly sensitive and specific method. We recommend that HT17 be used alongside the standard pentaplex or NCI panels to identify MSI status. This combined approach should provide maximum sensitivity and therefore clinical benefit, particularly when screening for MSI in samples that are highly contaminated with normal DNA.

Author affiliations

- ¹INSERM, UMRS 938—Centre de Recherche Saint-Antoine, Equipe 'Instabilité des Microsatellites et Cancers', Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer, Paris, France
- ²Université Pierre et Marie Curie, Paris, France
- ³Centre de Mathématiques Appliquées, Ecole Polytechnique and CNRS UMR 7641, 91128 Palaiseau, France
- ⁴Programme 'Cartes d'Identité des Tumeurs', Ligue Nationale Contre le Cancer, Paris, France
- ⁵AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Paris, France
- ⁶Fondation Jean Dausset-CEPH, Paris, France
- ⁷AP-HP, Service de Chirurgie Générale et Digestive, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France
- ⁸Burgundy Cancer Registry, INSERM U866, Burgundy University, Dijon University Hospital, Dijon, France
- ⁹Faculty of Medicine, INSERM UMR 866, University of Burgundy, Dijon, France
- ¹⁰INSERM, U682, Développement et Physiopathologie de l'Intestin et du Pancréas, Strasbourg, France
- ¹¹INSERM, Unité 563, Centre de Recherche sur le Cancer de Toulouse, France
- ¹²Bendat Family Comprehensive Cancer Centre, St John of God HealthCare, Subiaco, Australia
- ¹³School of Surgery M507, University of Western Australia, Nedlands, Australia
- ¹⁴Cancer Science Institute of Singapore, National University of Singapore, Singapore, Singapore
- ¹⁵Centre de lutte contre le cancer George-François Leclerc, Dijon, France
- ¹⁶AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Laboratoire Commun de Biologie et Génétique Moléculaires, Paris, France
- ¹⁷AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Service d'oncologie médicale, Paris, France

Contributors Conception and design: AD. Collection and assembly of data: OB, AL, AC, MC, EG, MS, KG and OL. Data analysis and interpretation: AD, AG, OB and AC. Manuscript writing, revision and review: AD, AC, OB and BI.

Funding This work was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer and by grants from the 'Institut National du Cancer' (INCa). AD group has the label 'La Ligue Contre le Cancer'. AC is a recipient of an INCa fellowship.

Competing interests None declared.

Patient consent Obtained.

Ethics approval The institutional review board/ethics committee of the participating centres approved this study.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

REFERENCES

- 1 Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin PK, Jarvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, Petersen GM, Kinzler KW, Vogelstein B, et al de la Chapelle A. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993;260:812–16.
- 2 Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993;75:1027–38.
- 3 Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993;363:558–61.
- 4 Duval A, Hamelin R. Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Res* 2002;62:2447–54.
- 5 Colas C, Coulet F, Svrcek M, Collura A, Fléjou JF, Duval A, Hamelin R. Lynch or not Lynch? Is that always a question? *Adv Cancer Res* 2012;113:121–66.
- 6 Stoffel EM, Mangu PB, Gruber SB, Hamilton SR, Kalady MF, Lau MW, Lu KH, Roach N, Limburg PJ, American Society of Clinical Oncology; European Society of Clinical Oncology. Hereditary colorectal cancer syndromes: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline endorsement of the familial risk-colorectal cancer: European Society for Medical Oncology Clinical Practice Guidelines. *J Clin Oncol* 2015;33:209–17.

Cancer genetics

- 7 Vasen HF, Moslein G, Alonso A, Bernstein I, Bertario L, Blanco I, Burn J, Capella G, Engel C, Frayling I, Friedl W, Hes FJ, Hodgson S, Mecklin JP, Möller P, Nagengast F, Parc Y, Renkonen-Sinisalo L, Sampson JR, Stormorken A, Wijnen J. Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer). *J Med Genet* 2007;44:353–62.
- 8 Gruber SB. New developments in Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) and mismatch repair gene testing. *Gastroenterology* 2006;130:577–87.
- 9 Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, Hamilton SR, Laurent-Puig P, Gryfe R, Shepherd LE, Tu D, Redston M, Gallinger S. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003;349:247–57.
- 10 Carethers JM, Smith EJ, Behling CA, Nguyen L, Tajima A, Doctolero RT, Cabrera BL, Goel A, Arnold CA, Miyai K, Boland CR. Use of 5-fluorouracil and survival in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. *Gastroenterology* 2004;126:394–401.
- 11 Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, Thibodeau SN, Labianca R, Hamilton SR, French AJ, Kabat B, Foster NR, Torri V, Ribic C, Grothey A, Moore M, Zaniboni A, Seitz JF, Sinicrope F, Gallinger S. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:3219–26.
- 12 Suraweera N, Duval A, Reperant M, Vaury C, Furlan D, Leroy K, Seruca R, Iacopetta B, Hamelin R. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology* 2002;123:1804–11.
- 13 Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:5248–57.
- 14 Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, Fishel R, Lindor NM, Burgart LJ, Hamelin R, Hamilton SR, Hiatt RA, Jass J, Lindblom A, Lynch HT, Peltomäki P, Ramsey SD, Rodriguez-Bigas MA, Vasen HF, Hawk ET, Barrett JC, Freedman AN, Srivastava S. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:261–8.
- 15 Buhard O, Cattaneo F, Wong YF, Yim SF, Friedman E, Fléjou JF, Duval A, Hamelin R. Multipopulation analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability status of human tumors. *J Clin Oncol* 2006;24:241–51.
- 16 Xicola RM, Llor X, Pons E, Castells A, Alenda C, Piñol V, Andreu M, Castellví-Bel S, Payá A, Jover R, Bessa X, Girós A, Duque JM, Nicolás-Pérez D, García AM, Rigau J, Gassull MA, Gastrointestinal Oncology Group of the Spanish Gastroenterological Association. Performance of different microsatellite marker panels for detection of mismatch repair-deficient colorectal tumors. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:244–52.
- 17 Goel A, Nagasaka T, Hamelin R, Boland CR. An optimized pentaplex PCR for detecting DNA mismatch repair-deficient colorectal cancers. *PLoS ONE* 2010;5:e9393.
- 18 Dorard C, de Thonel A, Collura A, Marisa L, Svrcek M, Lagrange A, Jegou G, Wanherdrick K, Joly AL, Buhard O, Gobbo J, Penard-Lacronique V, Zouali H, Tubacher E, Kirzin S, Selves J, Milano G, Etienne-Grimaldi MC, Bengrine-Lefèvre L, Louvet C, Tournigand C, Lefèvre JH, Parc Y, Tiet E, Fléjou JF, Gaub MP, Garrido C, Duval A. Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. *Nat Med* 2011;17:1283–9.
- 19 Collura A, Lagrange A, Svrcek M, Marisa L, Buhard O, Guilloix A, Wanherdrick K, Dorard C, Taieb A, Saget A, Loh M, Soong R, Zeps N, Platell C, Mews A, Iacopetta B, De Thonel A, Seigneuric R, Marcion G, Chapusot C, Lepage C, Bouvier AM, Gaub MP, Milano G, Selves J, Senet P, Delarue P, Arzouk H, Lacoste C, Coquelle A, Bengrine-Lefèvre L, Tournigand C, Lefèvre JH, Parc Y, Biard DS, Fléjou JF, Garrido C, Duval A. Patients with colorectal tumors with microsatellite instability and large deletions in HSP110 T17 have improved response to 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Gastroenterology* 2014;146:401–11.e1.
- 20 Cann HM, de Toma C, Cazes L, Legrand MF, Morel V, Piouffre L, Bodmer J, Bodmer WF, Bonne-Tamir B, Cambon-Thomsen A, Chen Z, Chu J, Carcassi C, Contu L, Du R, Excoffier L, Ferrara GB, Friedlaender JS, Groot H, Gurwitz D, Jenkins T, Herrera RJ, Huang X, Kidd J, Kidd KK, Langaney A, Lin AA, Mehdi SQ, Parham P, Piazza A, Pistillo MP, Qian Y, Shu Q, Xu J, Zhu S, Weber JL, Greely HT, Feldman MW, Thomas G, Dausset J, Cavalli-Sforza LL. A human genome diversity cell line panel. *Science* 2002;296:261–2.
- 21 Svrcek M, El-Bchiri J, Chalastanis A, Capel E, Dumont S, Buhard O, Oliveira C, Seruca R, Bossard C, Mosnier JF, Berger F, Leteurtre E, Lavergne-Slove A, Chenard MP, Hamelin R, Cosnes J, Beaugerie L, Tiet E, Duval A, Fléjou JF. Specific clinical and biological features characterize inflammatory bowel disease associated colorectal cancers showing microsatellite instability. *J Clin Oncol* 2007;25:4231–8.
- 22 Joseph L, Gyorkos TW, Coupal L. Bayesian estimation of disease prevalence and the parameters of diagnostic tests in the absence of a gold standard. *Am J Epidemiol* 1995;141:263–72.
- 23 Hui SL, Walter SD. Estimating the error rates of diagnostic tests. *Biometrics* 1980;36:167–71.
- 24 Hastings WK. Monte Carlo sampling methods using Markov chains and their applications. *Biometrika* 1970;57:97–109.
- 25 Dempster AP, Laird NM, Rubin DB. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *J R Stat Soc* 1977;39:1–38.



HSP110 T17 simplifies and improves the microsatellite instability testing in patients with colorectal cancer

Olivier Buhard, Anaïs Lagrange, Agathe Guilloux, Chrystelle Colas, Mouna Chouchène, Kristell Wanherdrick, Florence Coulet, Erell Guillerm, Coralie Dorard, Laetitia Marisa, Adem Bokhari, Malorie Greene, Nizar El-Murr, Sahra Bodo, Martine Muleris, Isabelle Sourouille, Magali Svrcek, Pascale Cervera, Hélène Blanché, Jérémie H Lefevre, Yann Parc, Come Lepage, Caroline Chapusot, Anne-Marie Bouvier, Marie-Pierre Gaub, Janick Selves, Kerry Garrett, Barry Iacopetta, Richie Soong, Richard Hamelin, Carmen Garrido, Olivier Lascols, Thierry André, Jean-François Fléjou, Ada Collura and Alex Duval

J Med Genet 2016 53: 377-384 originally published online February 1, 2016

doi: 10.1136/jmedgenet-2015-103518

Updated information and services can be found at:
<http://jmg.bmj.com/content/53/6/377>

These include:

Supplementary Material

Supplementary material can be found at:
<http://jmg.bmj.com/content/suppl/2016/01/31/jmedgenet-2015-103518.DC1>

References

This article cites 25 articles, 10 of which you can access for free at:
<http://jmg.bmj.com/content/53/6/377#BIBL>

Email alerting service

Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up in the box at the top right corner of the online article.

Topic Collections

Articles on similar topics can be found in the following collections

[Colon cancer](#) (131)
[Screening \(oncology\)](#) (234)
[Epidemiology](#) (630)

Notes

To request permissions go to:
<http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>

To order reprints go to:
<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to BMJ go to:
<http://group.bmj.com/subscribe/>

BIBLIOGRAPHIE

1. Dorard, C. *et al.* Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. *Nat. Med.* **17**, 1283–9 (2011).
2. Collura, A. *et al.* Patients with colorectal tumors with microsatellite instability and large deletions in HSP110 T17 have improved response to 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Gastroenterology* **146**, (2014).
3. Ionov, Y., Peinado, M. a, Malkhosyan, S., Shibata, D. & Perucho, M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* **363**, 558–561 (1993).
4. Aaltonen, L. A. *et al.* Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science (80-)*. **260**, 812–816 (1993).
5. Thibodeau, S. N., Bren, G. & Schaid, D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science (80-)*. **260**, 816–819 (1993).
6. Fearon, E. R. & Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759–767 (1990).
7. Boland, C. R. *et al.* A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: Development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. in *Cancer Research* **58**, 5248–5257 (1998).
8. Ellegren, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat. Rev.* **5**, 435–445 (2004).
9. Modrich, P. & Lahue, R. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 101–33 (1996).
10. Glickman, B. W. & Radman, M. Escherichia coli mutator mutants deficient in methylation-instructed DNA mismatch correction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 1063–1067 (1980).
11. Radman, M. & Wagner, R. Mismatch repair in Escherichia coli. *Annu. Rev. Genet.* **20**, 523–538 (1986).
12. Li, S. K. H. & Martin, A. Mismatch Repair and Colon Cancer: Mechanisms and Therapies Explored. *Trends in Molecular Medicine* **22**, 274–289 (2016).
13. Jass, J. R. Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer: the rise and fall of a confusing term. *World J. Gastroenterol.* **12**, 4943–50 (2006).
14. Lagerstedt Robinson, K. *et al.* Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) diagnostics. *J. Natl. Cancer Inst.* **99**, 291–299 (2007).
15. El-Bchiri, J. *et al.* Nonsense-mediated mRNA decay impacts MSI-driven carcinogenesis and anti-tumor immunity in colorectal cancers. *PLoS One* **3**, (2008).
16. Woerner, S. M. *et al.* Microsatellite instability of selective target genes in HNPCC-associated colon adenomas. *Oncogene* **24**, 2525–2535 (2005).
17. Imai, K. & Yamamoto, H. Carcinogenesis and microsatellite instability: The interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis* **29**, 673–680 (2008).
18. Duval, A. & Hamelin, R. Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: Toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Research* **62**, 2447–2454 (2002).
19. Yamamoto, H. & Imai, K. Microsatellite instability: an update. *Archives of Toxicology* **89**, 899–921 (2015).
20. Woerner, S. M. *et al.* SelTarbase, a database of human mononucleotide-microsatellite mutations and their potential impact to tumorigenesis and immunology. *Nucleic Acids Res.* **38**, (2009).
21. Woerner, S. M. *et al.* Pathogenesis of DNA repair-deficient cancers: a statistical meta-analysis of putative Real Common Target genes. *Oncogene* **22**, 2226–2235 (2003).
22. Metzker, M. L. Sequencing technologies - the next generation. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 31–46 (2010).
23. Kim, T. M., Laird, P. W. & Park, P. J. The landscape of microsatellite instability in colorectal and endometrial cancer genomes. *Cell* **155**, (2013).
24. Sia, E. A., Kokoska, R. J., Dominska, M., Greenwell, P. & Petes, T. D. Microsatellite instability in yeast: dependence on repeat unit size and DNA mismatch repair genes. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2851–8 (1997).
25. Kondelin, J. *et al.* Comprehensive evaluation of protein coding mononucleotide microsatellites in microsatellite-unstable colorectal cancer. *Cancer Res.* canres.0682.2017 (2017). doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-0682
26. Duval, A. *et al.* Target gene mutation profile differs between gastrointestinal and endometrial tumors with mismatch repair deficiency. *Cancer Res.* **62**, 1609–1612 (2002).
27. Buisine, M. P. *et al.* Frequent mutations of the CA simple sequence repeat in intron 1 of EGFR in mismatch repair-deficient colorectal cancers. *World J. Gastroenterol.* **14**, 1053–1059 (2008).

28. Hienonen, T. *et al.* Mutations in two short noncoding mononucleotide repeats in most microsatellite-unstable colorectal cancers. *Cancer Res.* **65**, 4607–4613 (2005).
29. Hugo, H. *et al.* Mutations in the MYB intron 1 regulatory sequence increase transcription in colon cancers. *Genes Chromosom. Cancer* **45**, 1143–1154 (2006).
30. Biroccio, A. *et al.* c-Myb and Bcl-x overexpression predicts poor prognosis in colorectal cancer: clinical and experimental findings. *Am. J. Pathol.* **158**, 1289–1299 (2001).
31. Giannini, G. *et al.* Mutations of an intronic repeat induce impaired MRE11 expression in primary human cancer with microsatellite instability. *Oncogene* **23**, 2640–2647 (2004).
32. Ottini, L. *et al.* MRE11 expression is impaired in gastric cancer with microsatellite instability. *Carcinogenesis* **25**, 2337–2343 (2004).
33. Kim, H. S., Choi, S. I., Min, H. L., Kim, M. A. & Kim, W. H. Mutation at intronic repeats of the ataxia-telangiectasia mutated (ATM) gene and ATM protein loss in primary gastric cancer with microsatellite instability. *PLoS One* **8**, (2013).
34. Ejima, Y., Yang, L. & Sasaki, M. S. Aberrant splicing of the ATM gene associated with shortening of the intronic mononucleotide tract in human colon tumor cell lines: A novel mutation target of microsatellite instability. *Int. J. Cancer* **86**, 262–268 (2000).
35. Morán, A. *et al.* Stromelysin-1 promoter mutations impair gelatinase B activation in high microsatellite instability sporadic colorectal tumors. *Cancer Res.* **62**, 3855–3860 (2002).
36. Suraweera, N. *et al.* Conservation of mononucleotide repeats within 3' and 5' untranslated regions and their instability in MSI-H colorectal cancer. *Oncogene* **20**, 7472–7 (2001).
37. Yoon, K. *et al.* Comprehensive genome- and transcriptome-wide analyses of mutations associated with microsatellite instability in Korean gastric cancers. *Genome Res.* **23**, 1109–1117 (2013).
38. Domingo, E. *et al.* Activated BRAF Targets Proximal Colon Tumors with Mismatch Repair Deficiency and MLH1 Inactivation. *Genes Chromosom. Cancer* **39**, 138–142 (2004).
39. Løvig, T. *et al.* APC and CTNNB1 mutations in a large series of sporadic colorectal carcinomas stratified by the microsatellite instability status. *Scand. J. Gastroenterol.* **37**, 1184–1193 (2002).
40. Salahshor, S. *et al.* Colorectal cancer with and without microsatellite instability involves different genes. *Genes Chromosom. Cancer* **26**, 247–252 (1999).
41. Mirabelli-Primdahl, L. *et al.* β -Catenin mutations are specific for colorectal carcinomas with microsatellite instability but occur in endometrial carcinomas irrespective of mutator pathway. *Cancer Res.* **59**, 3346–3351 (1999).
42. Miyaki, M. *et al.* Frequent mutation of beta-catenin and APC genes in primary colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res* **59**, 4506–4509 (1999).
43. Fang, D. *et al.* Mutation analysis of APC gene in gastric cancer with microsatellite instability. *World J. Gastroenterol.* **8**, 787–91 (2002).
44. Samowitz, W. S. *et al.* Inverse relationship between microsatellite instability and K-ras and p53 gene alterations in colon cancer. *Am. J. Pathol.* **158**, 1517–24 (2001).
45. Kim, G. P. *et al.* Prognostic and predictive roles of high-degree microsatellite instability in colon cancer: a National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Collaborative Study. *J. Clin. Oncol.* **25**, 767–72 (2007).
46. Leslie, A., Carey, F. A., Pratt, N. R. & Steele, R. J. C. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *British Journal of Surgery* **89**, 845–860 (2002).
47. Oliveira, C. *et al.* BRAF mutations characterize colon but not gastric cancer with mismatch repair deficiency. *Oncogene* **22**, 9192–6 (2003).
48. Van Grieken *et al.* KRAS and BRAF mutations are rare and related to DNA mismatch repair deficiency in gastric cancer from the East and the West: results from a large international multicentre study. *Br J Cancer.* **108**, 1495–1501 (2013).
49. Corso, G. *et al.* Oncogenic mutations in gastric cancer with microsatellite instability. *Eur. J. Cancer* **47**, 443–451 (2011).
50. Funkhouser, W. K. *et al.* Relevance, Pathogenesis, and testing algorithm for mismatch repair-defective colorectal carcinomas: A report of the association for molecular pathology. *J. Mol. Diagnostics* **14**, 91–103 (2012).
51. Velho, S. *et al.* Mixed lineage kinase 3 gene mutations in mismatch repair deficient gastrointestinal tumours. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 697–706 (2010).
52. Velho, S. *et al.* The prevalence of PIK3CA mutations in gastric and colon cancer. *Eur. J. Cancer* **41**, 1649–1654 (2005).
53. Gylfe, A. E. *et al.* Identification of candidate oncogenes in human colorectal cancers with microsatellite instability. *Gastroenterology* **145**, (2013).
54. Tuupanen, S. *et al.* Identification of 33 candidate oncogenes by screening for base-specific

- mutations. *Br J Cancer* **111**, 1657–1662 (2014).
55. Cortes-Ciriano, I., Lee, S., Park, W.-Y., Kim, T.-M. & Park, P. A molecular portrait of microsatellite instability across multiple cancers. *bioRxiv* **8**, 1–12 (2016).
 56. J, P. Distribution of somatic mutations of cancer-related genes according to microsatellite instability status in Korean gastric cancer. *Med. (Baltimore)*. **96**, (2017).
 57. Marisa, L. *et al.* Gene Expression Classification of Colon Cancer into Molecular Subtypes: Characterization, Validation, and Prognostic Value. *PLoS Med.* **10**, (2013).
 58. Guinney, J. *et al.* The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat. Med.* **21**, 1350–1356 (2015).
 59. Bass, A. J. *et al.* Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* **513**, 202–9 (2014).
 60. Warthin, A. S. Classics in oncology: Heredity with reference to carcinoma as shown by the study of the cases examined in the pathological laboratory of the university of michigan, 1895-1913. *CA. Cancer J. Clin.* **35**, 348–349 (1985).
 61. Lynch, H. T., Shaw, M. W., Magnuson, C. W., Larsen, A. L. & Krush, A. J. Hereditary Factors in Cancer Study of Two Large Midwestern Kindreds. *Arch. Intern. Med.* **117**, 206–212 (1966).
 62. Peltomäki, P. Lynch syndrome genes. *Fam. Cancer* **4**, 227–232 (2005).
 63. Knudson, A. G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **68**, 820–3 (1971).
 64. Plazzer, J. P. *et al.* The InSiGHT database: Utilizing 100 years of insights into Lynch Syndrome. *Fam. Cancer* **12**, 175–180 (2013).
 65. Hitchins, M. P. & Ward, R. L. Constitutional (germline) MLH1 epimutation as an aetiological mechanism for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* **46**, 793–802 (2009).
 66. Chan, T. L. *et al.* Heritable germline epimutation of MSH2 in a family with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* **38**, 1178–1183 (2006).
 67. Ligtenberg, M. J. L. *et al.* Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat. Genet.* **41**, 112–117 (2009).
 68. Sehgal, R. *et al.* Lynch Syndrome: An updated review. *Genes (Basel)*. **5**, 497–507 (2014).
 69. AM, B.-C. A comparison between Lynch syndrome and sporadic colorectal cancer survivors' satisfaction with their healthcare providers. *Cancer Med.* **6**, 698–707 (2017).
 70. Bansidhar, B. J. Extracolonic manifestations of lynch syndrome. *Clin. Colon Rectal Surg.* **25**, 103–110 (2012).
 71. Miyaki, M. Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet.* **17**, 271–272 (1997).
 72. S, G. Lynch Syndrome Associated With PMS2 Mutation: Understanding Current Concepts. *Gastrointest Cancer Res.* **4**, 188–190 (2011).
 73. Ramsoek, D., van Leerdam, M. E., Wagner, A., Kuipers, E. J. & Steyerberg, E. W. Mutation prediction models in Lynch syndrome: evaluation in a clinical genetic setting. *J. Med. Genet.* **46**, 745–751 (2009).
 74. Watson, P. *et al.* The risk of extra-colonic, extra-endometrial cancer in the Lynch syndrome. *Int. J. Cancer* **123**, 444–449 (2008).
 75. Lin-Hurtubise, K. M., Yheulon, C. G., Gagliano, R. A. & Lynch, H. T. Excess of extracolonic non-endometrial multiple primary cancers in MSH2 germline mutation carriers over MLH1. *J. Surg. Oncol.* **108**, 433–437 (2013).
 76. Ligtenberg, M. J. L., Kuiper, R. P., Geurts Van Kessel, A. & Hoogerbrugge, N. EPCAM deletion carriers constitute a unique subgroup of Lynch syndrome patients. *Familial Cancer* **12**, 169–174 (2013).
 77. Baglietto, L. *et al.* Risks of lynch syndrome cancers for msh6 mutation carriers. *J. Natl. Cancer Inst.* **102**, 193–201 (2010).
 78. Bonadona, V. *et al.* Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 Genes in Lynch Syndrome. *J. Am. Med. Assoc.* **305**, 2304–2310 (2011).
 79. Senter, L. *et al.* The Clinical Phenotype of Lynch Syndrome Due to Germ-Line PMS2 Mutations. *Gastroenterology* **135**, (2008).
 80. Lynch, H. T. *et al.* Review of the Lynch syndrome: History, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clinical Genetics* **76**, 1–18 (2009).
 81. Messerini, L., Mori, S. & Zampi, G. Pathologic features of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Tumori* **82**, 114–116 (1996).
 82. Schneider, R., Fürst, A. & Möslin, G. Lynch syndrome epidemiology, clinical features, molecular genetics, screening, therapy. *Z. Gastroenterol.* **50**, 217–225 (2012).
 83. Rijcken, F. E. M., Hollema, H. & Kleibeuker, J. H. Proximal adenomas in hereditary non-polyposis

- colorectal cancer are prone to rapid malignant transformation. *Gut* **50**, 382–6 (2002).
84. Jass, J. R. *et al.* Pathology of hereditary non-polyposis colorectal cancer. in *Anticancer Research* **14**, 1631–1634 (1994).
 85. Edelstein, D. L. *et al.* Rapid Development of Colorectal Neoplasia in Patients With Lynch Syndrome. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **9**, 340–343 (2011).
 86. Winawer, S. *et al.* Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale-Update based on new evidence. *Gastroenterology* **124**, 544–560 (2003).
 87. Stigliano, V. *et al.* Survival of hereditary non-polyposis colorectal cancer patients compared with sporadic colorectal cancer patients. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **27**, 39 (2008).
 88. Kohlmann, W. & Gruber, S. B. *Lynch Syndrome*. *GeneReviews*(®) (1993).
 89. Capelle, L. G. *et al.* Risk and Epidemiological Time Trends of Gastric Cancer in Lynch Syndrome Carriers in The Netherlands. *Gastroenterology* **138**, 487–492 (2010).
 90. Lauren, P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. *Acta Pathol Microbiol Scand* **64**, 31–49 (1965).
 91. HF, V. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* **34**, 424–425 (1991).
 92. Vasen, H. F. *et al.* New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* **116**, 1453–6 (1999).
 93. Rodriguez-Bigas, M. A. *et al.* A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: Meeting Highlights and Bethesda Guidelines. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **89**, 1758–1762 (1997).
 94. Umar, A. *et al.* Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J. Natl. Cancer Inst.* **96**, 261–8 (2004).
 95. Boland, C. R. & Shike, M. Report From the Jerusalem Workshop on Lynch Syndrome- Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer C. *Gastroenterology* **138**, 1–7 (2010).
 96. Weisenberger, D. J. *et al.* CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat. Genet.* **38**, 787–793 (2006).
 97. Veigl, M. L. *et al.* Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 8698–702 (1998).
 98. Mensenkamp, A. R. *et al.* Somatic mutations in MLH1 and MSH2 are a frequent cause of mismatch-repair deficiency in lynch syndrome-like tumors. *Gastroenterology* **146**, (2014).
 99. Haraldsdottir, S. *et al.* Colon and endometrial cancers with mismatch repair deficiency can arise from somatic, rather than germline, mutations. *Gastroenterology* **147**, 1308–1316.e1 (2014).
 100. Cancer Genom Atlas. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* **487**, 330–337 (2012).
 101. Palles, C. *et al.* Germline mutations affecting the proofreading domains of POLE and POLD1 predispose to colorectal adenomas and carcinomas. *Nat. Genet.* **45**, 136–44 (2013).
 102. Valeri, N. *et al.* Modulation of mismatch repair and genomic stability by miR-155. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 6982–7 (2010).
 103. Li, F. *et al.* The histone mark H3K36me3 regulates human DNA mismatch repair through its interaction with MutSα. *Cell* **153**, 590–600 (2013).
 104. SR, M. Late onset and high incidence of colon cancer of the mutator phenotype with hypermethylated hMLH1 gene in women. *Gastroenterology*. **119**, 598 (2000).
 105. Boland, C. R. & Goel, A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology* **138**, (2010).
 106. Jass, J. R., Whitehall, V. L. J., Young, J. & Leggett, B. A. Emerging concepts in colorectal neoplasia. *Gastroenterology* **123**, 862–876 (2002).
 107. Mäkinen, M. J. Colorectal serrated adenocarcinoma. *Histopathology* **50**, 131–150 (2007).
 108. Chan, T. L., Zhao, W., Leung, S. Y. & Yuen, S. T. BRAF and KRAS mutations in colorectal hyperplastic polyps and serrated adenomas. *Cancer Res.* **63**, 4878–4881 (2003).
 109. Wang, L. *et al.* BRAF mutations in colon cancer are not likely attributable to defective DNA mismatch repair. *Cancer Res.* **63**, 5209–5212 (2003).
 110. Samowitz, W. S. *et al.* Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **10**, 917–923 (2001).
 111. Sinicrope, F. A. *et al.* Prognostic impact of microsatellite instability and DNA ploidy in human colon carcinoma patients. *Gastroenterology* **131**, 729–737 (2006).
 112. Popat, S., Hubner, R. & Houlston, R. S. Systematic review of microsatellite instability and

- colorectal cancer prognosis. *J. Clin. Oncol.* **23**, 609–618 (2005).
113. Roth, A. D. *et al.* Integrated analysis of molecular and clinical prognostic factors in stage II/III colon cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **104**, 1635–1646 (2012).
114. Koopman, M. *et al.* Deficient mismatch repair system in patients with sporadic advanced colorectal cancer. *Br. J. Cancer* **100**, 266–73 (2009).
115. Malesci, A. *et al.* Reduced likelihood of metastases in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* **13**, 3831–3839 (2007).
116. Venderbosch, S. *et al.* Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: A pooled analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies. *Clin. Cancer Res.* **20**, 5322–5330 (2014).
117. Goldstein, J. *et al.* Multicenter retrospective analysis of metastatic colorectal cancer (CRC) with high-level microsatellite instability (MSI-H). *Ann. Oncol.* **25**, 1032–1038 (2014).
118. Machado, A. M. D. *et al.* *Helicobacter pylori* infection induces genetic instability of nuclear and mitochondrial DNA in gastric cells. *Clin. Cancer Res.* **15**, 2995–3002 (2009).
119. Kim, J. J. *et al.* *Helicobacter pylori* impairs DNA mismatch repair in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* **123**, 542–553 (2002).
120. Yao, Y., Tao, H., Dong, I. P., Sepulveda, J. L. & Sepulveda, A. R. Demonstration and characterization of mutations induced by *Helicobacter pylori* organisms in gastric epithelial cells. *Helicobacter* **11**, 272–286 (2006).
121. V, M. *Helicobacter pylori* infection and expression of DNA mismatch repair proteins. *World J Gastroenterol* **14**, 6717–6721 (2008).
122. Di, P. Effect of *Helicobacter pylori* infection on the expression of DNA. *Helicobacter* **10**, 179–184 (2005).
123. An, J. Y. *et al.* Microsatellite instability in sporadic gastric cancer: Its prognostic role and guidance for 5-FU based chemotherapy after R0 resection. *Int. J. Cancer* **131**, 505–511 (2012).
124. Dos Santos, N. R., Seruca, R., Constancia, M., Seixas, M. & Sobrinho-Simoes, M. Microsatellite instability at multiple loci in gastric carcinoma: Clinicopathologic implications and prognosis. *Gastroenterology* **110**, 38–44 (1996).
125. Lee, H. S. *et al.* Distinct clinical features and outcomes of gastric cancers with microsatellite instability. *Mod. Pathol.* **15**, 632–640 (2002).
126. Beghelli, S. *et al.* Microsatellite instability in gastric cancer is associated with better prognosis in only stage II cancers. *Surgery* **139**, 347–356 (2006).
127. Kim, H. *et al.* High microsatellite instability predicts good prognosis in intestinal-type gastric cancers. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **26**, 585–592 (2011).
128. Shokal, U. & Sharma, P. C. Implication of microsatellite instability in human gastric cancers. *Indian J. Med. Res.* **135**, 599–613 (2012).
129. Buhard, O. *et al.* Multipopulation analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability status of human tumors. *J. Clin. Oncol.* **24**, 241–251 (2006).
130. Wong, Y. F. *et al.* Detection of microsatellite instability in endometrial cancer: Advantages of a panel of five mononucleotide repeats over the National Cancer Institute panel of markers. *Carcinogenesis* **27**, 951–955 (2006).
131. L, M. T([20]) repeat in the 3'-untranslated region of the MT1X gene: a marker with high sensitivity and specificity to detect microsatellite instability in colorectal cancer. *Int J Color. Dis.* **27**, 647–656 (2012).
132. S, K. 3'-UTR poly(T/U) tract deletions and altered expression of EWSR1 are a hallmark of mismatch repair-deficient cancers. *Cancer Res* **74**, 224–234 (2014).
133. J, K. 3'-UTR poly(T/U) repeat of EWSR1 is altered in microsatellite unstable colorectal cancer with nearly perfect sensitivity. *Fam Cancer* **14**, 449–453 (2015).
134. Buhard, O. *et al.* HSP110 T17 simplifies and improves the microsatellite instability testing in patients with colorectal cancer. *J. Med. Genet.* **110**, 1–8 (2016).
135. Richman, S. Deficient mismatch repair: Read all about it (Review). *International Journal of Oncology* **47**, 1189–1202 (2015).
136. Lindor, N. M. *et al.* Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J. Clin. Oncol.* **20**, 1043–1048 (2002).
137. C, H. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature* **179**, 663–666 (1957).
138. Longley, D. B., Harkin, D. P. & Johnston, P. G. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 330–338 (2003).
139. Jou, E. & Rajdev, L. Current and emerging therapies in unresectable and recurrent gastric

- cancer. *World J Gastroenterol* **22**, 4812–4823 (2016).
140. André, T. *et al.* Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N. Engl. J. Med.* **350**, 2343–51 (2004).
 141. Hammond, W. A., Swaika, A. & Mody, K. Pharmacologic resistance in colorectal cancer: a review. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **8**, 57–84 (2016).
 142. Hector, S., Bolanowska-Higdon, W., Zdanowicz, J., Hitt, S. & Pendyala, L. In vitro studies on the mechanisms of oxaliplatin resistance. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **48**, 398–406 (2001).
 143. Ychou, M. *et al.* A phase III randomised trial of LV5FU2 + irinotecan versus LV5FU2 alone in adjuvant high-risk colon cancer (FNCLCC Accord02/FFCD9802). *Ann. Oncol.* **20**, 674–680 (2009).
 144. Saltz, L. B. *et al.* Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N. Engl. J. Med.* **343**, 905–14 (2000).
 145. Cunningham, D. *et al.* Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **351**, 337–345 (2004).
 146. Kabbinavar, F. Phase II, Randomized Trial Comparing Bevacizumab Plus Fluorouracil (FU)/Leucovorin (LV) With FU/LV Alone in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* **21**, 60–65 (2003).
 147. van Cutsem, E., Nordlinger, B. & Cervantes, A. Advanced colorectal cancer: ESMO clinical practice guidelines for treatment. *Ann. Oncol.* **21**, (2010).
 148. Ychou, M. *et al.* Perioperative chemotherapy compared with surgery alone for resectable gastroesophageal adenocarcinoma: An FNCLCC and FFCD multicenter phase III trial. *J. Clin. Oncol.* **29**, 1715–1721 (2011).
 149. Yu, B. & Xie, J. Identifying therapeutic targets in gastric cancer: the current status and future direction. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **48**, 90–96 (2016).
 150. Cunningham, D. *et al.* Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *N Engl J Med* **355**, 11–20 (2006).
 151. Van Cutsem, E. *et al.* Phase III study of docetaxel and cisplatin plus fluorouracil compared with cisplatin and fluorouracil as first-line therapy for advanced gastric cancer: a report of the V325 Study Group. *J. Clin. Oncol.* **24**, 4991–7 (2006).
 152. M, D. Randomized phase III study comparing irinotecan combined with 5-fluorouracil and folinic acid to cisplatin combined with 5-fluorouracil in chemotherapy naive patients with advanced adenocarcinoma of the stomach or esophagogastric junction. *Ann Oncol.* **19**, 1450–1457 (2008).
 153. Bang, Y. J. *et al.* Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): A phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* **376**, 687–697 (2010).
 154. Ribic, C. M. *et al.* Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N. Engl. J. Med.* **349**, 247–57 (2003).
 155. Des Guez, G. *et al.* Microsatellite instability does not predict the efficacy of chemotherapy in metastatic colorectal cancer. A systematic review and meta-analysis. *Anticancer Research* **29**, 1615–1620 (2009).
 156. Oki, E. *et al.* Chemosensitivity and survival in gastric cancer patients with microsatellite instability. *Ann. Surg. Oncol.* **16**, 2510–5 (2009).
 157. Kim, S. Y. *et al.* The benefit of microsatellite instability is attenuated by chemotherapy in stage II and stage III gastric cancer: Results from a large cohort with subgroup analyses. *Int. J. Cancer* **137**, 819–825 (2015).
 158. Sinicrope, F. A. *et al.* DNA mismatch repair status and colon cancer recurrence and survival in clinical trials of 5-fluorouracil-based adjuvant therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* **103**, 863–875 (2011).
 159. Tajima, A., Hess, M. T., Cabrera, B. L., Kolodner, R. D. & Carethers, J. M. The mismatch repair complex hMutS α recognizes 5-fluorouracil-modified DNA: Implications for chemosensitivity and resistance. *Gastroenterology* **127**, 1678–1684 (2004).
 160. Jensen, S. a, Vainer, B., Kruhøffer, M. & Sørensen, J. B. Microsatellite instability in colorectal cancer and association with thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase expression. *BMC Cancer* **9**, 25 (2009).
 161. Donada, M. *et al.* Thymidylate synthase expression predicts longer survival in patients with stage II colon cancer treated with 5-fluorouracil independently of microsatellite instability. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **137**, 201–210 (2011).
 162. Ricciardiello, L. *et al.* High thymidylate synthase expression in colorectal cancer with microsatellite instability: Implications for chemotherapeutic strategies. *Clin. Cancer Res.* **11**, 4234–4240 (2005).
 163. T, A. Adjuvant Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin in Stage II to III Colon Cancer: Updated

- 10-Year Survival and Outcomes According to BRAF Mutation and Mismatch Repair Status of the MOSAIC Study. *J Clin Oncol.* **33**, 4176–4187 (2015).
164. Zaanan, a. *et al.* Defective Mismatch Repair Status as a Prognostic Biomarker of Disease-Free Survival in Stage III Colon Cancer Patients Treated with Adjuvant FOLFOX Chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* **17**, 7470–7478 (2011).
 165. Des Guez, G. *et al.* Prognostic impact of microsatellite instability in colorectal cancer patients treated with adjuvant FOLFOX. *Anticancer Res.* **30**, 4297–4301 (2010).
 166. Sinicrope, F. A. *et al.* Prognostic impact of deficient DNA mismatch repair in patients with stage III colon cancer from a randomized trial of FOLFOX-based adjuvant chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* **31**, 3664–3672 (2013).
 167. Fink, D. *et al.* The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Res.* **56**, 4881–4886 (1996).
 168. Fink, D. *et al.* In vitro and in vivo resistance to cisplatin in cells that have lost DNA mismatch repair. *Cancer Res.* **57**, 1841–1845 (1997).
 169. Bertagnolli, M. M. *et al.* Microsatellite instability predicts improved response to adjuvant therapy with irinotecan, fluorouracil, and leucovorin in stage III colon cancer: Cancer and leukemia group B protocol 89803. *J. Clin. Oncol.* **27**, 1814–1821 (2009).
 170. Klingbiel, D. *et al.* Prognosis of stage II and III colon cancer treated with adjuvant 5-fluorouracil or FOLFIRI in relation to microsatellite status: Results of the PETACC-3 trial. *Ann. Oncol.* **26**, 126–132 (2015).
 171. Jenkins, M. A. *et al.* Pathology Features in Bethesda Guidelines Predict Colorectal Cancer Microsatellite Instability: A Population-Based Study. *Gastroenterology* **133**, 48–56 (2007).
 172. Banerjee, A. *et al.* Colorectal cancers with microsatellite instability display mRNA expression signatures characteristic of increased immunogenicity. *Mol. Cancer* **3**, 21 (2004).
 173. Fridman, W. H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C. & Galon, J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 298–306 (2012).
 174. Blackburn, S. D. *et al.* Coregulation of CD8⁺ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat. Immunol.* **10**, 29–37 (2009).
 175. Le, D. T. *et al.* PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N. Engl. J. Med.* **372**, 2509–2520 (2015).
 176. R, C. Immunotherapy and patients treated for cancer with microsatellite instability. *Bull Cancer* **104**, 42–51 (2017).
 177. Lanneau, D. *et al.* Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J. Cell. Mol. Med.* **12**, 743–61 (2008).
 178. Macario, A. J. L. & Conway de Macario, E. Sick chaperones, cellular stress, and disease. *N. Engl. J. Med.* **353**, 1489–1501 (2005).
 179. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
 180. Calderwood, S. K. & Gong, J. Heat Shock Proteins Promote Cancer: It's a Protection Racket. *Trends in Biochemical Sciences* **41**, 311–323 (2016).
 181. Wu, J. *et al.* Heat Shock Proteins and Cancer. *Trends in Pharmacological Sciences* **38**, 226–256 (2017).
 182. Jegu, G., Hazoumé, A., Seigneuric, R. & Garrido, C. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett.* **332**, 275–285 (2013).
 183. Kampinga, H. H. *et al.* Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress and Chaperones* **14**, 105–111 (2009).
 184. Lee-Yoon, D., Easton, D., Murawski, M., Burd, R. & Subject, J. R. Identification of a major subfamily of large hsp70-like proteins through the cloning of the mammalian 110-kDa heat shock protein. *J. Biol. Chem.* **270**, 15725–15733 (1995).
 185. Oh, H. J., Easton, D., Murawski, M., Kaneko, Y. & Subject, J. R. The chaperoning activity of hsp110: Identification of functional domains by use of targeted deletions. *J. Biol. Chem.* **274**, 15712–15718 (1999).
 186. Easton, D. P., Kaneko, Y. & Subject, J. R. The Hsp110 and Grp170 stress proteins: newly recognized relatives of the Hsp70s. *Cell Stress Chaperones* **5**, 276 (2000).
 187. Yasuda, K., Nakai, a, Hatayama, T. & Nagata, K. Cloning and expression of murine high molecular mass heat shock proteins, HSP105. *J. Biol. Chem.* **270**, 29718–23 (1995).
 188. Saito, Y., Yamagishi, N. & Hatayama, T. Nuclear localization mechanism of Hsp105beta and its possible function in mammalian cells. *J. Biochem.* **145**, 185–91 (2009).
 189. Saito, Y., Yamagishi, N. & Hatayama, T. Different localization of Hsp105 family proteins in mammalian cells. *Exp. Cell Res.* **313**, 3707–3717 (2007).

190. Zhang, Y., Huang, L., Zhang, J., Moskopidis, D. & Mivechi, N. F. Targeted disruption of hsf1 leads to lack of thermotolerance and defines tissue-specific regulation for stress-inducible hsp molecular chaperones. *J. Cell. Biochem.* **86**, 376–393 (2002).
191. Yasuda, K., Ishihara, K., Nakashima, K. & Hatayama, T. Genomic cloning and promoter analysis of the mouse 105-kDa heat shock protein (HSP105) gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **256**, 75–80 (1999).
192. Olszak, T. *et al.* Protective mucosal immunity mediated by epithelial CD1d and IL-10. *Nature* **509**, 497–502 (2014).
193. Oh, H. J., Chen, X. & Subjeck, J. R. hsp110 protects heat-denatured proteins and confers cellular thermoresistance. *J. Biol. Chem.* **272**, 31636–31640 (1997).
194. Zhu, X. *et al.* Structural Analysis of Substrate Binding by the Molecular Chaperone DnaK. *Science* (80-.). **272**, 1606–1614 (1996).
195. Yamagishi, N., Ishihara, K., Saito, Y. & Hatayama, T. Hsp105 but not Hsp70 family proteins suppress the aggregation of heat-denatured protein in the presence of ADP. *FEBS Lett.* **555**, 390–396 (2003).
196. Hatayama, T. & Yasuda, K. Association of HSP105 with HSC70 in high molecular mass complexes in mouse FM3A cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **248**, 395–401 (1998).
197. N, Y. Modulation of the chaperone activities of Hsc70/Hsp40 by Hsp105alpha and Hsp105beta. *Biochem Biophys Res Commun* **272**, 850–855 (2000).
198. Yamagishi, N., Ishihara, K. & Hatayama, T. Hsp105?? suppresses Hsc70 chaperone activity by inhibiting Hsc70 ATPase activity. *J. Biol. Chem.* **279**, 41727–41733 (2004).
199. Ishihara, K., Yamagishi, N. & Hatayama, T. Protein kinase CK2 phosphorylates Hsp105 alpha at Ser509 and modulates its function. *Biochem. J.* **371**, 917–925 (2003).
200. Ishihara, K., Yasuda, K. & Hatayama, T. Phosphorylation of the 105-kDa heat shock proteins, HSP105 alpha and HSP105 beta, by casein kinase II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**, 927–931 (2000).
201. Dragovic, Z., Broadley, S. a, Shomura, Y., Bracher, A. & Hartl, F. U. Molecular chaperones of the Hsp110 family act as nucleotide exchange factors of Hsp70s. *EMBO J.* **25**, 2519–2528 (2006).
202. Hatayama, T., Yamagishi, N., Minobe, E. & Sakai, K. Role of hsp105 in protection against stress-induced apoptosis in neuronal PC12 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **288**, 528–34 (2001).
203. Yamagishi, N., Ishihara, K., Saito, Y. & Hatayama, T. Hsp105 family proteins suppress staurosporine-induced apoptosis by inhibiting the translocation of Bax to mitochondria in HeLa cells. *Exp. Cell Res.* **312**, 3215–3223 (2006).
204. Yamagishi, N., Saito, Y. & Hatayama, T. Mammalian 105 kDa heat shock family proteins suppress hydrogen peroxide-induced apoptosis through a p38 MAPK-dependent mitochondrial pathway in HeLa cells. *FEBS J.* **275**, 4558–4570 (2008).
205. Yamagishi, N., Saito, Y., Ishihara, K. & Hatayama, T. Enhancement of oxidative stress-induced apoptosis by Hsp105alpha in mouse embryonal F9 cells. *Eur. J. Biochem.* **269**, 4143–4151 (2002).
206. Colgan, S. P. *et al.* Intestinal heat shock protein 110 regulates expression of CD1d on intestinal epithelial cells. *J. Clin. Invest.* **112**, 745–754 (2003).
207. Colgan, S. P., Hershberg, R. M., Furuta, G. T. & Blumberg, R. S. Ligation of intestinal epithelial CD1d induces bioactive IL-10: critical role of the cytoplasmic tail in autocrine signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 13938–13943 (1999).
208. Kai, M. *et al.* Heat shock protein 105 is overexpressed in a variety of human tumors. *Oncol. Rep.* **10**, 1777–1782 (2003).
209. Park, H. S. *et al.* Expression of heat shock protein 105 and 70 in malignant melanoma and benign melanocytic nevi. *J. Cutan. Pathol.* **36**, 511–516 (2009).
210. Slaby, O. *et al.* Significant overexpression of Hsp110 gene during colorectal cancer progression. *Oncol. Rep.* **21**, 1235–1241 (2009).
211. Kim, J. H. *et al.* Expression status of wild-type HSP110 correlates with HSP110 T17 deletion size and patient prognosis in microsatellite-unstable colorectal cancer. *Mod. Pathol.* **27**, 443–53 (2014).
212. Nakajima, M. *et al.* Prognostic significance of heat shock protein 110 expression and T lymphocyte infiltration in esophageal cancer. *Hepatogastroenterology.* **58**, 1555–1560 (2011).
213. Kimura, A. *et al.* Nuclear heat shock protein 110 expression is associated with poor prognosis and chemotherapy resistance in gastric cancer. *Oncotarget* **7**, (2016).
214. Hosaka, S. *et al.* Synthetic small interfering RNA targeting heat shock protein 105 induces

- apoptosis of various cancer cells both in vitro and in vivo. *Cancer Sci.* **97**, 623–632 (2006).
215. Yu, N. *et al.* HSP105 recruits protein phosphatase 2A to dephosphorylate β -catenin. *Mol. Cell. Biol.* **35**, 1390–400 (2015).
 216. Zappasodi, R. *et al.* HSPH1 inhibition downregulates Bcl-6 and c-Myc and hampers the growth of human aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* **125**, 1768–1771 (2015).
 217. Zappasodi, R. *et al.* Serological identification of HSP105 as a novel non-Hodgkin lymphoma therapeutic target. *Blood* **118**, 4421–4430 (2011).
 218. Berthenet, K. *et al.* Extracellular HSP110 skews macrophage polarization in colorectal cancer. *Oncoimmunology* **5**, e1170264 (2016).
 219. Brogna, S. & Wen, J. Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 107–13 (2009).
 220. Gardner, L. B. Nonsense-mediated RNA decay regulation by cellular stress: implications for tumorigenesis. *Mol. Cancer Res.* **8**, 295–308 (2010).
 221. Lejeune, F. Nonsense-mediated mRNA decay at the crossroads of many cellular pathways. *BMB Rep.* **50**, 175–185 (2017).
 222. Le Hir, H., Izaurralde, E., Maquat, L. E. & Moore, M. J. The spliceosome deposits multiple proteins 20–24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *EMBO J.* **19**, 6860–6869 (2000).
 223. Yamashita, A. *et al.* SMG-8 and SMG-9, two novel subunits of the SMG-1 complex, regulate remodeling of the mRNA surveillance complex during nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev.* **23**, 1091–1105 (2009).
 224. Kadlec, J., Izaurralde, E. & Cusack, S. The structural basis for the interaction between nonsense-mediated mRNA decay factors UPF2 and UPF3. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 330–337 (2004).
 225. He, F. & Jacobson, A. Nonsense-Mediated mRNA Decay: Degradation of Defective Transcripts Is Only Part of the Story. *Annu. Rev. Genet.* **49**, annurev-genet-112414-054639 (2015).
 226. Chang, Y.-F. F., Imam, J. S. & Wilkinson, M. F. The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 51–74 (2007).
 227. Chamieh, H., Ballut, L., Bonneau, F. & Le Hir, H. NMD factors UPF2 and UPF3 bridge UPF1 to the exon junction complex and stimulate its RNA helicase activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 85–93 (2008).
 228. Isken, O. *et al.* Upf1 Phosphorylation Triggers Translational Repression during Nonsense-Mediated mRNA Decay. *Cell* **133**, 314–327 (2008).
 229. Popp, M. W.-L. & Maquat, L. E. Organizing principles of mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *Annu. Rev. Genet.* **47**, 139–65 (2013).
 230. Eberle, A. B., Lykke-Andersen, S., Mühlemann, O. & Jensen, T. H. SMG6 promotes endonucleolytic cleavage of nonsense mRNA in human cells. *TL - 16. Nat. Struct. Mol. Biol.* **16 VN-r**, 49–55 (2009).
 231. Huntzinger, E., Kashima, I., Fauser, M., Saulière, J. & Izaurralde, E. SMG6 is the catalytic endonuclease that cleaves mRNAs containing nonsense codons in metazoan. *RNA* **14**, 2609–17 (2008).
 232. Schmid, M. & Jensen, T. H. The exosome: a multipurpose RNA-decay machine. *Trends in Biochemical Sciences* **33**, 501–510 (2008).
 233. Franks, T. M., Singh, G. & Lykke-Andersen, J. Upf1 ATPase-dependent mRNP disassembly is required for completion of nonsense-mediated mRNA decay. *Cell* **143**, 938–950 (2010).
 234. Chiu, S.-Y., Serin, G., Ohara, O. & Maquat, L. E. Characterization of human Smg5/7a: a protein with similarities to *Caenorhabditis elegans* SMG5 and SMG7 that functions in the dephosphorylation of Upf1. *RNA* **9**, 77–87 (2003).
 235. Ohnishi, T. *et al.* Phosphorylation of hUPF1 induces formation of mRNA surveillance complexes containing hSMG-5 and hSMG-7. *Mol. Cell* **12**, 1187–1200 (2003).
 236. Lykke-Andersen, S. & Jensen, T. H. Nonsense-mediated mRNA decay: an intricate machinery that shapes transcriptomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 665–677 (2015).
 237. Hir, H. Le, Sauliere, J. & Wang, Z. The exon junction complex as a node of post-transcriptional networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**, 41–54 (2016).
 238. Perrin-Vidoz, L., Sinilnikova, O. M., Stoppa-Lyonnet, D., Lenoir, G. M. & Mazoyer, S. The nonsense-mediated mRNA decay pathway triggers degradation of most BRCA1 mRNAs bearing premature termination codons. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 2805–2814 (2002).
 239. Sasaki, C. Y., Lin, H., Morin, P. J. & Longo, D. L. Truncation of the extracellular region abrogates cell contact but retains the growth-suppressive activity of E-cadherin. *Cancer Res.* **60**, 7057–7065 (2000).
 240. Karam, R. *et al.* The NMD mRNA surveillance pathway downregulates aberrant E-cadherin

- transcripts in gastric cancer cells and in CDH1 mutation carriers. *Oncogene* **27**, 4255–4260 (2008).
241. Mort, M., Ivanov, D., Cooper, D. N. & Chuzhanova, N. A. A meta-analysis of nonsense mutations causing human genetic disease. *Hum. Mutat.* **29**, 1037–1047 (2008).
 242. Karam, R., Wengrod, J., Gardner, L. B. & Wilkinson, M. F. Regulation of nonsense-mediated mRNA decay: Implications for physiology and disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* **1829**, 624–633 (2013).
 243. Mendell, J. T., Sharifi, N. A., Meyers, J. L., Martinez-Murillo, F. & Dietz, H. C. Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise. *Nat Genet* **36**, 1073–8 (2004).
 244. Wang, D. *et al.* Inhibition of nonsense-mediated RNA decay by the tumor microenvironment promotes tumorigenesis. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 3670–3680 (2011).
 245. Liu, C. *et al.* The UPF1 RNA surveillance gene is commonly mutated in pancreatic adenosquamous carcinoma. *Nat. Med.* **20**, 596–599 (2014).
 246. El-Bchiri, J. *et al.* Differential nonsense mediated decay of mutated mRNAs in mismatch repair deficient colorectal cancers. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 2435–2442 (2005).
 247. Shin, N. *et al.* Identification of frequently mutated genes with relevance to nonsense mediated mRNA decay in the high microsatellite instability cancers. *Int. J. Cancer* **128**, 2872–2880 (2011).
 248. Holbrook, J. a, Neu-Yilik, G., Hentze, M. W. & Kulozik, A. E. Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nat. Genet.* **36**, 801–8 (2004).
 249. Gilboa, E. Expression of new antigens on tumor cells by inhibiting nonsense-mediated mRNA decay. *Immunol. Res.* **57**, 44–51 (2013).
 250. Pastor, F., Kolonias, D., Giangrande, P. H. & Gilboa, E. Induction of tumour immunity by targeted inhibition of nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* **465**, 227–230 (2010).
 251. Noensie, E. N. & Dietz, H. C. A strategy for disease gene identification through nonsense-mediated mRNA decay inhibition. *Nat. Biotechnol.* **19**, 434–439 (2001).
 252. Ionov, Y., Nowak, N., Perucho, M., Markowitz, S. & Cowell, J. K. Manipulation of nonsense mediated decay identifies gene mutations in colon cancer Cells with microsatellite instability. *Oncogene* **23**, 639–645 (2004).
 253. Carter, M. S. *et al.* A regulatory mechanism that detects premature nonsense codons in T-cell receptor transcripts in vivo is reversed by protein synthesis inhibitors in vitro. *J. Biol. Chem.* **270**, 28995–29003 (1995).
 254. Ivanov, I., Lo, K. C., Hawthorn, L., Cowell, J. K. & Ionov, Y. Identifying candidate colon cancer tumor suppressor genes using inhibition of nonsense-mediated mRNA decay in colon cancer cells. *Oncogene* **26**, 2873–2884 (2007).
 255. Bruno, I. G. *et al.* Identification of a MicroRNA that Activates Gene Expression by Repressing Nonsense-Mediated RNA Decay. *Mol. Cell* **42**, 500–510 (2011).
 256. Nomakuchi, T. T., Rigo, F., Aznarez, I. & Krainer, A. R. Antisense oligonucleotide-directed inhibition of nonsense-mediated mRNA decay. *Nat. Biotechnol.* **3**, 1–4 (2015).
 257. Durand, S. *et al.* Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay (NMD) by a new chemical molecule reveals the dynamic of NMD factors in P-bodies. *J. Cell Biol.* **178**, 1145–1160 (2007).
 258. Keeling, K. M. *et al.* Attenuation of Nonsense-Mediated mRNA Decay Enhances In Vivo Nonsense Suppression. *PLoS One* **8**, (2013).
 259. MW, P. Attenuation of nonsense-mediated mRNA decay facilitates the response to chemotherapeutics. *Nat Commun* **6**, 6632 (2015).
 260. Jia, J. *et al.* Caspases shutdown nonsense-mediated mRNA decay during apoptosis. *Cell Death Differ.* **22**, 1–10 (2015).
 261. Gotham, V. J. B. *et al.* Synthesis and activity of a novel inhibitor of nonsense-mediated mRNA decay. *Org. Biomol. Chem.* **14**, 1559–63 (2016).
 262. Gonzalez-Hilarion, S. *et al.* Rescue of nonsense mutations by amlexanox in human cells. *Orphanet J Rare Dis* **7**, 58 (2012).
 263. Wake, M. S. & Watson, C. J. STAT3 the oncogene - Still eluding therapy? *FEBS J.* **282**, 2600–2611 (2015).
 264. J, N. Targeted disruption of Hsp110/105 gene protects against ischemic stress. *Stroke.* **39**, 2853–2859 (2008).
 265. Reitmair, A. H. *et al.* Spontaneous intestinal carcinomas and skin neoplasms in Msh2-deficient mice. *Cancer Res.* **56**, 3842–3849 (1996).
 266. Dewaele, M. *et al.* Antisense oligonucleotide-mediated MDM4 exon 6 skipping impairs tumor growth. *J. Clin. Invest.* **126**, 68–84 (2016).
 267. Huesca, M., Borgia, S., Huffman, P. & Lingwood, C. A. Acidic pH changes receptor binding

- specificity of *Helicobacter pylori*: A binary adhesion model in which surface heat shock (stress) proteins mediate sulfatide recognition in gastric colonization. *Infect. Immun.* **64**, 2643–2648 (1996).
268. Hause, R. J., Pritchard, C. C., Shendure, J. & Salipante, S. J. Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types. *Nat Med* **22**, 1342–1350 (2016).
 269. Wilkinson, M. F. A new function for nonsense-mediated mRNA-decay factors. *Trends in Genetics* **21**, 143–148 (2005).
 270. Frischmeyer, P. a & Dietz, H. C. Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 1893–1900 (1999).
 271. Möser, C. V. *et al.* The protein kinase IKKepsilon contributes to tumour growth and tumour pain in a melanoma model. *Biochem. Pharmacol.* **103**, 64–73 (2016).
 272. Reilly, S. M. *et al.* An inhibitor of the protein kinases TBK1 and IKK-ε improves obesity-related metabolic dysfunctions in mice. *Nat. Med.* **19**, 313–21 (2013).
 273. Cho, C. C., Chou, R.-H. & Yu, C. Amlexanox Blocks the Interaction between S100A4 and Epidermal Growth Factor and Inhibits Cell Proliferation. *PLoS One* **11**, e0161663 (2016).
 274. Sherman, M. Y. & Gabai, V. L. Hsp70 in cancer: back to the future. *Oncogene* **34**, 4153–61 (2015).

