



HAL
open science

**Étude des discordances entre les analyses
d'immunohistochimie et de biologie moléculaire à la
recherche d'une instabilité microsatellitaire avec les
analyses de génétique constitutionnelle dans le cadre du
syndrome de Lynch**

Laëtitia Fazzalari

► **To cite this version:**

Laëtitia Fazzalari. Étude des discordances entre les analyses d'immunohistochimie et de biologie moléculaire à la recherche d'une instabilité microsatellitaire avec les analyses de génétique constitutionnelle dans le cadre du syndrome de Lynch. Médecine humaine et pathologie. 2017. dumas-01547059

HAL Id: dumas-01547059

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01547059>

Submitted on 26 Jun 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

FACULTÉ MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE ROUEN

ANNEE 2017

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

FAZZALARI Laetitia

Née Le 15/01/1985 à Nice

Présentée et soutenue publiquement le 9 juin 2017

**ÉTUDE DES DISCORDANCES ENTRE LES ANALYSES
D'IMMUNOHISTOCHEMIE ET DE BIOLOGIE MOLECULAIRE À LA
RECHERCHE D'UNE INSTABILITE MICROSATELLITAIRE AVEC LES
ANALYSES DE GÉNÉTIQUE CONSTITUTIONNELLE DANS LE
CADRE DU SYNDROME DE LYNCH**

Directeur de Thèse :

Monsieur le Professeur Jean-Christophe Sabourin

Président du Jury :

Monsieur le Professeur Jean-Christophe Sabourin

Assesseurs :

Monsieur le Professeur Frédéric DI FIORE

Monsieur le Professeur Pierre MICHEL

Madame le Docteur Florence LE PESSOT

Table des matières

Liste des abréviations.....	4
SERMENT D'HIPPOCRATE.....	18
INTRODUCTION.....	25
<i>I.SYNDROME DE LYNCH.....</i>	<i>25</i>
A.Définition.....	26
B.Risques tumoraux associés au Syndrome de Lynch	26
<i>II.CANCER COLORECTAL ET SYNDROME DE LYNCH.....</i>	<i>27</i>
A.Les caractéristiques cliniques	27
B.Les caractéristiques histologiques.....	27
C.Les caractéristiques moléculaires.....	28
<i>III.CARCINOME ENDOMETRIOIDE ET SYNDROME DE LYNCH.....</i>	<i>28</i>
A.Caractéristiques cliniques.....	29
B.Caractéristiques histologiques	29
C.Les caractéristiques moléculaires.....	31
D.Pronostic.....	31
<i>IV.PRONOSTIC ET SURVEILLANCE</i>	<i>31</i>
A.Pronostic du syndrome de Lynch.....	31
B.Surveillance digestive du cas et des apparentés	32
C.Surveillance gynécologique du cas et des apparentés	32
<i>V.PRISE EN CHARGE.....</i>	<i>33</i>
A.Cancer colorectal.....	33
B.Cancers de l'endomètre.....	33
C.La place de l'immunothérapie	34
D.Prise en charge préventive.....	34
E.Consultation d'oncogénétique.....	34
<i>VI.PHYSIOPATHOLOGIE</i>	<i>35</i>
A.Système MMR.....	35
B.Mécanisme d'inactivation du système MMR dans le SL.....	36
<i>VII.DIAGNOSTIC</i>	<i>37</i>
A.Critères de reconnaissance clinique	37
B.Indications du pré-criblage somatique en France	39
C.Phénotype RER	40
D.Analyses constitutionnelles	42
<i>VIII.CARACTERISTIQUES DES MUTATIONS.....</i>	<i>45</i>
OBJECTIF.....	46
MATERIELS ET METHODES.....	47
<i>I Les cas discordants.....</i>	<i>47</i>
<i>IX.Diagnostic de la mutation constitutionnelle</i>	<i>47</i>
A.Caractère délétère de la variation	47
B.Critères de qualité : NGS.....	48
<i>X.Analyses somatiques réalisées au sein des laboratoires de Rouen</i>	<i>48</i>
A.Recherche d'instabilité microsatellitaire.....	48
B.Analyse immunohistochimique des protéines MMR	51
RESULTATS.....	54
<i>I Caractéristiques des patients inclus.....</i>	<i>54</i>
A.Caractéristiques cliniques des patients étudiés	54
B.Les mutations	55
C.Le type de prélèvement	55

<i>XI.Reclassement des cas après renouvellement des analyses somatiques</i>	<i>55</i>
A.Cas reclassés en non discordants	55
B.Cas reclassés en non contributifs	58
C.Cas considérés comme véritablement discordants	62
DISCUSSION	66
<i>XII.Eléments permettant d'expliquer ces discordances et la non contributivité des analyses</i>	<i>66</i>
A.Spécificité des anticorps	66
B.La fixation	67
C.Certaines mutations	68
D.Nature de la lésion.....	69
<i>XIII.Analyse des caractéristiques des patients étudiés</i>	<i>70</i>
<i>XIV.Sensibilité et spécificité des analyses somatiques</i>	<i>70</i>
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	71
ANNEXES.....	72
BIBLIOGRAPHIE.....	80

Liste des abréviations

5 FU	5 Fluorouracile
ADN	acide désoxuribonucléique
CCR	cancer colorectal
ddNTP	désoxyribonucléotides
ddNTP	didésoxyribonucléotides
dMMR	déficient MMR
EPCAM	Epithelial cell adhesion molecule
FOLFOX	Acide folinique, 5 Fluorouracile, oxaliplatine.
HES	Hématoxyline Eosine Safran
IHC	immunohistochimie
MLH1	mut L homologue 1
MMR	Mismatch Repair
MSH2	mut S homologue 2
MSH6	mut S homologue 6
MSI	instabilité microsatellitaire
MSS	microsatellite Stability
NGS	Next Generation Sequencing
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction
pMMR	proficient mismatch repair
PMS2	postmeiotic segregation increased 2
QMPSF	Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent Fragment
RER	Replicative Error
RPA	protéine de réplication A
SL	Syndrome de Lynch

ANNEE UNIVERSITAIRE 2016 - 2017
U.F.R. DE MEDECINE ET DE-PHARMACIE DE ROUEN

DOYEN : **Professeur Pierre FREGER**

ASSESEURS : **Professeur Michel GUERBET**
Professeur Benoit VEBER
Professeur Pascal JOLY
Professeur Stéphane MARRET

I - MEDECINE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mr Frédéric ANSELME	HCN	Cardiologie
Mme Isabelle AUQUIT AUCKBUR	HCN	Chirurgie plastique
Mr Fabrice BAUER	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya BEKRI	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Ygal BENHAMOU	HCN	Médecine interne
Mr Jacques BENICHOU	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mme Bouchra LAMIA	Havre	Pneumologie
Mr Olivier BOYER	UFR	Immunologie
Mr François CARON	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe CHASSAGNE (<i>détachement</i>)	HCN	Médecine interne (gériatrie) – Détachement
Mr Vincent COMPERE	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Jean-Nicolas CORNU	HCN	Urologie

Mr Antoine CUVELIER	HB	Pneumologie
Mr Pierre CZERNICHOW (<i>surnombre</i>)	HCH	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Nicolas DACHER	HCN	Radiologie et imagerie médicale
Mr Stéfan DARMONI	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre DECHELOTTE	HCN	Nutrition
Mr Stéphane DERREY	HCN	Neurochirurgie
Mr Frédéric DI FIORE	CB	Cancérologie
Mr Fabien DOGUET	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mr Jean DOUCET	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard DUBRAY	CB	Radiothérapie
Mr Philippe DUCROTTE	HCN	Hépto-gastro-entérologie
Mr Frank DUJARDIN	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologique
Mr Fabrice DUPARC	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric DURAND	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand DUREUIL	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène ELTCHANINOFF	HCN	Cardiologie
Mr Thierry FREBOURG	UFR	Génétique
Mr Pierre FREGER	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François GEHANNO	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel GERARDIN	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille GERARDIN	HCN	Pédopsychiatrie
Mr Michel GODIN (<i>surnombre</i>)	HB	Néphrologie
M. Guillaume GOURCEROL	HCN	Physiologie
Mr Dominique GUERROT	HCN	Néphrologie
Mr Olivier GUILLIN	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Didier HANNEQUIN	HCN	Neurologie
Mr Fabrice JARDIN	CB	Hématologie
Mr Luc-Marie JOLY	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal JOLY	HCN	Dermato - Vénérologie
Mme Annie LAQUERRIERE	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent LAUDENBACH	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale

Mr Joël LECHEVALLIER	HCN	Chirurgie infantile
Mr Hervé LEFEBVRE	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry LEQUERRE	HB	Rhumatologie
Mme Anne-Marie LEROI	HCN	Physiologie
Mr Hervé LEVESQUE	HB	Médecine interne
Mme Agnès LIARD-ZMUDA	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves LITZLER	HCN	Chirurgie cardiaque
Mr Bertrand MACE	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. David MALTETE	HCN	Neurologie
Mr Christophe MARGUET	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle MARIE	HB	Médecine interne
Mr Jean-Paul MARIE	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Loïc MARPEAU	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane MARRET	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique MERLE	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre MICHEL	HCN	Hépto-gastro-entérologie
M. Benoit MISSET	HCN	Réanimation Médicale
Mr Jean-François MUIR (<i>surnombre</i>)	HB	Pneumologie
Mr Marc MURAINÉ	HCN	Ophtalmologie
Mr Philippe MUSETTE	HCN	Dermatologie - Vénérologie
Mr Christophe PEILLON	HCN	Chirurgie générale
Mr Christian PFISTER	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe PLANTIER	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier PLISSONNIER	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Gaëtan PREVOST	HCN	Endocrinologie
Mr Bernard PROUST	HCN	Médecine légale
Mr Jean-Christophe RICHARD (<i>détachement</i>)	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Vincent RICHARD	UFR	Pharmacologie
Mme Nathalie RIVES	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Horace ROMAN	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe SABOURIN	HCN	Anatomie - Pathologie

Mr Guillaume SAVOYE	HCN	Hépatogastrologie
Mme Céline SAVOYE-COLLET	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale SCHNEIDER	HCN	Pédiatrie
Mr Michel SCOTTE	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne TAMION	HCN	Thérapeutique
Mr Luc THIBERVILLE	HCN	Pneumologie
Mr Christian THUILLEZ (<i>surnombre</i>)	HB	Pharmacologie
Mr Hervé TILLY	CB	Hématologie et transfusion
M. Gilles TOURNEL	HCN	Médecine Légale
Mr Olivier TROST	HCN	Chirurgie Maxillo-Faciale
Mr Jean-Jacques TUECH	HCN	Chirurgie digestive
Mr Jean-Pierre VANNIER (<i>surnombre</i>)	HCN	Pédiatrie génétique
Mr Benoît VEBER	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre VERA	CB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric VERIN	HB	Service Santé Réadaptation
Mr Eric VERSPYCK	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier VITTECOQ	HB	Rhumatologie
Mr Jacques WEBER	HCN	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme Noëlle BARBIER-FREBOURG	HCN	Bactériologie – Virologie
Mme Carole BRASSE LAGNEL	HCN	Biochimie
Mme Valérie BRIDOUX HUYBRECHTS	HCN	Chirurgie Vasculaire
Mr Gérard BUCHONNET	HCN	Hématologie
Mme Mireille CASTANET	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie CHASTAN	HCN	Neurophysiologie
Mme Sophie CLAEYSSENS	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Moïse COEFFIER	HCN	Nutrition
Mr Manuel ETIENNE	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Serge JACQUOT	UFR	Immunologie

Mr Joël LADNER	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste LATOUCHE	UFR	Biologie cellulaire
Mr Thomas MOUREZ	HCN	Virologie
Mme Muriel QUILLARD	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mme Laëtitia ROLLIN	HCN	Médecine du Travail
Mr Mathieu SALAUN	HCN	Pneumologie
Mme Pascale SAUGIER-VEBER	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire TOBENAS-DUJARDIN	HCN	Anatomie
Mr David WALLON	HCN	Neurologie

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mme Dominique LANIEZ	UFR	Anglais – retraite 01/10/2016
Mr Thierry WABLE	UFR	Communication

II - PHARMACIE

PROFESSEURS

Mr Thierry BESSON	Chimie Thérapeutique
Mr Jean-Jacques BONNET	Pharmacologie
Mr Roland CAPRON (PU-PH)	Biophysique
Mr Jean COSTENTIN (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Loïc FAVENNEC (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre GOULLE (Professeur émérite)	Toxicologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mme Isabelle LEROUX - NICOLLET	Physiologie
Mme Christelle MONTEIL	Toxicologie
Mme Martine PESTEL-CARON (PU-PH)	Microbiologie
Mme Elisabeth SEGUIN	Pharmacognosie
Mr Rémi VARIN (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie VAUGEOIS	Pharmacologie
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
Mr Jérémy BELLIEN (MCU-PH)	Pharmacologie
Mr Frédéric BOUNOURE	Pharmacie Galénique
Mr Abdeslam CHAGRAOUI	Physiologie
Mme Camille CHARBONNIER (LE CLEZIO)	Statistiques

Mme Elizabeth CHOSSON	Botanique
Mme Marie Catherine CONCE-CHEMTOB santé	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Cécile CORBIERE	Biochimie
Mr Eric DITTMAR	Biophysique
Mme Nathalie DOURMAP	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUC	Pharmacologie
Mme Dominique DUTERTE- BOUCHER	Pharmacologie
Mr Abdelhakim ELOMRI	Pharmacognosie
Mr François ESTOUR	Chimie Organique
Mr Gilles GARGALA (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Nejla EL GHARBI-HAMZA	Chimie analytique
Mme Marie-Laure GROULT	Botanique
Mr Hervé HUE	Biophysique et mathématiques
Mme Laetitia LE GOFF	Parasitologie – Immunologie
Mme Hong LU	Biologie
Mme Marine MALLETER	Toxicologie
Mme Sabine MENAGER	Chimie organique
Mme Tiphaine ROGEZ-FLORENT	Chimie analytique
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Malika SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Christine THARASSE	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric ZIEGLER	Biochimie

PROFESSEURS ASSOCIES

Mme Cécile GUERARD-DETUNCQ	Pharmacie officinale
Mr Jean-François HOUIVET	Pharmacie officinale

PROFESSEUR CERTIFIE

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

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

ETUDE DES DISCORDANCES ENTRE LES ANALYSES D'IMMUNOHISTOCHEMIE ET DE BIOLOGIE MOLECULAIRE À LA RECHERCHE D'UNE INSTABILITE MICROSATELLITAIRE AVEC LES ANALYSES DE GNÉNETIQUE CONSTITUTIONNELLE DANS LE CADRE DU SYNDROME DE LYNCH

Mme Sandrine **DAHYOT**

Bactériologie

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

Mr Souleymane **ABDOUL-AZIZE**

Biochimie

Mme Hanane **GASMI**

Galénique

Mme Caroline **LAUGEL**

Chimie organique

Mr Romy **RAZAKANDRAINIBE**

Parasitologie

LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry BESSON	Chimie thérapeutique
Mr Roland CAPRON	Biophysique
Mme Marie-Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation et économie de la santé
Mme Elisabeth CHOSSON	Botanique
Mr Jean-Jacques BONNET	Pharmacodynamie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Loïc FAVENNEC	Parasitologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mr François ESTOUR	Chimie organique
Mme Isabelle LEROUX-NICOLLET	Physiologie
Mme Martine PESTEL-CARON	Microbiologie
Mme Elisabeth SEGUIN	Pharmacognosie
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mr Rémi VARIN	Pharmacie clinique
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

III – MEDECINE GENERALE

PROFESSEUR

Mr Jean-Loup **HERMIL**

UFR Médecine générale

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS

Mr Emmanuel **LEFEBVRE**

UFR Médecine Générale

Mme Elisabeth **MAUVIARD**

UFR Médecine générale

Mr Philippe **NGUYEN THANH**

UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS

Mr Pascal **BOULET**

UFR Médecine générale

Mr Emmanuel **HAZARD**

UFR Médecine Générale

Mme Lucile **PELLERIN**

UFR Médecine générale

Mme Yveline **SEVRIN**

UFR Médecine générale

Mme Marie Thérèse **THUEUX**

UFR Médecine générale

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

PROFESSEURS

Mr Serguei FETISSOV (med)	Physiologie (ADEN)
Mr Paul MULDER (phar)	Sciences du Médicament
Mme Su RUAN (med)	Génie Informatique

MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil ADRIOUCH (med) 905)	Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)
Mme Gaëlle BOUGEARD-DENOYELLE (med)	Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)
Mme Carine CLEREN (med)	Neurosciences (Néovasc)
M. Sylvain FRAINEAU (phar)	Physiologie (Inserm U 1096)
Mme Pascaline GAILDRAT (med)	Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)
Mr Nicolas GUEROUT (med)	Chirurgie Expérimentale
Mme Rachel LETELLIER (med)	Physiologie
Mme Christine RONDANINO (med)	Physiologie de la reproduction
Mr Antoine OUVRARD-PASCAUD (med)	Physiologie (Unité Inserm 1076)
Mr Frédéric PASQUET	Sciences du langage, orthophonie
Mme Isabelle TOURNIER (med)	Biochimie (UMR 1079)

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique DELAFONTAINE

HCN - Hôpital Charles Nicolle

HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME

CB - Centre Henri Becquerel

CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray

CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation

SJ - Saint Julien Rouen

SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admis(e) à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis(e) dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu(e) à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité. Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses; que je sois déshonoré(e) et méprisé(e) si j'y manque.

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Jean-Christophe Sabourin,

Vous me faites l'honneur de présider ce jury de thèse et je vous en suis très reconnaissante. Je tiens à vous remercier pour votre écoute, votre disponibilité, votre implication, votre gentillesse et votre soutien tout au long de mon cursus. Je vous remercie également pour ce travail, que vous m'avez confié. Veuillez trouver, Monsieur, en ce travail, l'expression de ma plus profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur Pierre Michel,

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter avec enthousiasme de juger ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Frédéric DiFiore,

Je vous remercie également d'avoir accepté de juger ce travail. Veuillez trouver ici, l'expression de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

A Madame le Docteur Florence LePessot,

Qui me fait l'honneur de faire partie de ce jury de thèse. Je te remercie pour ta rigueur, ta gentillesse et ton professionnalisme qui forcent l'admiration. Je te remercie également pour ton enseignement de la pathologie digestive ainsi que ta disponibilité et tes conseils durant la réalisation de ce projet. Soit assurée de ma plus sincère reconnaissance et de mon plus profond respect.

Merci à tous ceux qui ont participé à ce travail,

A Julie Tinat, merci pour ton aide si précieuse, ce fut un plaisir de travailler à tes côtés durant ce semestre.

Merci à tous **les pathologistes des laboratoires publics et privés,** m'ayant permis de réaliser ce travail grâce à la mise à disposition du matériel tumoral.

A toutes les techniciennes d'immunohistochimie, y compris Sylvie, un grand merci pour votre aide précieuse, votre disponibilité, votre écoute et surtout votre gentillesse. Ce fut très agréable de travailler avec vous durant ces années d'internat.

France Blanchard, un immense merci pour ton aide dans la réalisation de ce travail, ta disponibilité et ta bonne humeur. Je remercie également **les techniciennes du LGTS** pour leur aide.

A toutes les **secrétaires du service d'anatomie et cytologie pathologiques du CHU de Rouen,** je vous remercie pour votre efficacité, votre gentillesse et votre professionnalisme.

Stéphane, mon amour, je suis si heureuse d'être à tes côtés. Tu m'apportes tellement.
Un grand merci pour ton soutien.

Merci à mes **proches**,

A mes parents pour tout ce que vous faites pour moi depuis tant d'années, pour votre éducation, votre gentillesse, votre amour, et votre soutien sans faille. Merci de m'avoir toujours soutenu dans mes choix, et de m'avoir poussé à réussir.
Je vous aime.

A ma sœur, tellement importante pour moi. Merci de m'avoir soutenue et épaulée durant ces années d'internat malgré les kilomètres qui nous ont séparés. Merci pour tous ces moments précieux en famille qui m'ont ressourcé. Je suis tellement contente de me rapprocher de vous. Un grand merci à Yves et Nathan.

A mon frère, merci pour ton aide, et surtout ta présence et celle d'Elodie.

A mon arrière grand mère, pour qui j'ai un profond respect et une grande admiration. Merci pour ton amour, ta générosité, les valeurs que tu m'as transmises. Tu garderas toujours une grande place dans mon cœur.

A ma grande Tante, pour ta gentillesse, ton soutien, nos repas en famille, tous ces joyeux moments partagés.

A Gérard, pour m'avoir encouragé, soutenue et guidée.

A mes grands parents

A ma marraine

A Nicole

A mes oncles, tantes, cousines et cousins de Nice et d'Italie

A Axelle et Dorian.

Merci à mes **amis**,

Christel, je suis tellement contente que tu sois là. Nous avons tellement partagé de choses même à distance. Je te remercie pour ton amitié si précieuse, ton écoute, ton soutien et ta gentillesse.

Nathalie, je te remercie pour tous ces moments passés à Paris avec Charles, toi et les enfants, pour nos confidences, et ton amitié.

Camille, merci pour ton soutien, nos sorties resto entre filles, à la piscine et pour tous ces moments que j'apprécie en ta compagnie.

Merieme, je suis heureuse d'avoir fait ta connaissance. Un grand merci pour tous ces jolis moments passés à Rouen, à Nice et au Maroc.

Mihaela, Julien, et Quentin, que de souvenirs... Nous avons tellement partagé de bons moments durant ces premiers mois d'internat. Merci pour cette méga fin de stage années 80, bataille d'eau dans tout l'hôpital d'Evreux, mémorable...

A mes **co-internes, et ex-co-internes**,

A **Marie et Laura** pour votre dynamisme, votre bonne humeur, et votre disponibilité. Ce fut un plaisir de partager les pauses déjeuner avec vous les filles.

A **Claire**, je suis contente d'avoir pu te découvrir durant cette dernière année d'internat à Rouen. Merci pour ton écoute attentive et ta gentillesse. Enfin le dimanche soir à 17h est devenu tellement moins triste....je te souhaite le meilleur à Besançon.

A **Lucie**, avec qui je termine cet internat. Je me rappelle de nos fous rires aux cours d'UE, nos confidences durant nos soirées révisions.

Emlyne, merci pour ta disponibilité et ta générosité

Mohammed, pour ta discrétion tellement appréciable, ta gentillesse

Gwendoline, Pierre, Elsa et Dalhia

Maxime, Fanny et Hélène

A **Coraline et Julien** mes co-internes de Nice

Un énorme merci au **service d'anatomie et cytologie pathologiques du CHU de Rouen** :

- à l'ensemble des médecins, Florence LePessot, Arnaud François, Nicolas Piton, Catalin, Madame Gobet, Florent Marguet, Sophie Patrier, Moutaz Aziz, Emmanuel Toure, Emilie Angot, Philippe Courville et Christel Boivin, Madame Lemoine, et Laurence Roquet. Sachez que j'ai passé de très belles années à vos côtés. Je vous suis très reconnaissante de la formation dont j'ai pu bénéficier, pour votre patience, votre pédagogie, l'intérêt que vous nous portez en tant qu'interne, votre gentillesse et votre écoute. Vous m'avez manqué durant mes semestres passés loin de vous.
- Merci à Damien, pour ta gentillesse, je regrette de ne pas avoir pu trouver le temps de découvrir la microscopie électronique à tes côtés.

Merci à l'ensemble des services où je suis également passée :

- à l'équipe de **pneumologie du CHI d'Evreux dirigé par le Dr Devin**, où tout à commencé. Un immense merci pour votre accueil.
- Au **Service d'anatomie et cytologie du Centre Henri Becquerel** dirigé par Monsieur Picquenot, l'équipe de techniciens et surtout Liana, avec qui j'ai commencé à apprendre l'anapath. Je te suis tellement reconnaissante pour tout ce que tu m'as apporté durant ce semestre.
- Au **service d'anatomie et cytologie pathologique du Centre hospitalier Princesse Grace de Monaco dirigé par Florence Dupré**, pour votre accueil si chaleureux, votre formation, votre gentillesse, et votre professionnalisme.
- Au **service d'anatomie et cytologie pathologiques et à l'unité INSERM dirigés par le Pr P.Hofman à Nice**. Je vous remercie de m'avoir permis de réaliser mon master 2 au sein de votre équipe. Une grande pensée pour l'équipe de techniciens, en particulier Salomé et Katia.
- Au **service d'anatomie et cytologie pathologiques dirigé par le Pr JF.Michiels au CHU de Nice**, pour m'avoir permis d'effectuer un inter-CHU dans votre service.

INTRODUCTION

I. SYNDROME DE LYNCH

Le cancer est défini comme une accumulation d'anomalies génétiques au cours de la vie du à l'environnement. Cette pathologie est multifactorielle, liée à des facteurs environnementaux et héréditaires.

La majorité des cancers sont sporadiques, liés à une accumulation de mutations somatiques. Plus rarement, la pathologie tumorale présente un caractère héréditaire, en particulier lorsqu'elle se caractérise par la présence de multiples tumeurs dans une même famille ou chez un même individu. Ces tumeurs représentent 5% de l'ensemble de la pathologie tumorale et surviennent plus précocement que dans les formes sporadiques. Elles appartiennent à un spectre tumoral caractéristique. On parle alors de syndrome de prédisposition.

Parmi les plus fréquents, le syndrome de Lynch (SL) prédispose principalement aux cancers colorectal et de l'endomètre et dans une moindre mesure au cancer des ovaires, des voies urinaires, de l'estomac, de l'intestin grêle, des voies biliaires et dans certains cas des tumeurs cérébrales et cutanées.

Lorsqu'une mutation constitutionnelle est identifiée chez le cas index, un dépistage précoce et une surveillance peuvent lui être proposé ainsi qu'aux autres membres à risque de sa famille.

A. Définition

Le syndrome de Lynch a été décrit pour la première fois par Alfred Warthin en 1913 (1)(2).

Puis, en 1966, le Dr Lynch et ses collègues ont décrit au sein de 2 familles des cancers colorectaux associés à des tumeurs de l'estomac et de l'utérus (3).

Cette pathologie est due à une inactivation bi-allélique d'un des gènes du système de réparation des mésappariements de l'ADN. L'inactivation du gène impliqué est liée à la coexistence d'une mutation constitutionnelle d'un des deux allèles et d'une mutation somatique du second allèle. Le premier événement constitutionnel peut correspondre à une délétion, une mutation ponctuelle, une mutation d'un site d'épissage ou un réarrangement de grande taille survenant n'importe où sur le gène. Puis l'inactivation somatique du second allèle entraîne l'apparition d'une tumeur. Celle-ci se caractérise en général par une instabilité microsatellitaire et une perte d'expression immunohistochimique d'une ou plusieurs protéines MMR (Mis Match Repair) intervenant dans la réparation des mésappariements de l'ADN.

Le SL est transmis par voie autosomique dominante ce qui signifie que 50% de la descendance d'un patient atteint hérite d'un allèle muté. Sa pénétrance étant incomplète (80-85%), certains patients porteurs de la mutation ne développeront pas de cancer. Dans cette pathologie, les altérations constitutionnelles et somatiques intéressent majoritairement un des quatre gènes du système MMR: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* et *PMS2*. Les manifestations cliniques de ce syndrome dépendent du gène MMR en cause et du type de mutation.

B. Risques tumoraux associés au Syndrome de Lynch

Le syndrome de Lynch est associé à une augmentation significative du risque de survenue de cancer du colon et du rectum, de l'endomètre, de l'ovaire, de l'estomac, des voies biliaires, de l'intestin grêle et des voies urinaires permettant de définir un spectre de tumeurs associées aux mutations délétères des gènes MMR.(4)

Ainsi, Il existe différents spectres associés au syndrome de Lynch en fonction du risque relatif d'apparition d'un type de cancer par rapport à la population générale:

- Le spectre étroit comprend les cancers avec un risque élevé de survenue : cancers du colon et du rectum, l'adénocarcinome de l'endomètre et de l'intestin grêle, ainsi que des voies urinaires supérieures (uretère et cavités excrétrices rénales).
- Dans le spectre large, en plus des cancers du spectre étroit, on retrouve des tumeurs avec un risque relatif de survenue plus faible, notamment le cancer de l'ovaire, des voies biliaires (cholangiocarcinome), et l'adénocarcinomes gastrique (5).

Des tumeurs cutanées et cérébrales ont été également rapportées dans des familles présentant un syndrome de Lynch, définissant 2 variantes de ce syndrome:

- Le **syndrome de Turcot** est caractérisé par une association de multiples adénomes colorectaux et d'une tumeur cérébrale primitive. Cette association peut être la conséquence soit d'une mutation constitutionnelle du gène *APC*, soit d'un des gènes MMR. Les médulloblastomes sont plus fréquemment associés aux mutations *APC* alors que les glioblastomes sont plus souvent liés aux mutations des gènes MMR.
- Le **syndrome de Muir-Torre** est la conséquence d'une mutation des gènes *MSH2* ou *MLH1*. Il se caractérise par une association de cancers colorectaux et de tumeurs cutanées développées à partir des glandes sébacées ainsi que des kératoacanthomes.

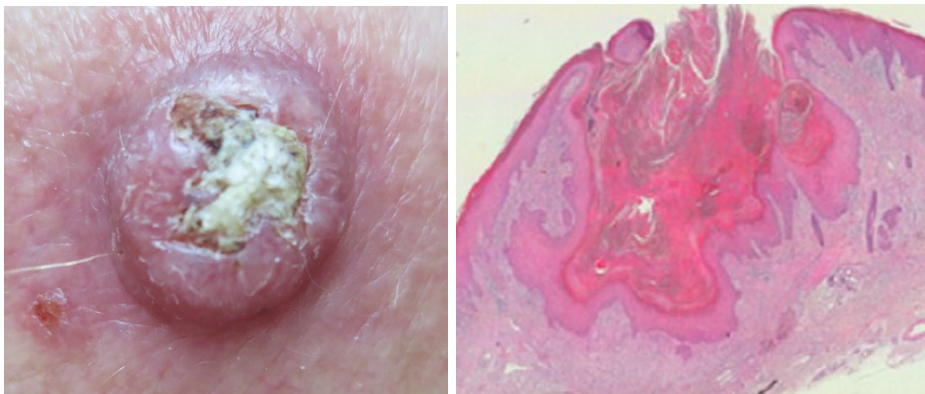


Figure 1 : Aspect clinique (A) et histologique (B) d'un kératoacanthome.

II. CANCER COLORECTAL ET SYNDROME DE LYNCH

A. Les caractéristiques cliniques

Cette pathologie est responsable de 2 à 3 % des cancers colorectaux. Le risque absolu de CCR à 70 ans est évalué entre 47 et 69% chez l'homme et entre 33 et 52% chez la femme (6). Les cancers colorectaux se développent sur de petits adénomes essentiellement localisés sur le colon proximal (7). Les patients ayant un syndrome de Lynch ont un taux d'adénomes similaire à celui de la population générale mais l'âge de survenu est plus précoce et leur risque de dégénérescence carcinomateuse est augmenté. La carcinogénèse progresse plus vite chez ces patients (2-3 ans) que chez les patients porteurs d'adénomes sporadiques (8-10 ans) (8). Le risque de CCR est plus élevé chez l'homme (40-70%) que chez la femme (20-50%). De plus, l'incidence des tumeurs synchrones et métachrones est augmentée (9)

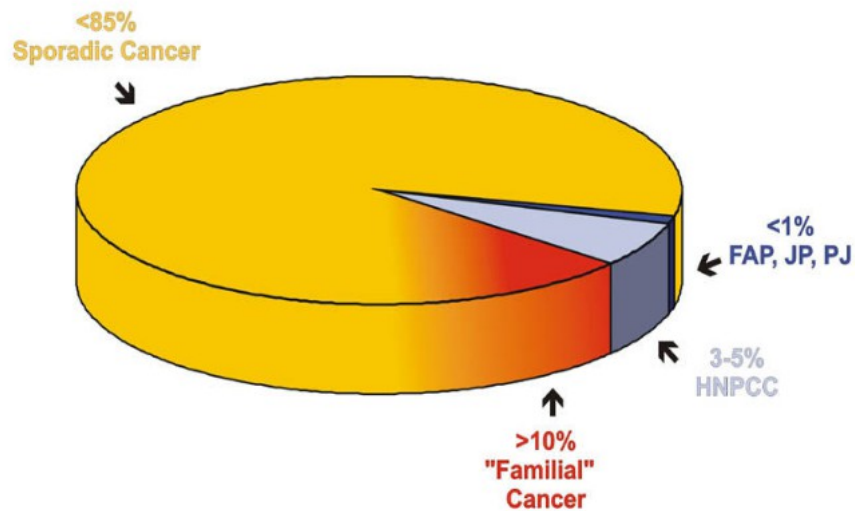


Figure 2 : contributions relatives et approximatives des causes familiales dans l'incidence des CCR (10)

B. Les caractéristiques histologiques

Dans la majorité des cas, les adénomes sont de type vilieux avec une composante en dysplasie de haut grade. Ils ont un taux de transformation maligne élevé.

Les cancers colorectaux s'intégrant dans le cadre du SL sont fréquemment peu différenciés, de type mucineux, à cellules en bagues à chaton ou de type médullaire (7). Les adénocarcinomes mucineux et à cellules en bagues à chatons nécessitent la présence d'au moins 50% de mucine extra-cellulaire ou de cellules en bague à chaton (figures 3 et 4).

Lorsqu'il existe moins de 50% de ces deux contingents cellulaires, on parle d'adénocarcinome lieberkühnien bien, et/ou moyennement différencié associé à une composante mucineuse ou à cellules en bague à chaton. L'adénocarcinome lieberkühnien correspond à une prolifération tumorale infiltrante de structures glanduliformes dont le revêtement apparaît cylindrique et basophile, avec pluristratification, atypies cytonucléaires et mitoses, ressemblant aux glandes de Lieberkühn constituant la muqueuse normale du

colon. Ces structures se disposent au sein d'un stroma tumoral plus ou moins abondant. La différenciation de l'adénocarcinome Lieberkühnien varie en fonction du pourcentage de la propension des cellules tumorales à s'organiser en structures glandulaires (cf Grading de différenciation de l'OMS).

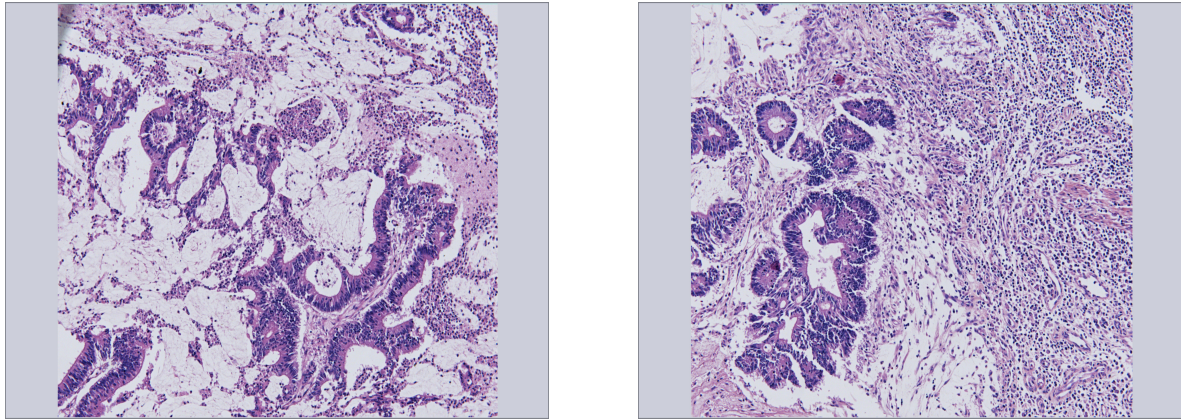


Figure 3 : Aspects histologiques des CCR dans le cadre d'un SL. A : Adénocarcinome colique mucineux (HES x 100) et B : Présence d'un important infiltrat inflammatoire lymphocytaire au sein de la tumeur (HES x 100)

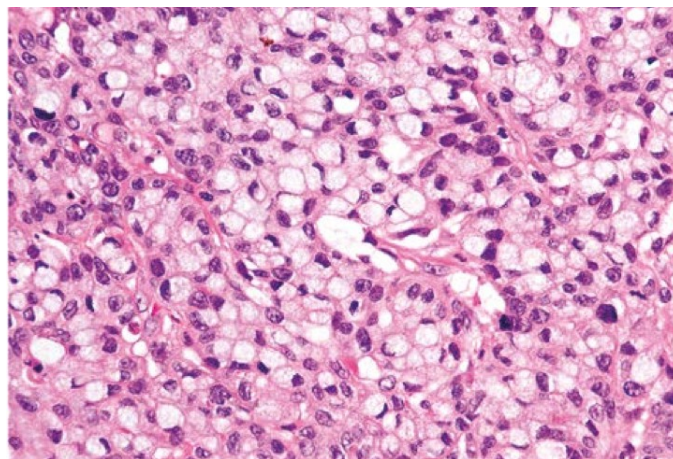


Figure 4 : carcinome à cellules en bague à chatons

Le système de grading de l'OMS (2000) individualise 4 grades :

- Grade 1 : tumeur bien différenciée comportant > 95% de glandes
- Grade 2 : tumeur moyennement différenciée comportant entre 50 et 95% de glandes
- Grade 3 : tumeur peu différenciée comportant moins de 50% de glandes
- Grade 4 : tumeur indifférenciée comportant moins de 5% de glandes.

Les CCR s'intégrant dans le cadre d'un SL se développent principalement dans le colon proximal. Ces cancers se caractérisent par la présence d'un stroma tumoral comportant un important infiltrat inflammatoire lymphocytaire (11), de type « pseudocrohnien ». Concernant l'adénocarcinome colique à cellules en bague à chaton, il convient, de façon systématique, d'éliminer l'extension au colon d'un cancer de l'estomac avant de retenir le diagnostic de tumeur primitive.

Le degré de différenciation des cancers colorectaux est un facteur pronostic majeur puisqu'il est corrélé à l'envahissement loco-régional ganglionnaire et à distance.

C. Les caractéristiques moléculaires

Le risque de cancer colorectal est plus élevé en cas de mutation du gène *MLH1* et plus faible en cas de mutation du gène *MSH2*.

III. CARCINOME ENDOMETRIOIDE ET SYNDROME DE LYNCH

Le cancer endométrial est le second cancer le plus fréquent dans le SL. La fréquence du syndrome de Lynch chez les patientes atteintes de cancer endométrial est estimée entre 1,8% à 2,1% et jusqu'à 9 % chez les sujets de moins de 50 ans.(12) (13)

Le risque absolu de développer un cancer de l'endomètre à 70 ans chez les femmes porteuses d'un syndrome de Lynch est estimé entre 14 et 54%.

En cas de mutation *MSH6*, il existe un risque beaucoup plus important de développer un cancer de l'endomètre qu'un cancer colique. (14)

A. Caractéristiques cliniques

Chez les patientes atteintes d'un SL, l'âge médian au diagnostic est de 47 ans. Dans une vaste étude, ERISCAM, effectuée sur les 537 familles suivies dans tous les centres d'oncogénétique de France, 182 cancers de l'endomètre avaient été répertoriés avec un âge moyen au diagnostic de 49 ans, le plus jeune ayant été diagnostiqué à 26 ans. (15)

B. Caractéristiques histologiques

Il s'agit systématiquement d'adénocarcinomes, plus souvent localisés dans le tiers inférieur de l'utérus par rapport aux cas sporadiques. (16) Les cancers de l'endomètre avec instabilité microsatellitaire sont plus fréquemment localisés au niveau de l'isthme.(17) La tumeur peut être multifocale dans l'utérus.

Dans la littérature, les caractéristiques morphologiques des carcinomes endométriaux liés au SL ont été décrits.(18)

1) *Carcinome endométrioïde*

Il est souvent retrouvé des carcinomes endométrioïdes de haut grade (grade 3). De plus, il existe fréquemment une hétérogénéité intra-tumorale, c'est à dire la présence d'au moins deux contingents tumoraux différents, juxtaposés mais non mélangés, constituant chacun au moins 10% du volume tumoral. Ceci correspond à la présence côte à côte d'un contingent bien différencié de grade 1 ou 2 et d'un contingent indifférencié contenant parfois des cellules éosinophiles, d'aspect rhabdoïde (figure 5A). Ils sont également associés à un infiltrat lymphocytaire dense péri-tumoral et intra-tumoral.

Le carcinome endométrioïde est un carcinome de l'endomètre composé de structures glandulaires ressemblant aux glandes endométriales. Il représente le carcinome le plus fréquent de l'endomètre (80% des adénocarcinomes). Les aspects histologiques de ces tumeurs varient d'une tumeur très bien différenciée, difficile à distinguer de l'hyperplasie atypique à une tumeur peu différenciée difficile à distinguer d'un carcinome indifférencié ou d'un sarcome.

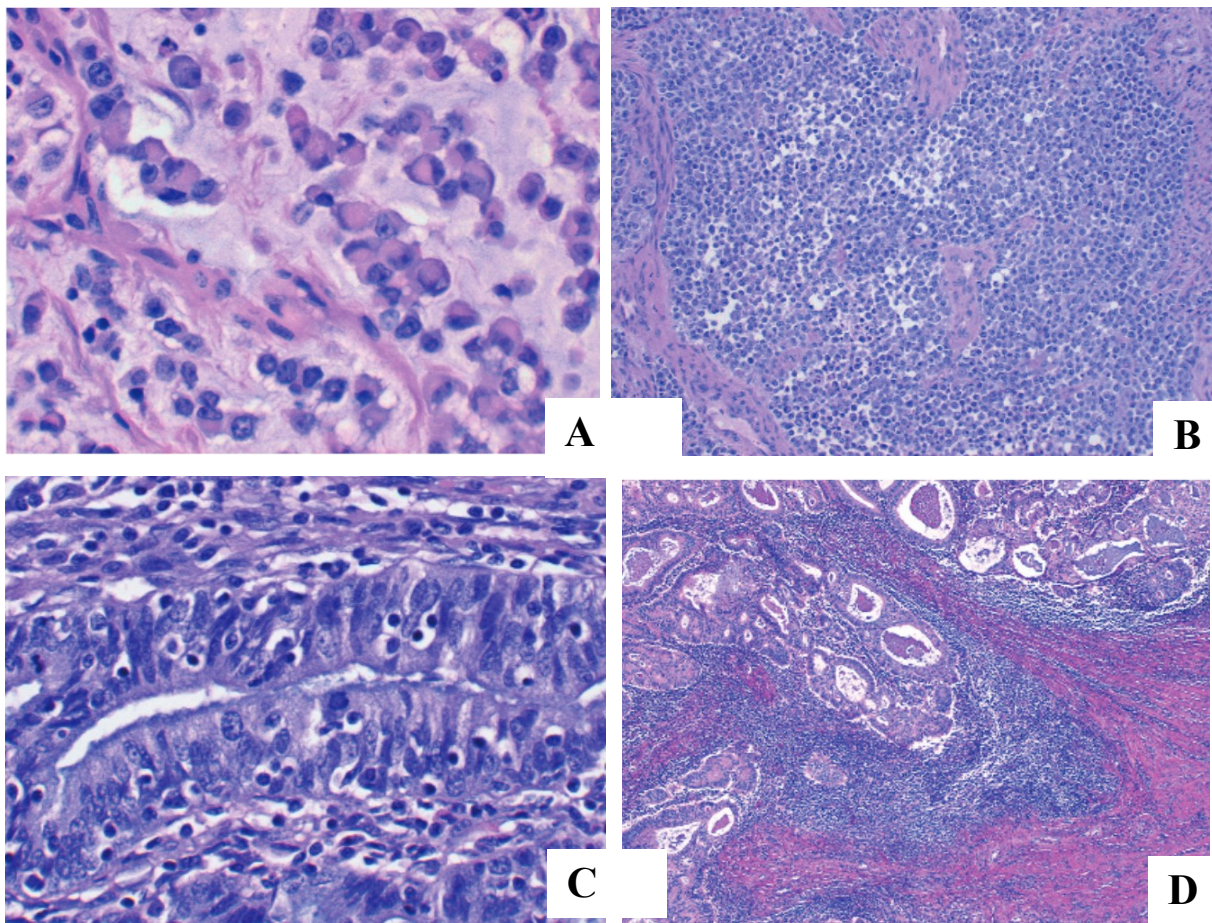


Figure 5: Aspects histologiques d'un carcinome endométroïde dans le cadre d'un SL.

A : Contingent indifférencié comportant des cellules rhabdoïdes au cytoplasme éosinophile, abondant et au noyau nucléolé excentré. B : contingent indifférencié comportant des plages cellulaires de cellules rondes ou ovales sans structure glandulaire.(18)

C : présence de lymphocytes intra-épithéliaux. D : Infiltrat lymphocytaire intense intra et péri-tumoral.(18)

Le grade histologique est basé sur l'architecture et les noyaux (FIGO) :

- Grade 1 : < 5% de zone solide
- Grade 2 : 6 à 50% de zone solide
- Grade 3 : > 50% de zone solide

Lorsque les noyaux sont très pléomorphes sur plus de 50% des cellules, on augmente le grade d'un point.

Les stades cliniques et la classification TNM 2009 figurent en annexe 1.

2) Carcinome non endométriöide

Les équipes de Carcangiu *et al* a et Broaddus *et al* ont constaté que les jeunes patientes ayant un SL ont fréquemment une tumeur utérine non endométriöide, incluant des carcinomes à cellules claires, des carcinomes séreux et des carcinosarcomes.(19)(20)

C. Les caractéristiques moléculaires

Le risque de cancer de l'endomètre varie en fonction du gène MMR muté. Le risque de cancer de l'endomètre est très élevé en cas de mutation du gène *MSH6*, élevé en cas de mutations du gène *MSH2* et moindre en cas de mutation du gène *MLH1*(21). Chez les patientes porteuses d'une mutation d'un des gènes MMR, l'âge médian au diagnostic est de 47 ans. Plus de la moitié des cas de cancers de l'endomètre sont diagnostiqués avant l'âge de 50 ans. Les mutations du gène *MSH6* exposent à un risque majeur, multiplié par 35 par rapport à la population générale (22). En revanche, la mutation du gène *MSH6* est associée à un âge plus élevé au diagnostic et à un risque beaucoup plus important de développer un cancer de l'endomètre qu'un cancer colique.(14)

Par rapport aux formes sporadiques, les cancers de l'endomètre seraient plus volontiers de grade 2 selon la classification de FIGO et non endométriöides en particulier en cas de mutation *MSH2*. (20)

D. Pronostic

Les patientes ayant un syndrome de Lynch présentent des tumeurs de l'endomètre avec un stade FIGO, un grade FIGO et un index mitotique plus élevés ainsi qu'une profondeur

d'invasion et une infiltration lymphocytaire plus importantes par rapport aux cancers de l'endomètre sporadiques survenant avant l'âge de 50 ans.(23).

IV. PRONOSTIC ET SURVEILLANCE

A. Pronostic du syndrome de Lynch

Plusieurs études ont montré que les CCR de phénotype MSI (avec instabilité microsatellitaires) avaient un meilleur pronostic que les CCR de phénotype MSS. (24). Les recommandations de suivi doivent être validées en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) dédiées dans le cadre des réseaux de suivi et adaptées à l'histoire personnelle et familiale du patient.

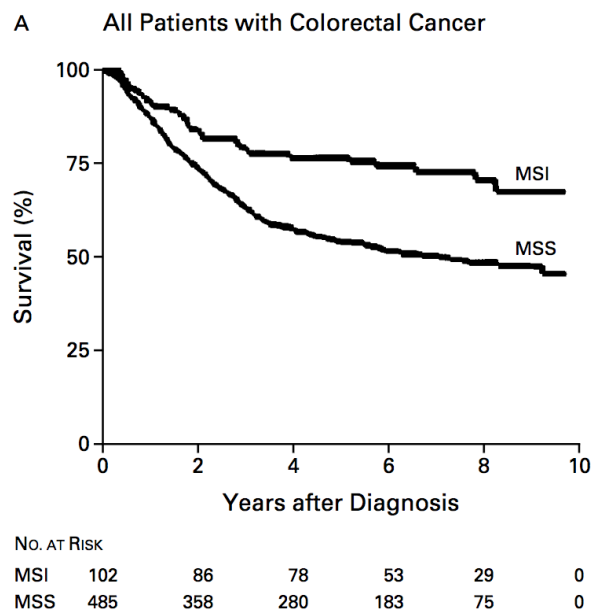


Figure 6 : Courbe de survie de Kaplan-Meier en fonction du statut MSS et MSI du cancer colorectal montrant une meilleure survie pour les patients atteints d'un CCR instable. (28)

B. Surveillance digestive du cas et des apparentés

1 Surveillance colorectale

Les CCR se situent pour l'essentiel au niveau du colon droit (60-70% des CCR).

Ainsi, la sigmoïdoscopie seule ne constitue pas le moyen de dépistage le plus adapté contrairement à la coloscopie totale. De plus, la séquence adénome-cancer étant accélérée, et la fréquence des adénomes plans augmentée, il est recommandé de réaliser une coloscopie avec chromoendoscopie à l'indigo carmin tous les 1 à 2 ans à partir de l'âge de 20 à 25 ans quel que soit l'histoire personnelle ou familiale. (25)(26)(27)(28).

La chromoendoscopie à l'indigo carmin permet une meilleure visualisation des lésions planes et diminue le risque de cancer (29).

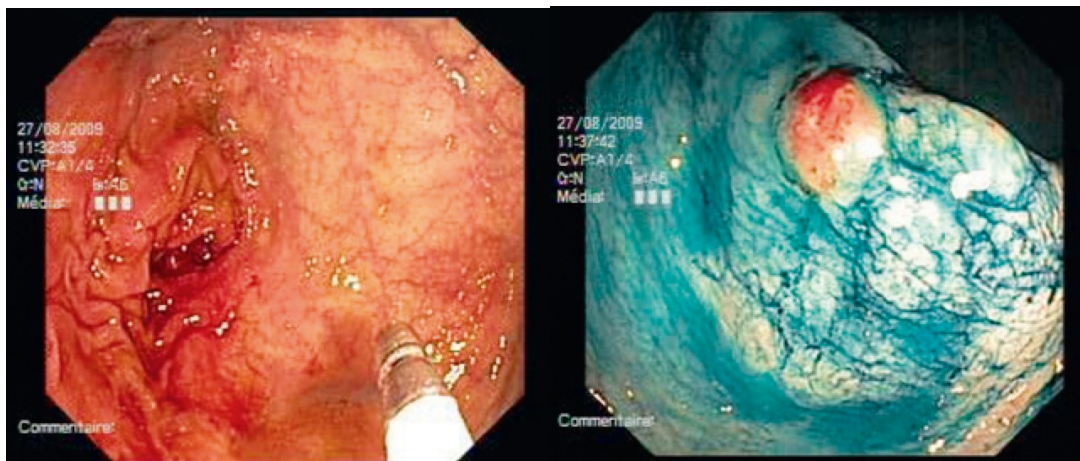


Figure 7: Chromoendoscopie à l'indigo-carmin. (30) A: Muqueuse colique avant coloration et B: Visualisation du polype plan après application de l'indigo-carmin avec un cathéter spray sur la muqueuse colique.

La colectomie totale prophylactique n'est pas recommandée dans la mesure où cette surveillance permet de réduire considérablement l'incidence de cancer par l'exérèse systématique des adénomes. (31)

3) Surveillance digestive haute

Compte tenu de leur fréquence et de l'efficacité du dépistage, une FOGD est recommandée afin de rechercher des lésions gastriques et duodénales et une infection à *Helicobacter Pylori* par la réalisation de biopsies antrales et fundiques dès le début du suivi colique.(32) Elle est répétée tous les quatre ans ou tous les deux ans en cas d'antécédents familial de cancer de l'estomac ou si une gastrite, une métaplasie intestinale ou un adénome sont mis en évidence.

C. Surveillance gynécologique du cas et des apparentés

Un dépistage comportant un examen clinique et une échographie endovaginale associée à des prélèvements endométriaux à la pipelle de Cornier doit être réalisé tous les 1 à 2 ans à partir de 30-35 ans ou 5 ans avant le premier cas de cancer gynécologique dans la famille.

V. PRISE EN CHARGE

A. Cancer colorectal

1) Chirurgie

Le traitement des CCR est chirurgical par la réalisation d'une colectomie partielle.

Une colectomie totale avec anastomose iléo-rectale peut être envisagée pour les patients à haut risque, c'est à dire les jeunes patients non compliants à la surveillance endoscopique et/ou qui ont développé un cancer colique malgré une surveillance adéquate.

En effet, le risque de CCR métachrone est estimé à 40% à 20 ans en cas de CCR traité par colectomie segmentaire, alors qu'il est inférieur à 3% en cas de colectomie subtotale.(33) De plus, lorsqu'une colectomie segmentaire est réalisée, l'incidence de CCR métachrone augmente considérablement en fonction du temps avec un risque de 16% à 10 ans, de 41% à 20 ans et de 63% à 30 ans.

Cependant, aucune étude prospective ou rétrospective n'a montré de gain de survie pour ces patients qui ont subi une résection étendue par rapport à ceux ayant bénéficié d'une résection segmentaire.(34) De plus, il est important de souligner que la colectomie totale ne réduit pas le risque de cancer du rectum, qui est estimé à 12% à 12 ans après colectomie.

(35)

C'est pourquoi, il est recommandé d'effectuer une prise en charge individualisée.

2) Chimiothérapie

Cancer colorectal MSI Stade II

La chimiothérapie adjuvante n'est pas recommandée pour les CCR MSI de stade II à faible risque du fait de leur bon pronostic. De plus, les CCR MSI ne bénéficient pas d'une chimiothérapie à base de 5-FU (5 Fluorouracile).(36)

En revanche, pour les CCR MSI à haut risque de récurrence, une chimiothérapie adjuvante par FOLFOX (acide folinique, 5 Fluorouracile, Oxaliplatine) est à discuter au cas par cas.

Les CCR à haut risque se caractérisent par un stade T4, une perforation tumorale, un syndrome occlusif, des embolies vasculaires veineux ou lymphatiques et des engainements périnerveux.

Une chimiothérapie par Oxaliplatine est recommandée.

En cas de contre-indication formelle à l'oxaliplatine, une chimiothérapie par 5FU sera réalisée.

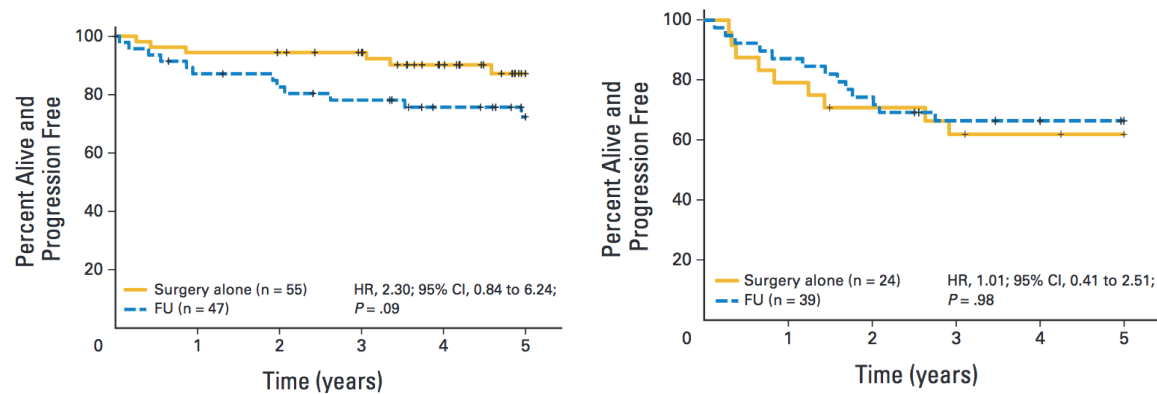


Figure 8 : Courbes de survies de Kaplan Meier : survie en fonction du traitement chirurgical seul ou associé à une chimiothérapie par 5FU pour les CCR.(36) A gauche : Diminution de la survie sans progression (à la limite de la significativité) dans le groupe ayant reçu du 5FU par rapport à la chirurgie seule chez les patients ayant un cancer colorectal stade II avec instabilité microsatellitaire. A droite : Absence de bénéfice de la chimiothérapie par 5FU n'apporte pas de bénéfice sur la survie globale par rapport à la chirurgie seule chez les patients ayant un cancer colorectal stade III avec instabilité microsatellitaire.

B. Cancers de l'endomètre

1) Tumeurs endométrioïdes

Les tumeurs endométrioïdes de stade FIGO I sont les plus fréquentes. Leur traitement repose principalement sur une hystérectomie totale associée à une salpingo-ovariectomie bilatérale. Elle peut être associée à des curages lombo-aortiques et pelviens en cas de mauvais pronostic.

La découverte d'un cancer ovarien synchrone modifie la prise en charge. Celle-ci reposera sur une hystérectomie totale avec curages pelviens et lombo-aortiques et une omentectomie.

2) Tumeurs non endométrioïdes

Les cancers à cellules claires ou papillaires séreux sont observés dans 25 à 40% des cas de cancer de l'endomètre s'intégrant dans le cadre d'un syndrome de Lynch. Leur prise en charge chirurgicale associe une hystérectomie totale, des curages lombo-aortiques et pelviens et une omentectomie.

3) Particularité des patientes nullipares jeunes

En cas de tumeurs de bon pronostic, c'est-à-dire un carcinome endométrioïde bien différenciés et dont l'envahissement myométrial est limité, un traitement conservateur peut être proposé.

C. La place de l'immunothérapie

Compte tenu de l'inactivation du système MMR, les tumeurs du spectre du SL sont hypermutées, ce qui conduit à la formation de néo-antigènes potentiellement immunogènes. Ceci explique l'important infiltrat lymphocytaire dans ces tumeurs. Ainsi, ces tumeurs pourraient être potentiellement sensibles aux immunothérapies. Récemment, il a été démontré une efficacité de ces immunothérapies, notamment le pembrolizumab, anti-PD1 dans les tumeurs colorectales et endométriales .(37)

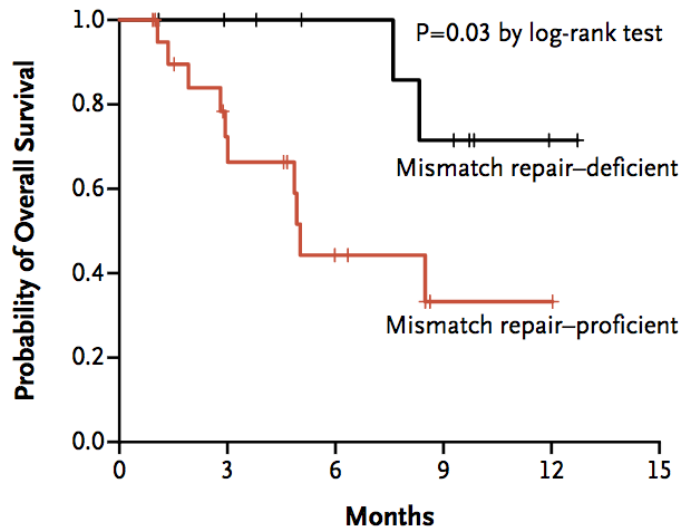


Figure 9: Courbe de survie de Kaplan Meier montrant le bénéfice clinique sur la survie globale de l'utilisation des anti-PD1 chez les patients atteints d'un cancer colorectal avec instabilité microsatellitaire. (37)

D. Prise en charge préventive

L'annexectomie prophylactique associée à une hystérectomie doit être systématiquement abordée, et est recommandée une fois le projet parental achevé, vers l'âge de 40-45 ans. En effet, le risque de cancer de l'endomètre et de l'ovaire reste élevé malgré la surveillance (38). Il est de 33% pour le cancer de l'endomètre et de 5 % pour le cancer de l'ovaire en cas de simple surveillance. Cependant, il est quasi-nul en cas de chirurgie prophylactique.

E. Consultation d'oncogénétique

La consultation d'oncogénétique est indiquée pour tous les patients répondants aux critères d'Amsterdam II élargis (Cf ci-dessous).

Elle consiste à évaluer la probabilité de l'existence d'une forme de prédisposition monogénique.

Lors de la première consultation, le généticien informe le patient sur les possibilités de diagnostic et de prévention. Il reconstitue l'histoire familiale, puis établit un arbre généalogique avec recueil de tous les cas de cancer.

Puis un temps de réflexion est suivi d'une nouvelle consultation au cours de laquelle un prélèvement génétique sera proposé au patient. Le prélèvement génétique est réalisé après l'obtention du consentement libre, éclairé et signé du patient. Il peut être sanguin ou salivaire.

C'est à partir de ce prélèvement, qu'une étude génétique sera réalisée, afin de rechercher une mutation constitutionnelle d'un des gènes MMR.

Les résultats seront transmis au patient lors d'une troisième consultation d'oncogénétique.

En fonction des résultats, une prise en charge prophylactique accompagnée d'une surveillance et d'une prise en charge psychologique sera proposée au patient.

Il lui sera recommandé de transmettre l'information dans sa famille afin de dépister les apparentés atteints.

VI. PHYSIOPATHOLOGIE

A. Système MMR

Ce système est composé de 4 principaux gènes codant pour 4 protéines qui interviennent dans la réparation des mésappariements de bases de l'ADN. Il joue un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité du génome.

Au cours de la réplication, l'ADN polymérase duplique l'ADN de la cellule mère. Cette enzyme a une activité de relecture exonucléotidique 3'-5' qui corrige les erreurs répliquatives. Néanmoins, les erreurs de réplication qui échappent à cette activité de relecture de l'ADN polymérase sont prises en charge par le système MMR, qui intervient donc de manière post-répliquative.

Le système MMR doit tout d'abord reconnaître les inadéquations entre 2 bases et les boucles d'insertion et délétion. Puis dans un second temps, il doit entraîner la réparation du brin néosynthétisé qui porte l'information génétique erronée.

Initialement, mis en évidence chez la bactérie *Escherichia.Coli*, ce système Mut HLS est constitué de protéines MutH, MutL et MutS.

1) La reconnaissance du mésappariement

Dans un premier temps, les complexes MutS α (MSH2-MSH6) et MutS β (MSH2-MSH3) reconnaissent l'anomalie et déclenchent le mécanisme de MMR.

Le complexe MSH2-MSH6 initie la réparation des mésappariements ne touchant qu'une seule base ainsi que les boucles d'insertions/délétions d'une seule base, tandis que le complexe MSH2-MSH3 initie la réparation des grandes boucles insertions/délétions de deux à quatre bases.(39)

2) Recrutement d'autres facteurs MMR

Puis, les homologues de MutL interagissent pour former 3 hétérodimères composés respectivement de MLH1-PMS2, MLH1-PMS1 et MLH1-MLH3. MLH1 étant la sous unité commune à ces 3 complexes.

3) Identification du brin portant l'erreur

La présence d'interruptions de brins situées à distance du mésappariement permet au complexe (MSH2-MSH6)-(MLH1-PMS2) de reconnaître le brin contenant l'erreur.

4) Excision du brin portant l'erreur

A partir de ces interruptions, l'exonucléase (Exo1) permet la dégradation du brin contenant le mésappariement. La molécule RPA recouvre le simple brin pour empêcher sa dégradation par les nucléases.

5) La resynthèse

La resynthèse du brin excisé nécessite l'ADN polymérase et la protéine PCNA. La PCNA est un cofacteur de l'ADN polymérase.

6) La ligation

Enfin la ligation du brin néosynthétisé est assurée par une ligase.

L'inactivation d'un des gènes du système MMR entraîne un processus oncogénétique des séquences répétées microsatellites du génome.

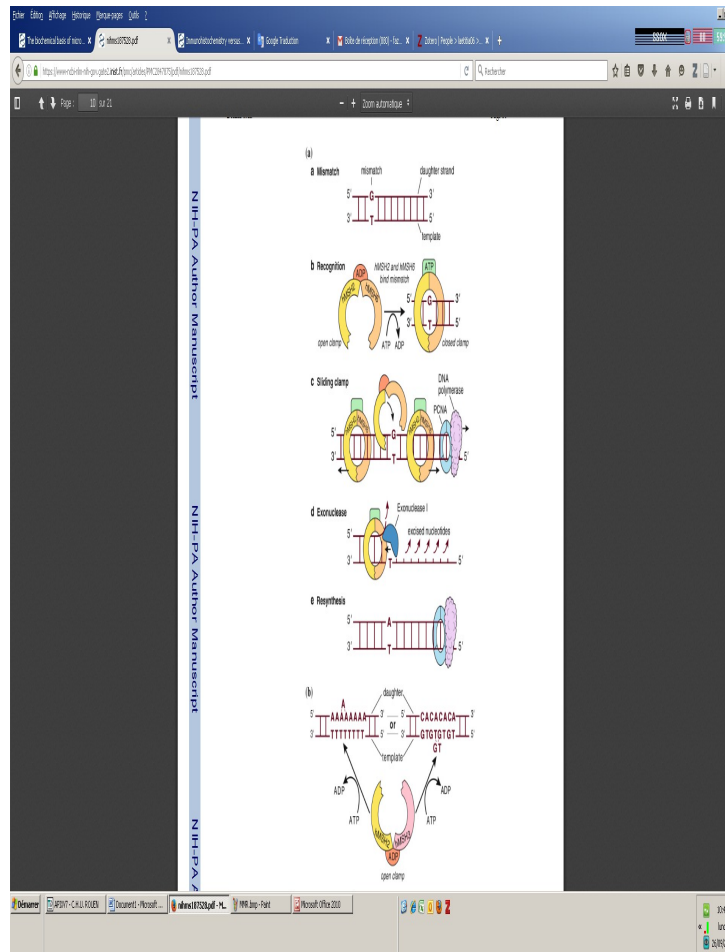


Figure 10: Système de réparation de l'ADN MMR chez l'homme (d'après Boland et al 2010 (40))

B. Mécanisme d'inactivation du système MMR dans le SL

Le syndrome de Lynch se caractérise par l'inactivation bi-allélique d'un des gènes MMR. En effet, la présence chez un individu d'une mutation constitutionnelle hétérozygote d'un gène MMR nécessite l'inactivation du second allèle de ce gène. Le second événement intervient uniquement dans les cellules du tissu tumoral, tandis que le premier est présent dans toutes les cellules de l'organisme et est transmissible. L'altération somatique du second allèle d'un gène *MMR* peut résulter d'une délétion, d'une mutation ponctuelle ou d'une modification épigénétique. Ainsi, l'inactivation de ce système de réparation dans le syndrome de Lynch

obéit à la théorie du double hit de Knudson et Comings. Ce modèle est décrit dans l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans la plupart des formes héréditaires de cancers.

Lorsque les deux allèles du gène MMR sont inactivés dans la cellule tumorale, les erreurs survenant lors de la réplication, ne seront plus réparées par le système MMR, ce qui conduira à une instabilité génétique touchant préférentiellement les séquences répétées, cibles préférentielles des erreurs de réplication.

Les microsatellites correspondent à de petites séquences répétées d'ADN (codantes ou non codantes) réparties sur l'ensemble du génome sont des microsatellites. Ils correspondent ainsi, à une répétition d'un nombre variable de fois, d'un seul nucléotide ou d'un motif di- tri- ou tétra-nucléotidique. On parle alors de microsatellites mono-, di, tri et tétra nucléotidiques respectivement.

L'instabilité des microsatellites (MSI) se caractérise par l'altération du nombre de séquences répétées (délétions et insertions) dans le génome des cellules tumorales par rapport aux cellules normales d'un même individu. Les cancers présentant un tel phénotype sont dits de type MSI (microsatellite instability) ou plus rarement dMMR (déficient MMR) par opposition aux cancers de type MSS (MicroSatellite Stability) ou pMMR (proficient MMR).

Il existe environ 32 gènes dans le génome humain dans lesquels il existe une répétition mononucléotide dans la séquence codante. Le gène le plus fréquemment muté dans les tumeurs MSI est *TGFβ1R2* qui contient une séquence répétitive de 10 Adénosine. Les plus longues séquences répétitives sont plus sujettes aux mutations que les plus courtes.

Le gène *Bax* a une séquence répétitive de 8 Guanines dans sa séquence codante. Cette dernière est mutée dans la moitié des tumeurs MSI. La perte de l'activité des protéines MMR accélère le taux d'accumulation de mutations dans les gènes responsables du contrôle de la

croissance cellulaire. Ainsi, il existe une croissance rapide des tumeurs et notamment de la séquence adénome-adénocarcinome colique.

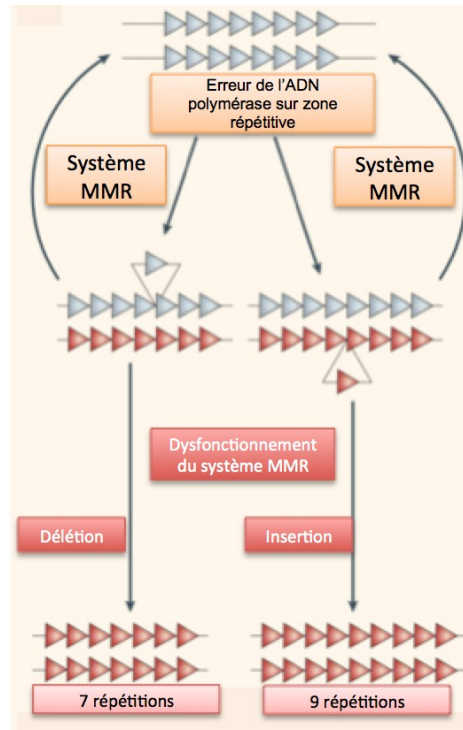


Figure 11: Instabilité microsatellitaire d'après (41). Lors de la réplication l'ADN polymérase effectue inéluctablement des erreurs et plus fréquemment au niveau des séquences répétées. Ces erreurs seront en partie corrigées par l'ADN polymérase et surtout par le système MMR. Lorsque ce dernier est défaillant, on observe lors de la réplication suivante des allongations et raccourcissement de la séquence.

VII. DIAGNOSTIC

Le diagnostic génétique moléculaire du syndrome de Lynch a été mis en place dans les années 90. Jusqu'à lors, le diagnostic était fondé sur l'histoire familiale. Des critères cliniques avaient été établis afin de dépister cette pathologie et standardiser les études. Ces critères de reconnaissance des agrégations familiales ont été progressivement élargis et ajustés au fil du temps.

Le diagnostic de Syndrome de Lynch se fait par la détermination d'une mutation constitutionnelle délétère ou d'un réarrangement de grande taille. Cette recherche est longue et coûteuse et nécessite un pré-criblage somatique des patients. Ce dernier consiste à réaliser une analyse par immunohistochimie des différentes protéines MMR et/ou une recherche d'instabilité microsatellitaire.

A. Critères de reconnaissance clinique

1) *Critères d'Amsterdam I*

En 1990, les critères d'Amsterdam I visaient à prédire le risque de cancer colorectal.

2) Critères d'Amsterdam II

Les critères d'Amsterdam I étaient trop restrictifs avec un manque de sensibilité important.

Les études des familles avec un syndrome de Lynch ont rapidement révélé la présence d'un excès de cancers de l'endomètre, de l'estomac, de l'intestin grêle, du système hépatobiliaire, des voies excrétrices urinaires et des ovaires (43). C'est pourquoi, en 1997 ces critères ont été révisés afin d'inclure les cancers extra-coliques appartenant au spectre du syndrome de Lynch.



3) Critères de Bethesda

Les critères d'Amsterdam II sont peu sensibles et trop restrictifs. Ils ne permettent pas de reconnaître de nombreuses familles atteintes d'un syndrome de Lynch. Afin d'améliorer le rendement du test de l'instabilité des microsatellites, des critères cliniques ont été définis afin de sélectionner les cas les plus susceptibles de présenter une instabilité significative (MSI-H). Ces critères ont été établis en 1997 par une conférence du NCI (National Cancer Institute) et sont au nombre de 7. (45)

Les critères de Bethesda avaient une excellente sensibilité (94%), mais une spécificité de seulement 25% ce qui signifie que trois familles sur 4 n'étaient pas porteuses d'une mutation *MLH1* ou *MSH2* (46).



4) Critères de Bethesda révisés :

Ces critères ont été révisés en 2004 (47). Le but de cette révision est de simplifier les critères afin de les rendre plus facilement applicables et de les élargir encore, afin de pouvoir déceler, au niveau de la population générale, un maximum de cas.



B. Indications du pré-criblage somatique en France

En France, les indications de recherche d'un phénotype MSI+ ont été encore élargies.

Ainsi, il est recommandé de rechercher au sein de la tumeur une instabilité microsatellitaire et/ou une perte d'expression des protéines MMR:

- pour tout patient de moins de 60 ans atteint d'un cancer colorectal.
- Pour tout cancer de l'endomètre diagnostiqué avant 50 ans.
- et/ou s'il existe un antécédent personnel et/ou familial au premier degré de cancer appartenant au spectre large du SL.(48)

C. Phénotype RER

Lorsque le système MMR est défaillant, on observe un phénotype RER (Replicative error) ou dMMR (deficient Mismatch Repair).

Les défaillances du système MMR sont essentiellement dues à une hyperméthylation somatique du promoteur du gène *MLH1*. Plus rarement, elles peuvent être d'origine héréditaire, correspondant à une altération constitutionnelle d'un des gènes *MMR* responsable du syndrome de Lynch.

L'instabilité microsatellitaire est présente dans 15 à 20% des cancers de l'endomètre, parmi lesquels seuls 15% correspondent à de réels syndrome de Lynch (20). Environ 15% des CCR sont dus à une défaillance du système MMR, parmi lesquels 2 à 5% sont des syndromes de Lynch et 10 à 15% sont d'origine sporadique. (49)

L'instabilité microsatellitaire ou la perte d'expression d'une protéine MMR ne permettent pas d'affirmer le diagnostic de syndrome de Lynch. Il s'agit de moyens permettant de présélectionner les patients qui pourront bénéficier d'une analyse constitutionnelle des gènes MMR en fonction des résultats des analyses somatiques. En effet, la majorité des tumeurs de phénotype dMMR résulte d'une répression épigénétique du gène *MLH1* par hyperméthylation des îlots CpG dans le promoteur, présente dans les cellules cancéreuses sénescents. (50).

Les mutations de *BRAF* surviennent dans plus de 80% des cas des tumeurs colorectales présentant une méthylation de la région promotrice de *MLH1*. (51) (52) (53). C'est pourquoi, en cas de perte d'expression immunohistochimique de la protéine MLH1 dans une tumeur colorectale, la recherche de la mutation *BRAF*, p.V600E doit être effectuée (cf annexe 2). A

l'inverse, l'absence de mutation de *BRAF* dans une tumeur colorectale doit conduire à la recherche d'une mutation constitutionnelle de *MLH1*, ou d'une mutation constitutionnelle du promoteur de *MLH1*.

La mutation p.V600E de *BRAF* n'est pas retrouvées en cas d'hyperméthylation somatique de *MLH1* dans le cancer de l'endomètre ou les autres cancers du spectre du SL. L'arbre décisionnel diffère donc pour ces cancers de celui des cancers colorectaux (cf annexe 3). Ainsi, dans ces tumeurs, une mutation *BRAF* n'est pas recherchée.

En cas de perte d'expression protéique de MSH2/MSH6, ou de perte isolée de MSH6, ou bien de perte isolée de PMS2, associée à une instabilité microsatellitaire intra-tumorale, la recherche d'une mutation constitutionnelle des gènes *MMR* correspondant doit être envisagée après consultation d'oncogénétique (cf annexes 2 et 3).

1) Analyse en Immunohistochimie des protéines MMR

L'immunohistochimie permet d'étudier l'expression des protéines MMR au sein de la tumeur sur une coupe histologique. Son interprétation nécessite la présence d'un témoin interne positif, c'est à dire un marquage nucléaire des cellules épithéliales de la muqueuse normale adjacente, des lymphocytes du centre germinatif des follicules lymphoïdes, ou des lymphocytes du stroma.

L'étude de l'expression des protéines MMR en immunohistochimie est intéressante puisqu'elle permet d'orienter l'analyse constitutionnelle vers le gène en cause. En effet, dans la mesure où la protéine normalement codée par le gène muté n'est généralement pas exprimée, le résultat de l'étude immunohistochimique donne une indication sur le gène en cause. Ainsi, une perte de l'expression combinée ou isolée de protéines MMR peut être observée au sein de la tumeur d'un patient porteur d'une mutation constitutionnelle du gène correspondant.

L'extinction des protéines MMR est le plus souvent couplée. Ainsi, la perte d'expression de la protéine MLH1 est presque toujours accompagnée d'une extinction de la protéine PMS2, et l'extinction de la protéine MSH2 associée à une perte d'expression de la protéine MSH6. En effet, ces protéines agissent sous forme d'hétérodimères MLH1-PMS2 et MSH2-MSH6.

L'inactivation d'une des deux protéines peut affecter l'expression de la protéine partenaire.

Les protéines MSH6 et MSH3 agissent avec la protéine MSH2 afin de former des hétérodimères. La protéine MSH2 étant indispensable pour la stabilité du complexe, on observe fréquemment une perte d'expression des protéines MSH2 et MSH6 en présence d'une mutation du gène *MSH2*. Cependant, on peut observer une perte isolée de l'expression protéique de MSH2 lorsqu'il existe une grande boucle insertion/délétion de deux à quatre bases faisant intervenir le complexe MSH2-MSH3. La perte isolée de MSH2 ou associée à un défaut d'expression de MSH6 est quasi-pathognomonique d'un syndrome de Lynch.

MSH6 est une protéine mineure et ne joue aucun rôle dans la stabilisation du complexe MSH2-MSH6. C'est pourquoi, en cas de mutation de *MSH6*, nous n'observerons qu'une perte d'expression isolée de la protéine MSH6. En effet, la protéine MSH2 se lie à la protéine MSH3 afin de compenser la perte de fonction de la protéine MSH6. Cette perte isolée de MSH6 est quasi pathognomonique d'un syndrome de Lynch impliquant le gène *MSH6*. Le patient sera orienté vers un généticien lorsqu'il existe une perte d'expression de MSH2 et/ou de MSH6 au sein de la tumeur (Cf annexes 2 et 3).

En revanche, la perte d'expression de la protéine MLH1 associée à une perte d'expression de la protéine PMS2 peut être essentiellement due à une hyperméthylation somatique du promoteur du gène *MLH1*, ou plus rarement à une mutation constitutionnelle du gène *MLH1*. Ainsi, une recherche de mutation du gène *BRAF* sera effectuée dans un premier temps en cas de cancer colorectal (Cf annexe 2). Si cette mutation est présente dans une tumeur colorectale, une recherche d'hyperméthylation somatique du promoteur du gène *MLH1* sera

réalisée dans un second temps. Lorsqu'il s'agit d'une tumeur de l'endomètre ou un autre cancer du spectre du SL (hors cancer colorectal), une recherche d'hyperméthylation somatique du promoteur du gène *MLH1* sera recherchée d'emblée. Une consultation d'oncogénétique sera recommandée lorsqu'il n'est pas retrouvé d'hyperméthylation du promoteur du gène *MLH1*.

La perte d'expression isolée de *PMS2* est généralement associée à une mutation constitutionnelle du gène *PMS2*.

L'étude immunohistochimique des protéines MMR a une sensibilité de 92% dans la détection d'une défaillance du système MMR.(54) Il s'agit d'une technique peu onéreuse, facilement disponible et réalisable. Elle permet d'identifier la protéine anormale ce qui oriente les généticiens vers le ou les gènes de réparation des mésappariements à séquencer.

Cependant, l'efficacité de cette technique dépend du fixateur, de la qualité du fixateur et du temps de fixation. L'interprétation des immunomarquages nécessite une certaine expérience du pathologiste. De plus, les mutations faux sens responsables d'une perte de fonction de la protéine MMR, n'induisent pas sa perte d'expression immunohistochimique.

Cette technique immunohistochimique présente un meilleur rendement diagnostique sur les cancers colorectaux par rapport aux adénomes. Néanmoins, les adénomes en dysplasie de haut grade sont plus susceptibles d'être concordants avec la variation pathogène en cause que les polypes de bas grade.(55). Dans cette étude, parmi les 109 polypes analysés, seuls 79% des adénomes ont présenté une perte d'expression des protéines MMR.

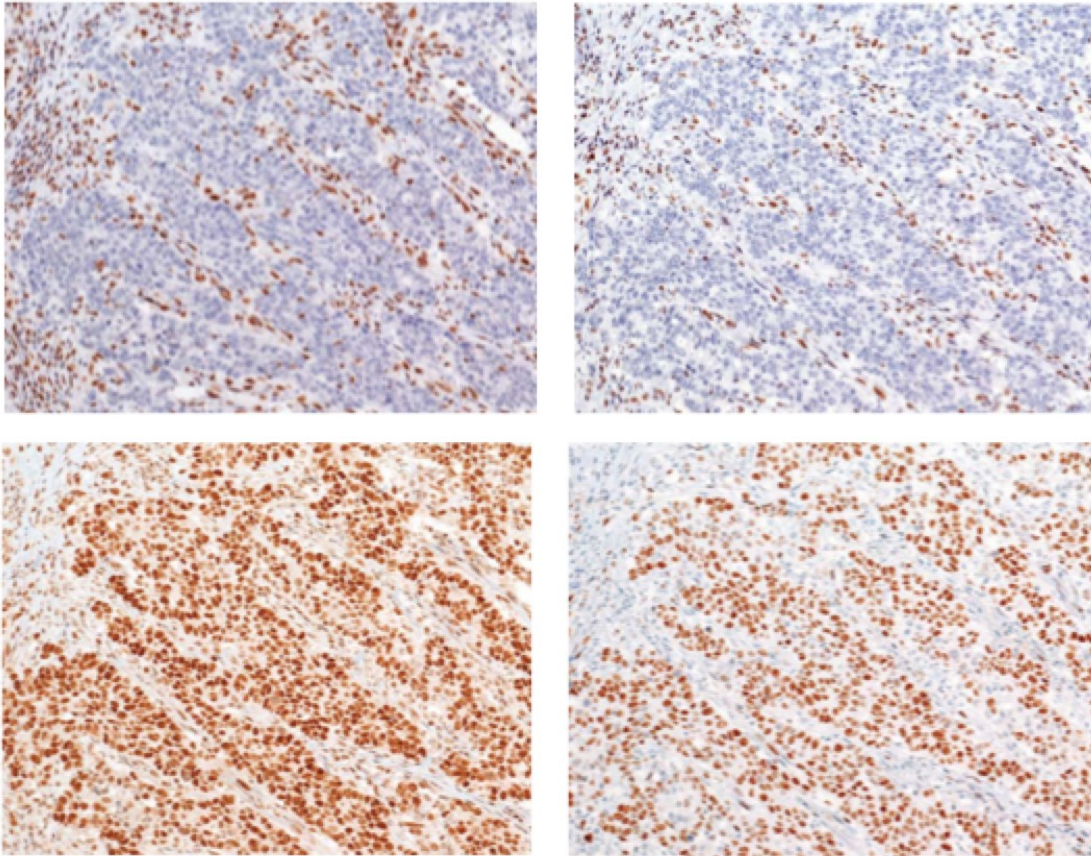


Figure 12 : analyse immunohistochimique des protéines MMR : Perte de l'expression protéique MLH1 (a) et PMS2 (b) au sein du tissu tumoral. Conservation de l'expression des protéines MSH2 et MSH6 au sein de la tumeur.

2) Recherche d'une instabilité microsatellitaire intra-tumorale

La recherche d'instabilité microsatellitaire est réalisée préférentiellement à partir d'un cancer colorectal mais elle peut être également réalisée à partir de n'importe quelle tumeur du spectre. Cette analyse est maintenant parfaitement standardisée et s'effectue dans les plateformes de génétique moléculaire des tumeurs. Elle peut être effectuée à partir d'une pièce opératoire ou d'une biopsie.

Le pathologiste sélectionne un bloc représentatif et suffisamment riche en cellules tumorales après un contrôle morphologique sur lame colorée HE ou HES (Hématoxyline, Eosine et/ou Safran). Le génotypage est réalisé après amplification par PCR de cinq marqueurs microsatellites mononucléotidiques quasi monomorphes, c'est à dire pour lesquels il n'y a

pas de variabilité interindividuelle, déterminés lors d'une conférence de consensus : BAT25, BAT26, NR21, NR22 et NR24 ou NR27.

Les tumeurs qui se développent dans le cadre du SL ont un phénotype instable qui se caractérise par l'apparition de séquences microsatellitaires de taille variable par rapport à la normale. Ceci se traduit par la détection de pics surnuméraires lors de la superposition des profils obtenus à partir de la tumeur et du tissu sain.

Une tumeur sera considérée comme instable, lorsqu'il existe au minimum 3 marqueurs instables au sein du tissu tumoral parmi les 5 analysés.

Cette technique est fiable et robuste. Néanmoins, elle ne permet pas d'orienter les analyses constitutionnelles et nécessite une certaine quantité d'ADN de bonne qualité.

Cette analyse est moins efficace sur les adénomes que sur les cancers invasifs.(56)

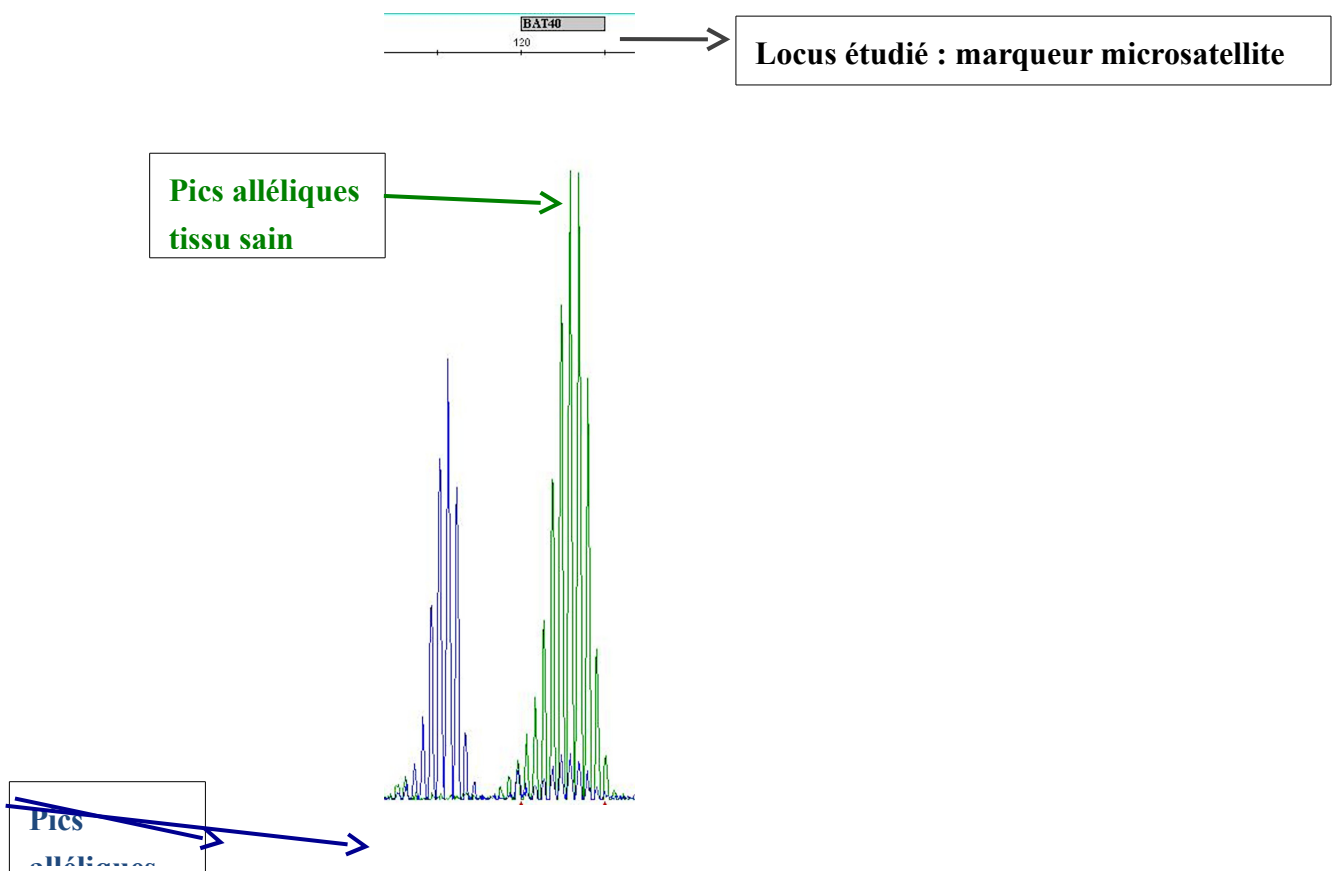


Figure 13: Exemple de profil instable intra-tumoral pour le marqueur microsatellite BAT40.

Les techniques d'immunohistochimie et de biologie moléculaire sont concordantes, et complémentaires. En cas d'instabilité microsatellitaire associée à une perte d'expression des protéines MSH2 et MSH6, ou à une perte isolée de la protéine MSH6, ou à une perte isolée de la protéine PMS2, ou bien à une perte d'expression des protéines MLH1 et PMS2 sans hyperméthylation du promoteur de MLH1 retrouvée, le patient sera adressé en consultation d'oncogénétique pour une analyse constitutionnelle des gènes MMR (Cf annexes 2 et 3).

D. Analyses constitutionnelles

L'analyse de l'ADN constitutionnel est effectuée à partir d'ADN leucocytaire ou d'ADN tissulaire. L'ADN leucocytaire provient d'un prélèvement sanguin tandis que l'ADN tissulaire provient du frottis jugal.

Les analyses génétiques sont effectuées après avoir informé le patient et recueilli son consentement libre et éclairé, lors de la consultation d'oncogénétique. En fonction du résultat de l'immunohistochimie, on effectuera une analyse ciblée par séquençage Sanger ou bien le plus souvent, une analyse simultanée des gènes MMR sera réalisée avec des techniques de séquençage à haut débit.

La recherche de réarrangements génomiques ou de mutations dans les promoteurs de gènes sera effectuée dans un second temps. La délétion de *TACSTD1* en 3' est responsable d'une hyperméthylation constitutionnelle de MSH2.(57) Egalement appelée EPCAM (epithelial cell adhesion molecule), cette anomalie est responsable dans 10 à 20 % des cas d'une perte d'expression de MSH2. Elle sera également recherchée dans un second temps.

Parfois, il s'agit de VSI (Variant de Signification Inconnue). Des outils de prédilection, des tests fonctionnels *in vitro* et/ou une analyse de ségrégation familiale peuvent permettre parfois de trancher entre un polymorphisme et une mutation délétère.

1) Méthodes d'identification d'une mutation constitutionnelle des gènes MMR

Séquençage Sanger

Le séquençage Sanger est la technique de référence permettant l'identification des mutations ponctuelles, substitutions, insertions et délétions.

Il s'agit d'une méthode de séquençage par synthèse enzymatique inventée en 1977 par Frederick Sanger. Elle consiste à amplifier l'ADN par PCR (Polymérase Chain Reaction). Elle est suivie d'une élongation par des ADN polymérases thermostables (PCR) et l'ajout des quatre désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) avec une faible concentration de l'un des quatre didésoxyribonucléotides (ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP). Les ddNTP fluorescents une fois incorporés dans le nouveau brin synthétisé, empêchent la poursuite de l'élongation.

On obtient un mélange de fragments d'ADN de tailles croissantes qui se terminent tous au niveau d'une des bases dans la séquence. Ces fragments sont séparés par électrophorèse sur gel polyacrylamide. On obtient un électrophérogramme après détection de la fluorescence des ddNTP. Néanmoins, la taille importante de ces gènes ainsi que le nombre élevé d'exons rendent cette analyse par séquençage direct longue et coûteuse.

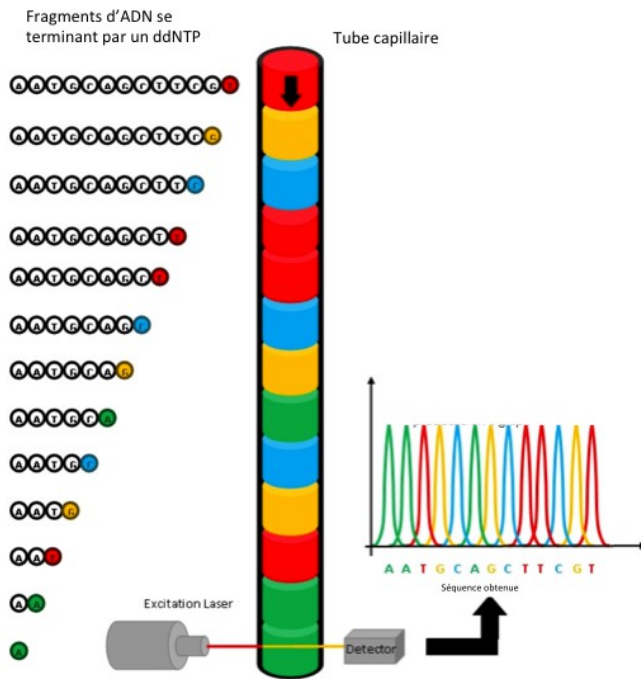


Figure 14 : Illustration des étapes du séquençage Sanger. Présence de fragments de taille croissante se terminant par un ddNTP, qui seront séparés par électrophorèse sur gel polyacrylamide. On obtient ainsi un électrophérogramme après détection de la fluorescence des ddNTP.

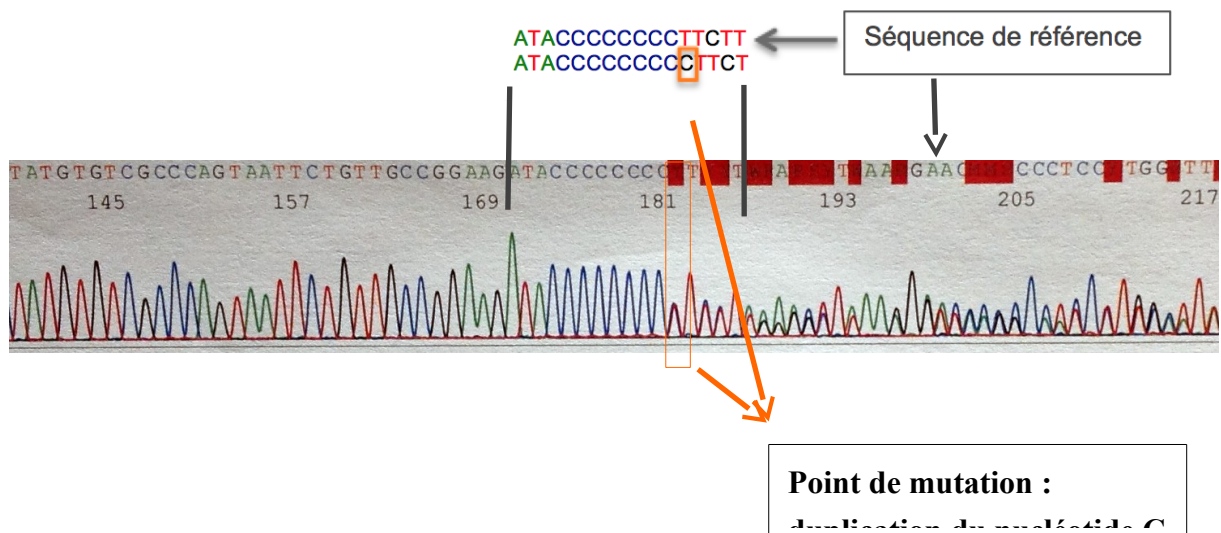


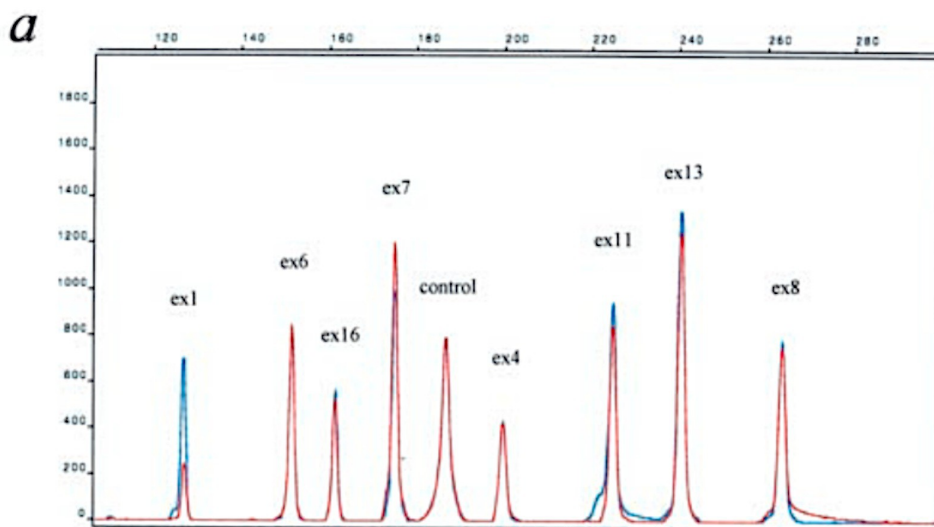
Figure 15 : Exemple d'électrophérogramme obtenu lors du séquençage Sanger du gène MSH6 : lors de la comparaison par rapport à la séquence de référence, on observe en position 3261, une duplication du nucléotide C, entraînant un décalage du cadre de lecture ((mutation hétérozygote délétère de l'exon 5 du gène MSH6 c.3261dup, pPhe1088LeufsX5)

QMPSF (Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent Fragment)

Elle permet l'étude de réarrangements de grande taille, duplications ou délétions. Il s'agit d'une méthode semi-quantitative basée sur une PCR multiplex de courts fragments fluorescents.

Cette technique consiste à effectuer une PCR multiplex dans un premier temps, puis analyser de façon semi-quantitative les fragments. Ainsi, plusieurs régions génomiques sont conjointement amplifiées. Les produits de PCR sont ensuite séparés par électrophorèse capillaire. L'analyse des électrophérogrammes est semi-quantitative puisqu'elle compare la quantité des amplicons d'intérêt aux amplicons correspondants chez un témoin normal.(58) (59)(60)

Plusieurs études basées sur l'utilisation de la QMPSF montrent que les réarrangements du gène *MSH2* sont impliqués dans au moins 10% des syndromes de Lynch. (61)(62)(63)



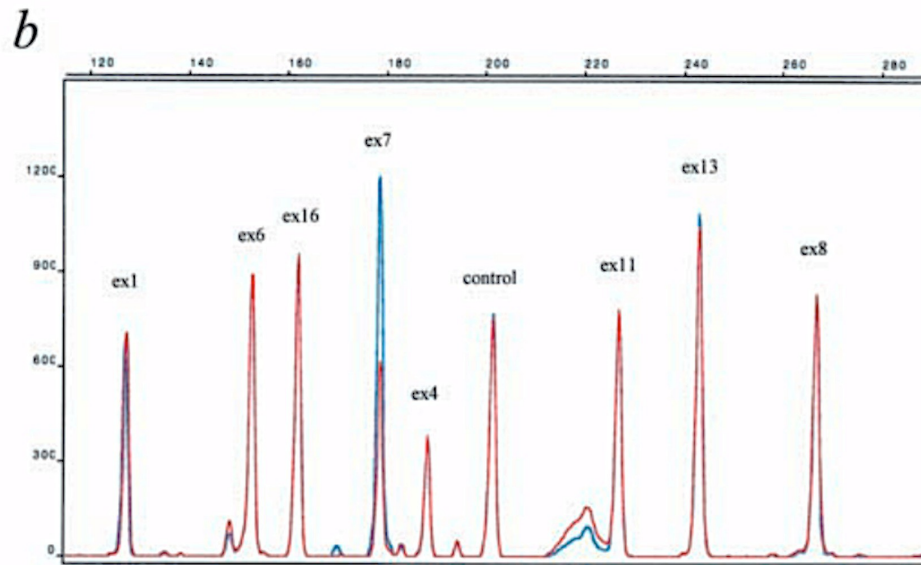


Figure 16 : Electrophérogamme de 2 patients (rouge) superposés au contrôle (bleu) après réalisation d'une QMPSF : mise en évidence de délétions de grande taille intéressant l'exon exon 2 (figure a) et l'exon 7 (figure b) du gène MSH2.

Séquençage à haut débit

Le séquençage nouvelle génération associé à une analyse bioinformatique adaptée, permet de rechercher simultanément des variations ponctuelles et des réarrangements génomiques. Il existe différentes technologies de séquençage à haut débit.

Parmi ces techniques, nous pouvons trouver la PCR en émulsion suivie d'un pyroséquençage.

La technologie Illumina consiste à effectuer une PCR en pont en phase solide associée à l'utilisation d'analogues nucléotidiques modifiés porteurs d'une molécule fluorescente ayant les caractéristiques d'un terminateur réversible (Cf annexe 4).

Enfin la technologie solide s'effectue par une PCR par émulsion suivie d'un séquençage par ligation.

4) Les gènes du système MMR

Dans le SL, la mutation constitutionnelle intéresse principalement un des 4 gènes qui code pour une des protéines MMR : *MLH1* ou *MSH2* le plus souvent ; *MSH6* plus rarement et *PMS2* exceptionnellement.

MLH1

Le gène *MLH1* est localisé sur le chromosome 3 en position 3p22. Il est composé de 19 exons et code pour une protéine de 84kDa constituée de 756 acides aminés.

La protéine MLH1 est constituée de différents domaines fonctionnels dont le domaine ATPase, le domaine d'interaction avec PMS2 ou Mlh3 pour former l'hétérodimère, et le domaine d'interaction avec les homologues MutS (*MSH2* et *MSH6*). (64) (65)(66)

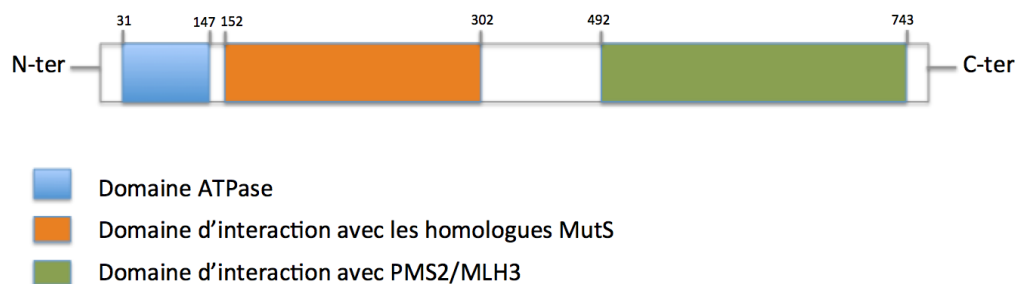


Figure 17: représentation schématique de la protéine MLH1 d'après (67)

MSH2

Le gène *MSH2* fut le premier gène identifié en 1993 par la réalisation d'analyses de liaison menées dans deux grandes familles présentant un syndrome de Lynch (68). Ce gène se situe sur le locus 2p22-p21 (69)(70) et comporte 16 exons. Il code pour une protéine de 104kDa constituée de 934 acides aminés.

La protéine MSH2 possède un domaine de liaison avec l'ADN intervenant dans la reconnaissance des mésappariements. Le domaine d'interaction MSH3/MSH6 permet de former l'hétérodimère.

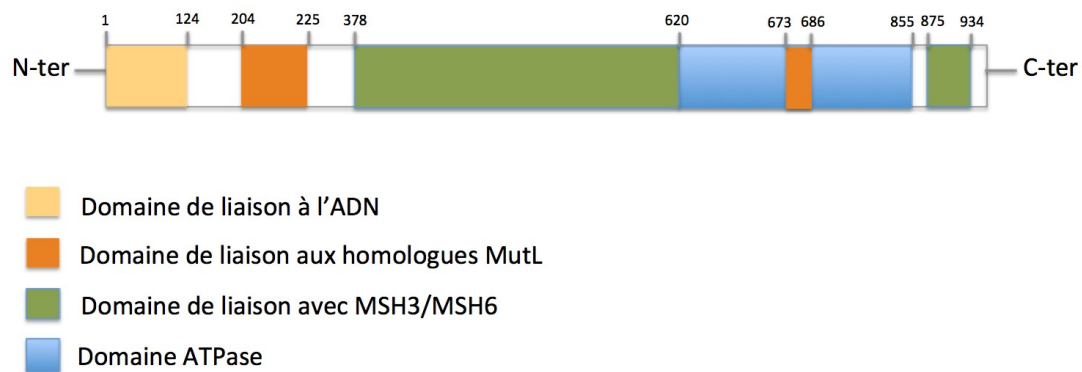


Figure 18: Représentation schématique de la protéine MSH2 d'après (71)

MSH6

MSH6 fut le second gène identifié sur le chromosome 2, localisé en 2p16 (72) (73) (74) (75). Il comporte 10 exons et code pour une protéine de 1360 acides aminés.

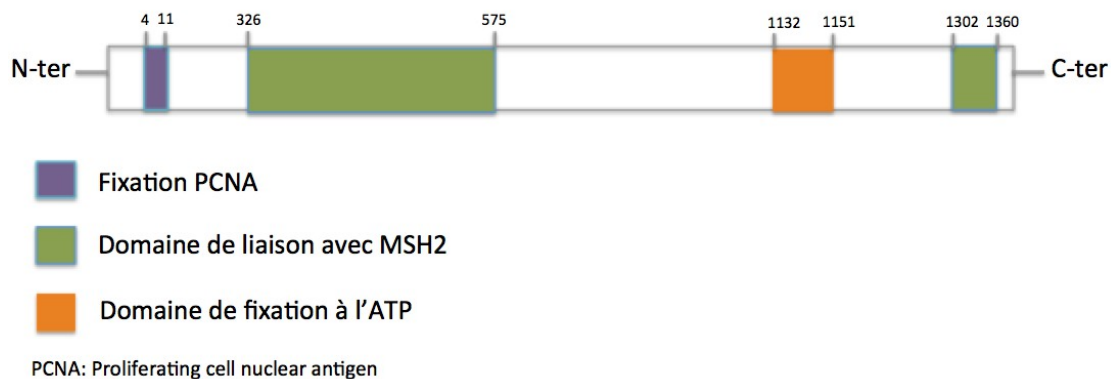


Figure 19: Représentation schématique de la protéine MSH6.

PMS2

Le gène *PMS2*, situé en position 7p22, comprend 15 exons codant pour une protéine de 862 acides aminés. (76).

VIII. CARACTERISTIQUES DES MUTATIONS

La majorité des mutations responsables des cancers familiaux du syndrome de lynch sont situées sur les gènes *MLH1* et *MSH2* (77). Les réarrangements de grande taille, en particulier à type de délétion sont plus fréquents dans le gène *MSH2* (figure 20).

Les cancers urothéliaux sont principalement induit par un mutation constitutionnelle du gène *MSH2* (78)(79).

Les mutations *MSH6*, principalement des mutations ponctuelles correspondent à 10% des mutations des gènes MMR. Les mutations du gène *PMS2* sont rares. Ceci est probablement du à une sous-évaluation en raison des difficultés rencontrées pour les mettre en évidence.

De plus, les anomalies épigénétiques peuvent être responsables de syndrome de Lynch.

Les délétions de la région C-terminale du gène *EPCAM/TACSTD1*, localisées dans la région 5' du gène *MSH2* entraînent la méthylation du promoteur du gène *MSH2*.(80)(81)(82).

L'hyperméthylation constitutionnelle du gène *MLH1* est très rare. Elle représente entre 0,6 et 1% de l'ensemble des anomalies responsables de syndrome de Lynch. La plupart de ces épimutations surviennent *de novo* et ne sont pas transmises à la génération suivante.

Le risque de cancer varie en fonction de la mutation retrouvée. Le risque de cancer est plus élevé en cas de mutation de *MLH1* ou *MSH2* (40-70%) par rapport aux mutations de *MSH6* et *PMS2*.(83). En cas de mutations *MSH2*, le risque de cancer extradiigestif est plus élevé.

Les mutations constitutionnelles de *MSH6* sont associées à un risque moindre de CCR et à un risque majoré de cancer de l'endomètre (84)(85)(86)

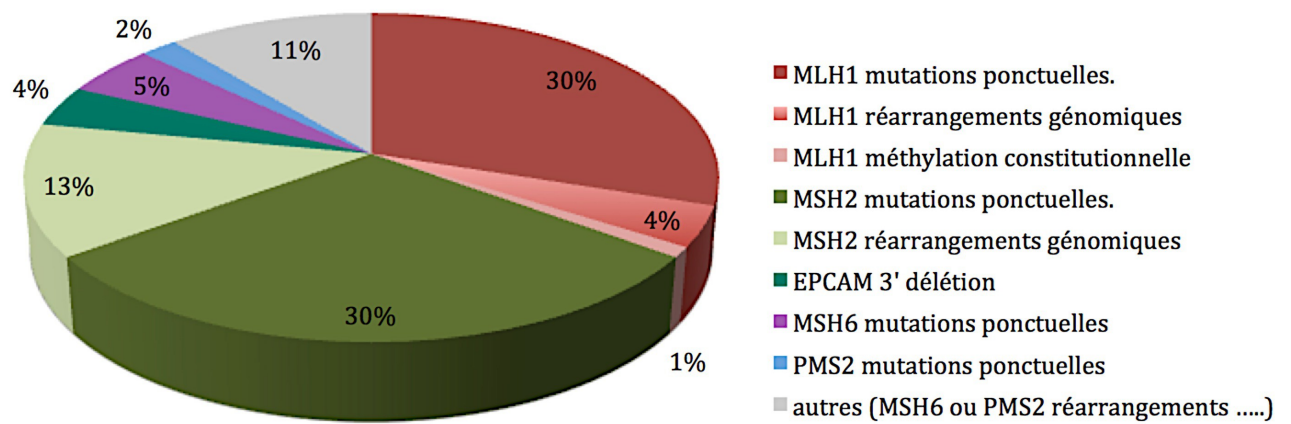


Figure 20: Répartition des différents types de mutations des gènes MMR au cours du syndrome de Lynch (87)

OBJECTIF

L'identification des individus à haut risque de syndrome de Lynch est importante car ces individus et leurs proches peuvent bénéficier d'un conseil génétique et d'une surveillance accrue, permettant une détection précoce des tumeurs du spectre et une diminution de la mortalité spécifique de la maladie. Cette pré-sélection s'effectue par la réalisation d'analyses somatiques.

Dans la grande majorité des cas, il existe une bonne concordance entre les analyses somatiques et constitutionnelles. Néanmoins, dans de rares cas, nous pouvons observer des discordances.

Ce travail de thèse a pour objectif d'étudier ces discordances afin de les comprendre pour mieux les appréhender.

Nous avons renouvelé les analyses somatiques sur ces cas discordants afin de les reclasser en 3 catégories :

- cas non discordants
- cas discordants
- cas non contributifs

MATERIELS ET METHODES

I Les cas discordants

Dans cette étude rétrospective, 23 cas discordants ont été inclus. L'ensemble de ces cas présentaient un syndrome de Lynch, diagnostiqué au laboratoire de Génétique constitutionnelle du CHU de Rouen entre 2007 et 2014.

Les cas avaient été sélectionnés sur les critères suivants :

- discordance entre les analyses moléculaires et/ou immunohistochimiques et le résultat de l'analyse constitutionnelle portant sur les gènes MMR.
- Caractère délétère de l'altération constitutionnelle des gènes *MLH1*, *MSH2* et *MSH6*.

Les analyses somatiques avaient été effectuées à Rouen, à Rennes, à Brest, à Strasbourg et à Poitiers.

La plupart des blocs provenaient de laboratoires privés de la région Nord-Ouest.

IX. Diagnostic de la mutation constitutionnelle

Ces patients avaient été testés dans un premier temps soit par séquençage à haut débit ou « Next Generation Sequencing » (NGS) sur ILLUMINA GA II (Cf Annexe), soit par séquençage Sanger à partir de l'ADN constitutionnel.

Si un syndrome de Lynch était fortement suspecté sur les critères cliniques et les résultats des analyses somatiques, une Quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments

(QMPSF) était réalisée dans un second temps à partir de l'ADN constitutionnel extrait du premier prélèvement. Cette technique permet de rechercher des réarrangements de grande taille.

Le prélèvement sanguin ou salivaire était effectué lors de la consultation d'oncogénétique après avoir recueilli le consentement libre et éclairé du patient.

Afin de confirmer la présence de l'altération constitutionnelle, un second prélèvement suivi d'une seconde analyse par séquençage de Sanger ou QMPSF était effectuée.

A. Caractère délétère de la variation

Le caractère délétère de l'altération constitutionnelle a été déterminé en fonction des critères suivants:

- si la variation est tronquante : codon stop ou mutation décalant le cadre de lecture et induisant un codon stop prématuré.
- si elle touche un site canonique d'épissage (AG et GT), les +1 et +2 ainsi que les -1 et -2.
- si c'est une mutation faux sens, le caractère délétère est établi sur les critères suivants :
 - identification de la variation comme délétère dans les bases de données nationales et internationales (ex : HGVM, Polyphen)
 - fréquence allélique de la mutation dans les différentes populations selon les origines
 - conservation de l'acide aminé, localisation dans un domaine fonctionnel de la protéine
 - écart physico-chimique entre l'acide aminé sauvage et celui prédit par la variation

En effet, les substitutions d'acides aminés ne conduisent pas toutes à un effet pathogène et sont alors appelées variant de signification clinique incertaine (VSI). Des analyses fonctionnelles ou d'épissage permettent dans la plupart des cas de classer la variation.

Concernant la mutation c.2459-3T>G du gène *MSH2* selon la séquence de référence NM_000251, présente chez le patient n°10, celle-ci a été considérée comme délétère devant

les arguments ci-dessous :

- survenue de 3 tumeurs appartenant au spectre du syndrome de Lynch
- présence d'une instabilité microsatellitaire
- les prédictions bio-informatiques concernant l'épissage indiquant une destruction totale ou la diminution majeure de la force du site accepteur naturel d'épissage de l'intron 14
- Réalisation d'un test *ex-vivo* indicateur d'épissage montrant que cette mutation située en -3 de l'exon 15 entraîne un défaut d'épissage majeur conduisant à la production d'un transcrit excluant l'exon 15 et d'un transcrit porteur d'une délétion des 36 premiers nucléotides de l'exon 15.

La RT-PCR n'a pu être réalisée sur le prélèvement Paxgene réalisé chez ce patient. De même, une étude de la lignée lymphoblastoïde issu d'un prélèvement sur héparine lithium aurait permis de confirmer ce résultat, mais le patient est décédé.

B. Critères de qualité : NGS

Les critères de qualité pour le run de séquençage haut débit sont :

- Le pourcentage de régions cibles séquencées
- La profondeur de lecture doit être supérieure à 30.
- Le Q-score des bases doit être supérieur à 30 pour un risque d'erreur inférieur à 1/1000.

X. Analyses somatiques réalisées au sein des laboratoires de Rouen

Nous avons renouvelé l'analyse moléculaire à la recherche d'une instabilité microsatellitaire, lorsque le phénotype initial était MSS ou pMMR.

L'analyse immunohistochimique des protéines MMR a été réeffectuée lorsque le profil immunohistochimique initial des protéines MMR était discordant avec l'altération constitutionnelle délétère retrouvée chez un même patient.

Dans certains cas, les analyses moléculaires ainsi que l'immunohistochimie des protéines MMR s'étaient révélées discordantes avec le diagnostic génétique, ce qui nous a conduit à renouveler ces deux analyses.

A. Recherche d'instabilité microsatellitaire

Le génotypage par étude des microsatellites est effectué soit à partir d'ADN tumoral extrait de la tumeur et d'ADN normal issu du tissu sain du même patient, soit uniquement à partir de l'ADN tumoral.

L'ADN est ensuite amplifié par PCR avant d'être analysé.

1 Extraction d'ADN à partir de blocs de paraffine

L'ADN de tissu normal et tumoral est extrait à partir de coupes paraffinées. Les zones d'intérêt sont sélectionnées et repérées sur une lame HES (figure 21).

Les territoires tumoraux doivent contenir au moins 5 % de cellules tumorales.

Quatre coupes de 10µm d'épaisseur sont ensuite effectuées à partir du même bloc, et ne sont pas colorées.

Les zones préalablement repérées sur la lame HES sont macrodisséquées à l'aide d'un bistouri sur les lames blanches. L'ADN génomique est extrait à l'aide du kit Maxwell® 16 FFPE Plus LEV DNA purification kit (Promega, USA) selon les recommandations du fournisseur. Les extraits d'ADN sont ensuite conservés à -20°C

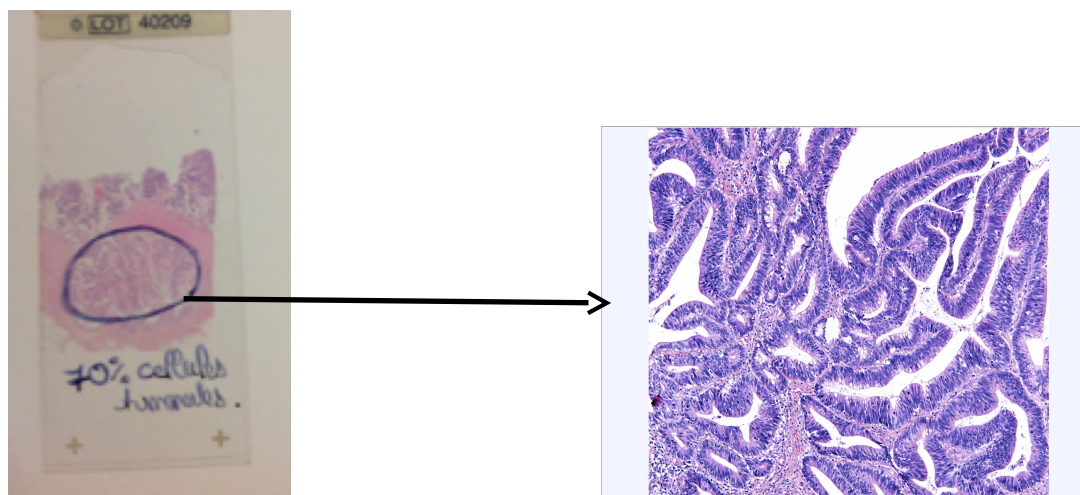


Figure 21: Sélection de la zone tumorale (TT) sur lame HES

5) Amplification de l'ADN : Polymérase Chain Reaction (PCR)

L'amplification des régions d'intérêt est effectuée par deux PCR multiplexe NR et TGF.

L'amplification est réalisée à l'aide de couples d'amorces spécifiques des régions d'intérêt, l'une des amorces étant marquée par un fluorochrome. Cela permet la séparation des produits de PCR par électrophorèse capillaire.

L'analyse est réalisée en parallèle pour le tissu sain et le tissu tumoral. Les loci étudiés sont :

- pour la PCR NR : NR-24, NR-22, BAT-25, BAT-26 et NR27
- pour la PCR TGFB : TGFB, LNS, MFD et AFM.

Les marqueurs de la PCR-NR sont dits quasi-monomorphes, c'est-à-dire caractérisés par un nombre de répétitions, très homogène dans une population donnée (entre les différents

individus et pour les 2 allèles d'un même individu). Les polymorphismes ne sont cependant pas exclus, en particulier pour les marqueurs BAT-25 et NR-21. Ils se traduisent par la présence de 2 pics distincts après amplification.

Les marqueurs de la PCR-TGFB sont polymorphes, ce qui permet de valider la concordance entre le tissu sain et le tissu tumoral, mais aussi l'absence de contamination inter-échantillon car chaque individu a des marqueurs spécifiques.

S'il n'y a pas de tissu sain, seule une PCR-NR sera réalisée.

La réaction de PCR est réalisée à partir d'un volume final de pré-PCR de 23 μ l comprenant 12,5 μ l de Qiagen® Multiplex PCR Kit, 2,5 μ l d'amorces spécifiques et 8 μ l d'eau stérile. Le volume d'ADN ajouté au mélange de pré-PCR varie en fonction de sa densité optique. Le mélange réactionnel est placé dans un thermocycleur réalisant une dénaturation de 15 minutes à 95°C, suivie de 35 cycles d'amplification comprenant une dénaturation de 30 secondes à 95°C, une hybridation des amorces de 90 secondes à 57°C et une élongation de 60 secondes à 72°C, suivie d'une élongation finale de 30 minutes à 60°C.

6) Analyse des données

Les produits de PCR obtenus sont séparés selon leur taille par électrophorèse capillaire puis analysés grâce au logiciel GeneMapper.

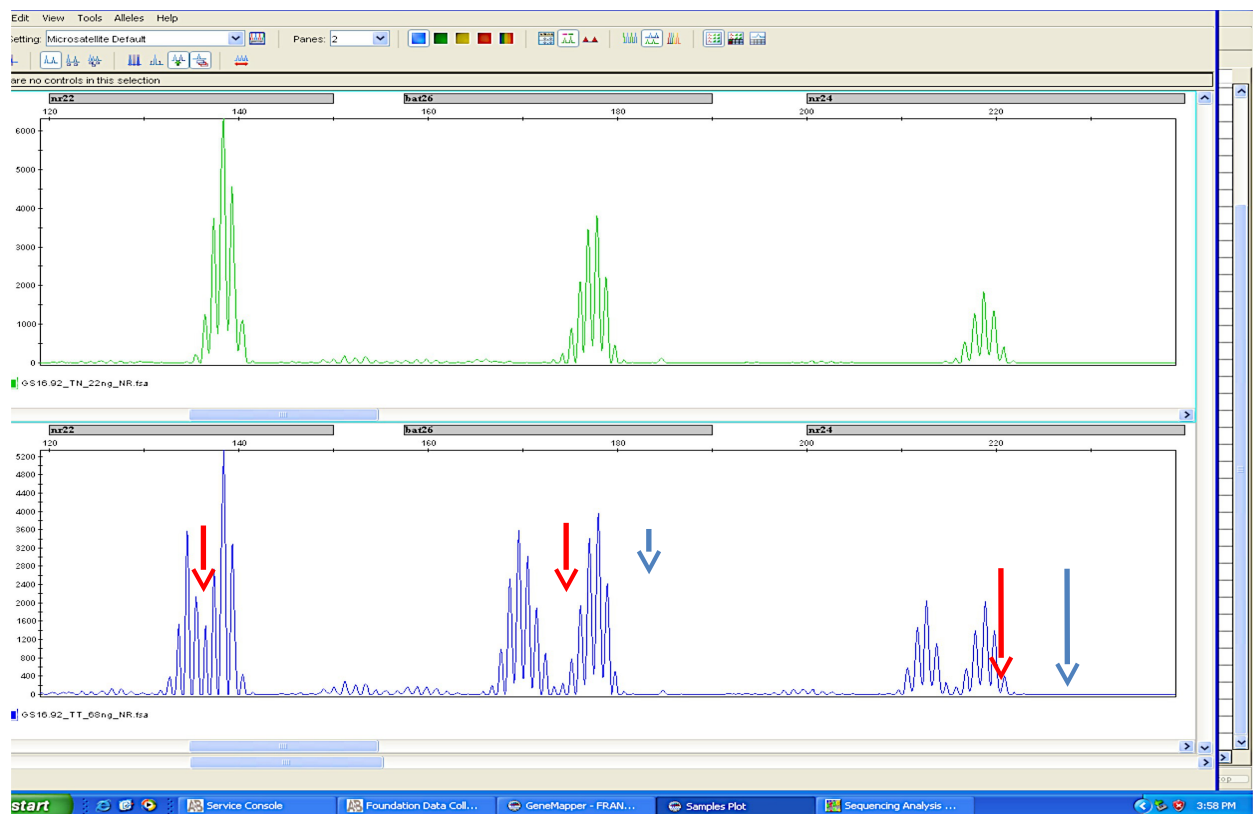
Les profils obtenus à partir de l'ADN tumoral et sain sont superposés. Pour chaque locus, on observe une distribution gaussienne.

L'existence d'une instabilité des microsatellites au niveau d'une tumeur (MSI-High) est définie par l'existence :

- d'un profil instable pour au moins 3 marqueurs (sur les 5 amplifiés) en l'absence d'analyse comparative possible avec du tissu sain et
- pour au moins 2 marqueurs en cas d'analyse comparative possible avec de l'ADN extrait du tissu sain.

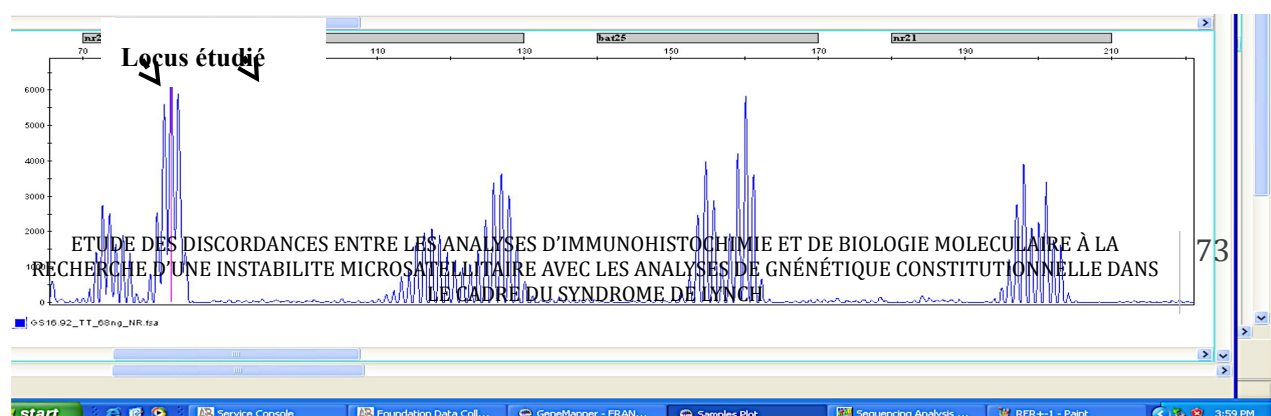
La présence d'un profil instable pour un seul marqueur correspond au profil MSI-L. Le statut MSI-low peut être également dû à d'autres mutations que les mutations constitutionnelles des gènes *MMR*. (88)

Ti
ss
u
t



Ti
ss
u
tu

Ti
ss
u
sain



73

Ti
ss
u
tu



Figure 22 : Exemple de profil instable. Présence de pics surnuméraires pour les locus NR22, Bat26, NR24, NR27, BAT40, BAT25 et NR21 au sein du tissu tumoral.

Tissu sain : vert ; Tissu tumoral : bleu ▼ allèle instable ▽ allèle normal

B. Analyse immunohistochimique des protéines MMR

1 Anticorps utilisés

Des coupes histologiques colorées par l'hématéine-éosine-safran (HES) sont réalisées sur chacun des blocs reçus.

Puis une étude immunohistochimique est effectuée avec les anticorps:

- MLH1 (anticorps monoclonal de souris, clone M1, Ventana®, prédilué),
- MSH2 (anticorps monoclonal de souris, G219-1129, Cell Marque®, prédilué),
- MSH6 (anticorps monoclonal de souris, clone 44, Ventana® prédilué) et
- PMS2 (anticorps monoclonal de lapin, EPR3947, Cell Marque®, prédilué), pour l'ensemble des lésions tumorales.

L'anticorps anti-PMS2 nécessite un kit d'amplification Roche (ref760-080)

Les immunomarquages sont effectués par les automates BenchMark XT et Ultra (Ventana Medical System®), sur coupes déparaffinées de 4µm, réalisées à partir des blocs reçus.

Pour l'anticorps anti-MSH2

Un démasquage antigénique par un tampon CC1 pendant 30 à 36 minutes suivant l'automate, à 95°C est réalisé. L'incubation avec l'anticorps primaire est effectuée pendant 16 minutes à 37°C.

Pour l'anticorps anti-MSH6

Un démasquage antigénique par un tampon CC1 pendant 60 à 61 minutes suivant l'automate, à 95°C est réalisé. L'incubation avec l'anticorps primaire est effectuée pendant 16 à 24 minutes suivant l'automate

Pour l'anticorps anti-MLH1

Un démasquage antigénique par un tampon CC1 pendant 60 à 64 minutes suivant l'automate, à 95°C est réalisé. L'incubation avec l'anticorps primaire est effectuée pendant 16 minutes à 37°C.

Pour l'anticorps anti-PMS2

L'anticorps anti-PMS2 nécessite un kit d'amplification Roche (ref760-080).

Un démasquage antigénique par un tampon CC1 pendant 60 à 64 minutes suivant l'automate, à 95°C est réalisé. L'incubation avec l'anticorps primaire est effectuée pendant 16 minutes à 32 ou 37°C suivant l'automate.

Le système de révélation utilisé (ultraView Universal DAB Detection Kit de Ventana Medical System®) met en évidence s'il y a lieu, l'antigène recherché, réaction traduite par une coloration brune, alors que le reste de la lame est coloré en bleu hémalum.

Ces 4 protéines étant localisées dans le noyau cellulaire, leur marquage est de type nucléaire en l'absence d'altération du gène correspondant.

La présence de témoin interne est indispensable, en particulier en cas d'extinction de l'expression protéique afin de ne pas méconnaître un faux négatif.

La présence de témoin interne est indispensable, en particulier en cas d'extinction de l'expression protéique afin de ne pas méconnaître un faux négatif.

7) Les résultats attendus en fonction de la mutation constitutionnelle présente

- En cas de mutation constitutionnelle du gène *MSH6*, on s'attend à observer une perte isolée de l'expression protéique de MSH6
- En cas de mutation constitutionnelle du gène *MSH2*, on devrait observer une perte de l'expression des protéines MSH2 et MSH6
- En cas de mutation constitutionnelle du gène *MLH1*, cela se traduit par une perte de l'expression des protéines MLH1 et PMS2
- En cas de mutation constitutionnelle du gène *PMS2*, une perte isolée de l'expression protéique de PMS2 sera observée.

L'analyse immunohistochimique des protéines MMR a été effectuée en aveugle par une pathologiste référente dans ce domaine.

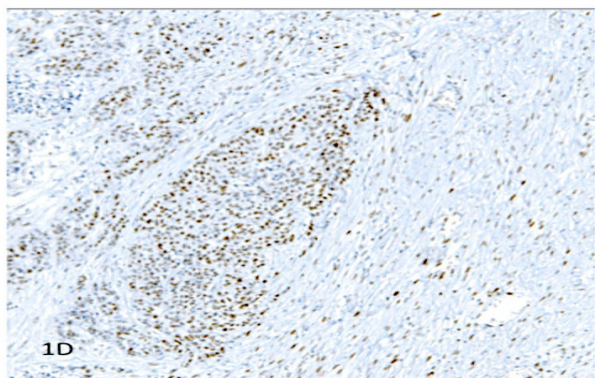
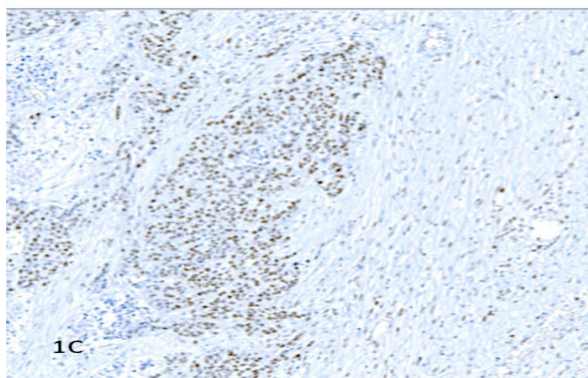
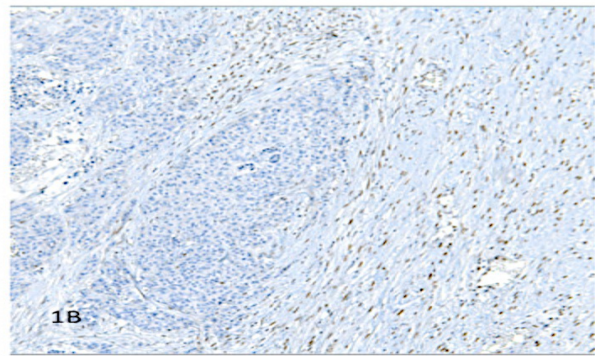
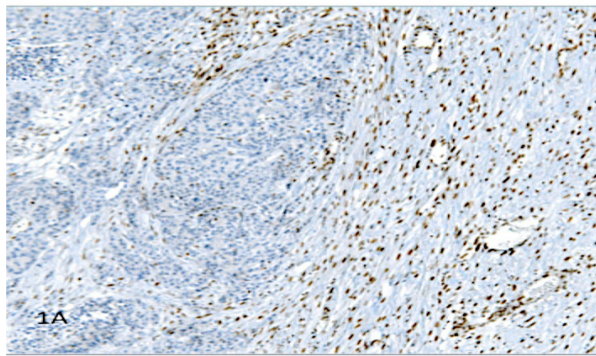


Figure 23 : Analyse immunohistochimique des protéines MMR montrant une extinction des protéines MLH1 (figure 1A) et PMS2 (figure 1B) avec conservation de l'expression des protéines MSH2 (figure 1C) et MSH6 (figure 1D).

RESULTATS

I Caractéristiques des patients inclus

Dans cette étude, 22 cas initialement discordants ont été inclus.

Deux cas mutés *MSH2* ont été exclus (figure 23). Pour un cas, nous n'avons pu réaliser l'ensemble des analyses somatiques car le bloc était quasiment épuisé. L'autre cas n'a pu être analysé car le délai de conservation du bloc était dépassé.

Ainsi, nous avons analysé 20 cas initialement discordants.

Parmi ces 20 cas étudiés, 6 cas étaient mutés *MSH6*, 9 cas mutés *MSH2* et 5 cas mutés *MLH1* (tableau 1).

Les types de discordances étaient les suivantes : dans 2 cas un phénotype tumoral stable était objectivé en biologie moléculaire ; pour 15 cas l'étude immunohistochimique était non contributive au sein de la tumeur et pour 3 cas, les analyses moléculaires et immunohistochimique étaient discordantes (annexe 5).

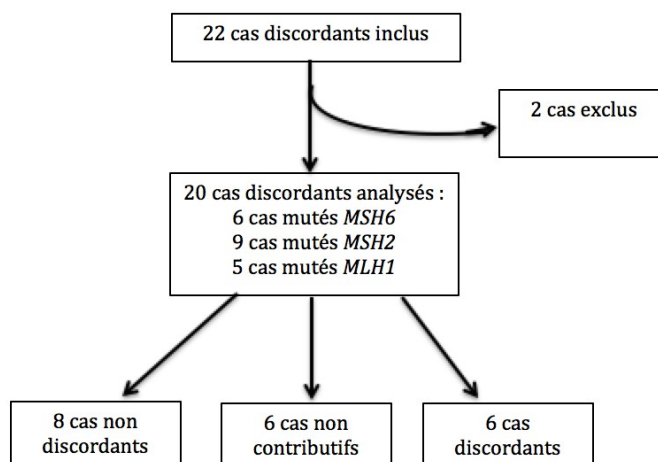


Figure 24 : Diagramme de flux

Mutation	IHC NC/discordante	RER stable/impossible	IHC NC/discordante + RER stable/NC	Total
MSH6	4	0	2	6
MSH2	7	1	1	9
MLH1	4	1	0	5
Total	15	2	3	20

Tableau 1 : Caractéristiques initiales des cas analysés. NC: non contributif

A. Caractéristiques cliniques des patients étudiés

Notre série comportait 12 CCR, 3 cas constitués d'un ou de plusieurs adénomes, 1 carcinome intra-muqueux du colon, 1 cancer de l'endomètre, 1 adénocarcinome duodénal, 1 adénocarcinome canalaire du sein et 1 tumeur vésicale (annexe 5).

L'âge médian et l'âge moyen des patients étudiés étaient respectivement de 50,5 ans et 40,7 ans [34-66ans].

B. Les mutations

Les mutations des différents cas analysés sont répertoriées au sein de l'annexe 5. Les analyses constitutionnelles ont été réalisées entre 2007 et 2016.

Quatre patients étaient porteurs d'une mutation faux sens sur les gènes *MSH2* et *MLH1*. Deux patients étaient porteurs de la mutation c.2245G>A présente sur l'exon 14 du gène *MSH2* (cas n° 11 et 17). De même, la mutation c.1178T>C située sur l'exon 12 du gène *MLH1* était présente à l'état hétérozygote chez 2 patients (cas n° 13 et 19).

Nous avons dénombré 9 mutations frame shift, 2 mutations non-sens, 3 réarrangements de grande taille et 2 mutations d'épissage.

Parmi les variations d'épissage, La mutation c.678-2A>T altère le site consensus accepteur d'épissage de l'intron 8 du gène *MLH1* et est donc délétère.

La seconde variation d'épissage altère le site accepteur d'épissage de l'intron 14 du gène *MSH2*. Il s'agit de la mutation c.2459-3T>G du gène *MSH2*. Un test d'épissage *ex-vivo* a été réalisé permettant de confirmer le caractère délétère de la mutation. Cette mutation entraîne l'exclusion de l'exon 15 du transcrit, ainsi que l'activation du site cryptique accepteur d'épissage dans l'exon 15, conduisant à la délétion en phase des 36 premiers nucléotides de l'exon 15.

Deux cas (cas 13 et 19) présentaient la même mutation faux sens de *MLH1* (c.1178T>C, ex12).

C. Le type de prélèvement

Les analyses ont été effectuées à partir de pièces opératoires pour 15 cas et à partir de biopsies pour 5 cas. Nous avons considéré la résection trans-uréthro-vésicale comme un prélèvement biopsique.

XI.Reclassement des cas après renouvellement des analyses somatiques

La réalisation de nouvelles analyses somatiques dans notre laboratoire a permis de reclasser les cas en :

- 8 cas non discordants.

- 6 cas non contributifs
- 6 cas discordants

A. Cas reclassés en non discordants

L'ensemble de ces cas reclassés en non discordants ne possédait qu'un profil immunohistochimique initial discordant avec les analyses constitutionnelles. En effet, les 8 cas présentaient une instabilité microsatellitaire en biologie moléculaire.

Ces cas non discordants étaient majoritairement mutés *MSH2* (5 cas) et *MSH6* (2 cas) (tableau 2). Seul, un cas était muté *MLH1*.

cas	mutation	MSH2	MSH6	MLH1	PMS2	RER
1	mutation <i>MSH6</i> (c.3202C>T, p.Arg1068X, ex5)	+	+	+	+	MSI
		(focale)	(focale)	(focale)	(focale)	
2	mutation <i>MSH6</i> (c.3261del ex5 (NGS), p.Phe1088SerFs*2)	+	+	+	+	MSI
3	mutation <i>MSH2</i> (c.2662del, p.leu888Cysfs*4, exon 16)	+	+	+	+	MSI
4	mutation <i>MSH2</i> (c.2459_3T>G, intron 14)	+	+	+	+	MSI
			(très faible dans la tumeur)			
5	mutation <i>MSH2</i> (c.1864_1865delinsT, p.Pro622X, exon 12)	+	+	+	+	MSI
6	mutation <i>MSH2</i> (c.1058del, p.Lys353Argfs*4, exon 6)	+	-	+	NR	MSI
7	Del ex 1 et 2 et le promoteur de <i>MSH2</i>	+	-	+	+	MSI
8	mutation <i>MLH1</i> (Del ex12 et 13)	-	-	-	NR	MSI

Tableau 2: caractéristiques initiales des cas reclassés en non discordants. NR: non réalisé

Il existait initialement une perte isolée de *MSH6* pour 2 cas mutés *MSH2*, une perte d'expression de *MSH2*, *MSH6* et *MLH1* pour un cas muté *MLH1* et une conservation de l'expression des 4 protéines MMR pour 5 cas (tableau 2).

Nous avons donc obtenu un profil d'expression des protéines MMR concordant avec la mutation constitutionnelle après avoir renouveler les analyses pour ces 8 cas.

Ainsi, en cas de mutation de *MSH2*, nous avons observé une perte concomitante de l'expression des protéines nucléaires MSH2 et MSH6 au sein de la tumeur (cas 3 à 7). La présence d'une mutation *MSH6* s'accompagnait d'une perte isolée de l'expression de MSH6 (cas 1 et 2). En effet, la protéine MSH2 peut former un hétérodimère aussi bien avec la protéine MSH6, qu'avec la protéine MSH3. Ainsi, la modification de la protéine MSH6 entraine la perte d'expression isolée de cette dernière. Néanmoins, MSH2 se lie à MSH3, entrainant ainsi une conservation de l'expression de MSH2.

Enfin, nous avons observé une perte d'expression des protéines MLH1 et de PMS2 au sein de la tumeur en cas de mutation de *MLH1* (cas 8).

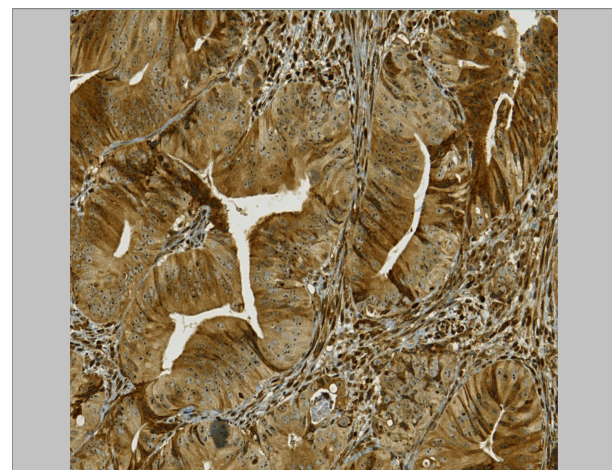
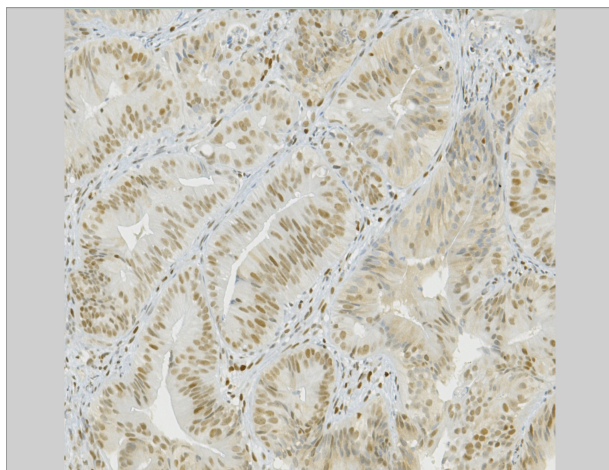
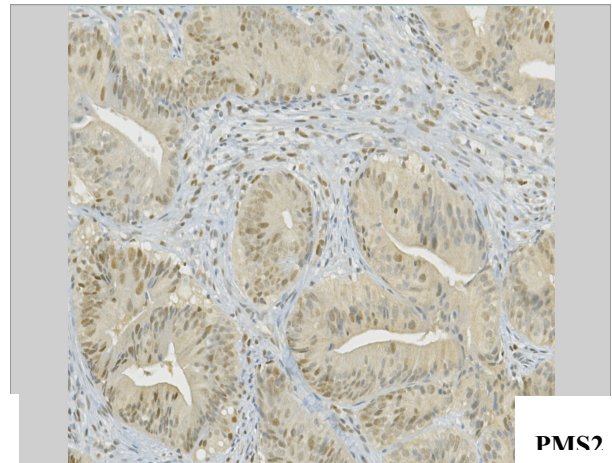
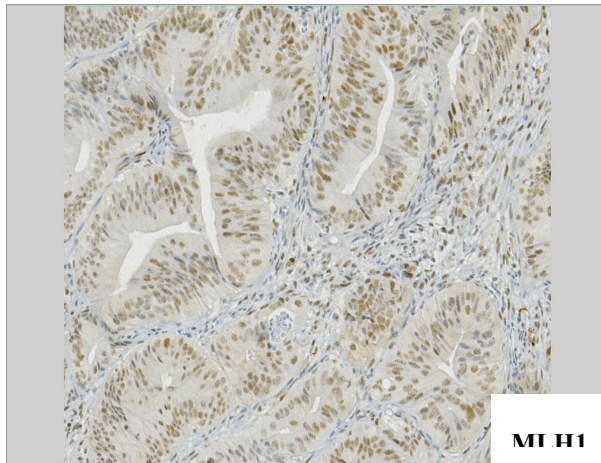


Figure 25 : Analyse immunohistochimique initiale du cas 2 : conservation de l'expression des protéines MLH1, PMS2 et MSH2. Le marquage avec l'anticorps anti-MSH6 est non contributif.

Le marquage de MSH6 sur la tumeur du cas 2, initialement réalisé avec l'anticorps anti-MSH6 de Becton Dickinson (clone 44 1/100) était non contributif avec un marquage cytoplasmique diffus, sans marquage nucléaire (figure 25). L'utilisation d'un anticorps anti-MSH6 plus récent (Ventana® prédilué, clone 44) a permis de montrer une extinction isolée de MSH6 au sein des cellules tumorales (figure 26).

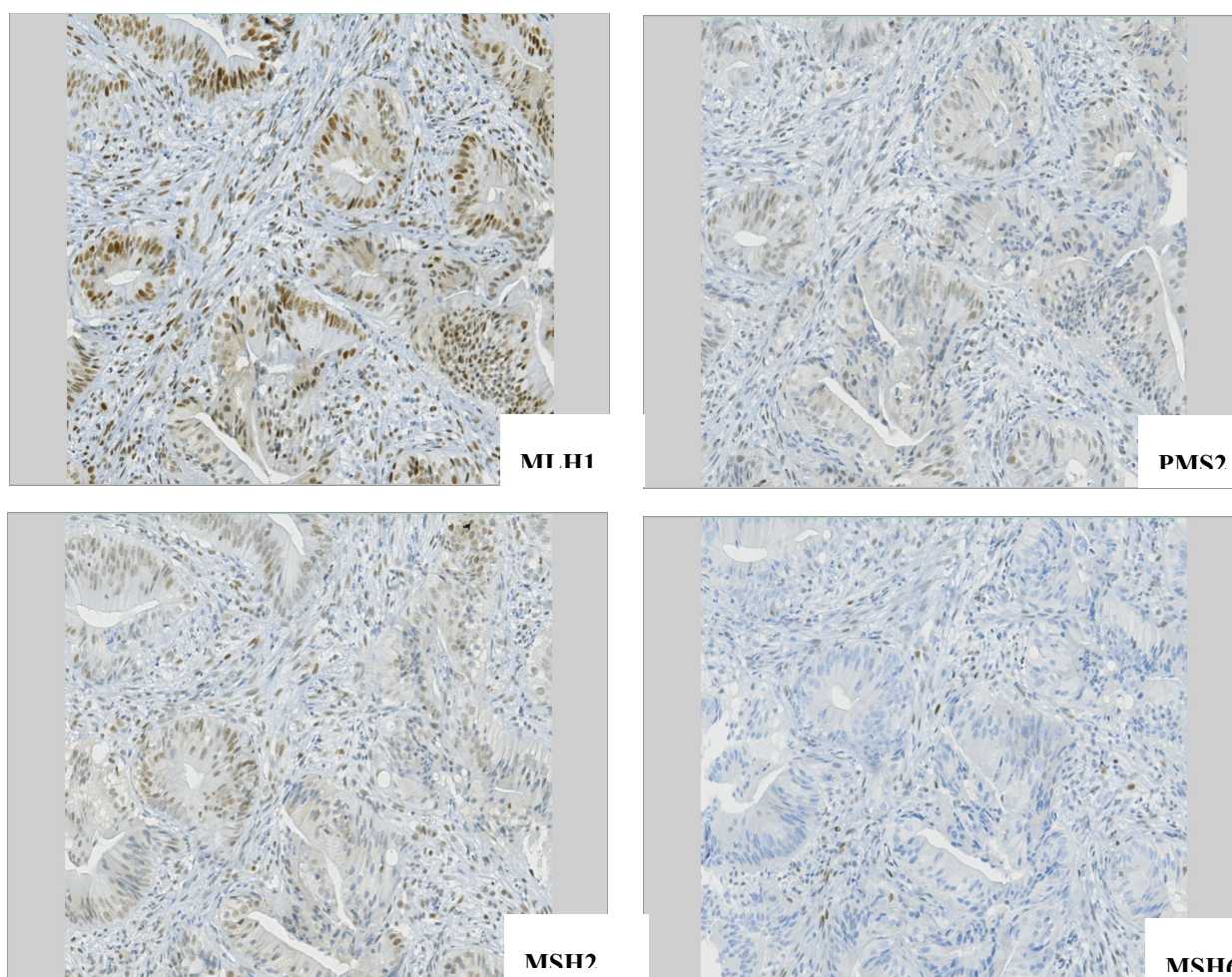


Figure 26 : Analyse immunohistochimique renouvelée au sein de la lésion tumorale du cas 2 montrant une extinction isolée de MSH6.

Pour le cas 1, les analyses ont été réeffectuées sur un autre bloc tumoral. Sur le premier bloc, on observait une expression focale des 4 protéines MMR. Les anticorps anti-MSH2 et anti-MSH6 qui avaient été utilisés étaient respectivement l'anticorps de VWR Calbiochem, clone FE11, 1/40 et l'anticorps de Becton Dickinson, clone 44, 1/80. Sur le second bloc, on observait une extinction des protéines MSH2 et MSH6 avec une expression focale des protéines MLH1 et PMS2. Les anticorps utilisés pour l'analyse immunohistochimique du second bloc figurent dans matériels et méthodes. La lésion tumorale était un adénocarcinome mucineux de l'angle colique gauche.

Le patient présentant une mutation constitutionnelle délétère du gène *MLH1* (cas 8) correspondant à un réarrangement de grande taille (del ex 12-13), présentait une extinction protéique de MLH1, MSH2 et MSH6 lors des premières analyses effectuées au sein de la tumeur (del ex 12-13). Les anticorps utilisés initialement étaient les suivants : l'anticorps monoclonal anti-MLH1 de Ventana G168.728, l'anticorps anti-MSH2 diagnostic Biosystems, clone G168.728 et l'anticorps anti-MSH6 diagnostic Biosystems, clone 44. L'utilisation d'anticorps plus récents (Cf matériels et méthodes) lors de la réalisation de nos analyses immunohistochimiques a permis de mettre en évidence une extinction des protéines MLH1 et PMS2 et une conservation de l'expression de MSH2 et MSH6 au sein de la tumeur.

B. Cas reclassés en non contributifs

La répartition des cas non contributifs est homogène avec la présence de 2 cas pour chaque mutation *MMR* étudiée (tableau 3).

Cinq cas étaient attribués à des problèmes de fixation, et un cas à un prélèvement tumoral inadapté.

Cas	Mutation	MLH1	PMS2	MSH2	MSH6	RER	Tumeur	Biopsie/ Pièce opératoire	fixation
9	mutation <i>MSH6</i> (c.3261dupC, p.Phe1088LeufsX5, ex5)	+	+	+	NC	impossible	Adénocarcinome colique	PO	formol
10	mutation <i>MSH6</i> (c.2611_2614dup, p.Ile872AsnfsX10, ex4)	+	NC	+	NC	stable	Adénocarcinome endométrial	PO	formol
11	mutation <i>MSH2</i> (c.2245 G>A, p.Glu 749Lys, exon 14)	+	+	NC	NC	Instable	Adénocarcinome rectal	Biopsie	AFA
12	mutation <i>MSH2</i> (c.2699 C>G, p.Ser900*, ex16)	+	+	+	+	stable	Hyperplasie canalaire simple	PO	formol
13	mutation <i>MLH1</i> (c.1178 T>C, p.Leu393Pro ex12)	+	NC	+	+	instable	Adénome coecal en dysplasie de Haut grade	biopsie	formol
14	mutation <i>MLH1</i> (c.678_2A>T, Intron 8)	-	-	+	+	NC	Adénocarcinome colique droit peu différencié	PO	formol

Tableau 3: Caractéristiques des cas reclassés en non discordants

NC : non contributif, + expression de la protéine *MMR*, - perte d'expression de la protéine *MMR*

Le prélèvement tumoral inadapté intéressait une lésion tumorale mammaire qui avait été considérée initialement comme un carcinome canalaire *in situ* du sein. Après relecture, nous avons considéré qu'il s'agissait plutôt d'une hyperplasie canalaire simple (figure 27). Ceci explique l'absence de perte d'expression des protéines *MMR* et la présence d'un phénotype p*MMR* ou MSS.

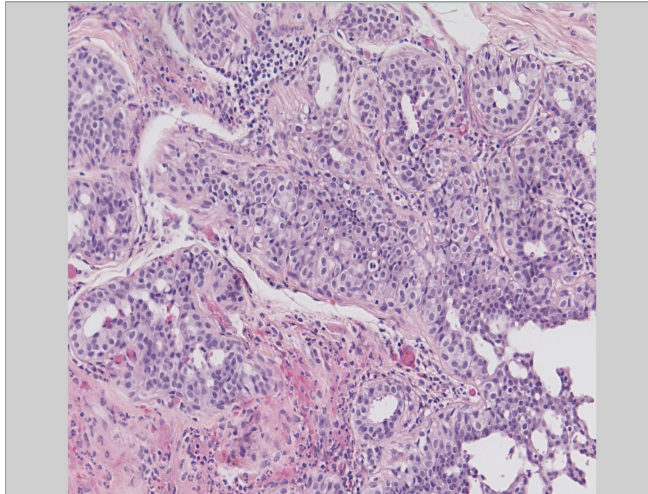


Figure 27: Cas 12 présentant une hyperplasie canalaire simple (HES x 100)

Les problèmes de fixation se traduisent en immunohistochimie par une hétérogénéité du marquage nucléaire au sein de la tumeur et par l'absence de témoin interne. Sur le plan moléculaire, les fragments de moins de 150pb ne sont pas amplifiables, rendant l'analyse des microsatellites par PCR pentaflex ininterprétable.

La technique de biologie moléculaire n'a pu être réalisée pour le cas 9, compte tenu de la mauvaise qualité de l'ADN tumoral. De plus, le marquage immunohistochimique des protéines MSH2 et MSH6 au sein de la tumeur de ce cas est non contributif car il n'existe pas de témoin interne (figure 28).

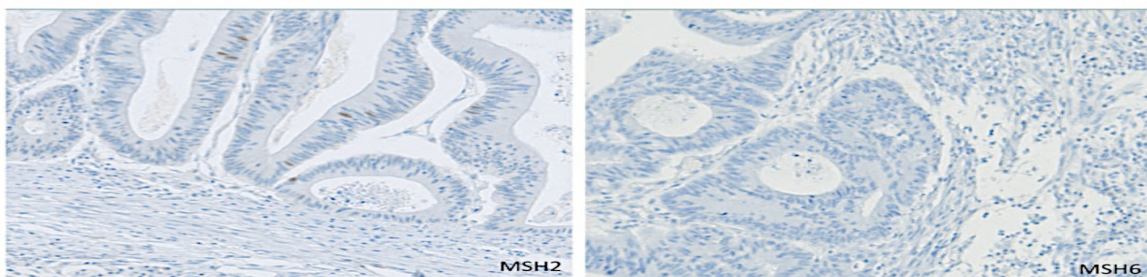


Figure 28 : Cas 9, Marquage nucléaire MSH2 de rares cellules tumorales, marquage non contributif de MSH6 car absence de témoin interne (x200).

La PCR pentaflex n'est pas contributive pour le cas 14 car seuls deux marqueurs d'instabilité microsatellitaire n'ont pu être analysés parmi les 7 (figure 29). Ces marqueurs correspondent à de petits fragments d'ADN (< 150pb). Dès que les fragments excèdent 150pb, ils ne peuvent être amplifiés du fait de la mauvaise qualité de l'ADN. De plus, il existe une importante hétérogénéité intra-tumorale du marquage protéique nucléaire pour ce cas. En effet, on observe une expression des protéines MSH2 et MSH6 dans les zones tumorales périphériques tandis qu'il n'existe pas d'expression intra-tumorale de ces protéines dans les zones plus centrales (figure 30). De plus, dans ces zones centrales, il n'existe pas de témoin interne.

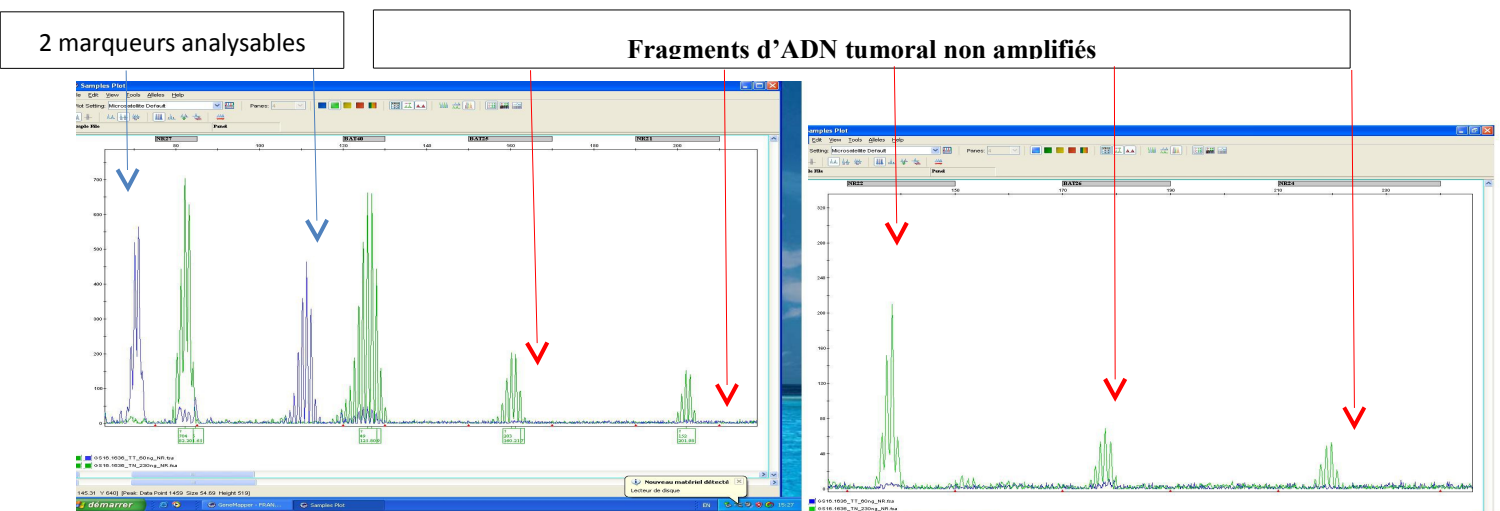


Figure 29 : Résultats de la PCR pentaflex du cas 14 : Tissu sain en vert et tissu tumoral en bleu. Seul les locus NR27 et Bat40 sont analysables et montre une instabilité intra-tumorale pour ces 2 marqueurs.

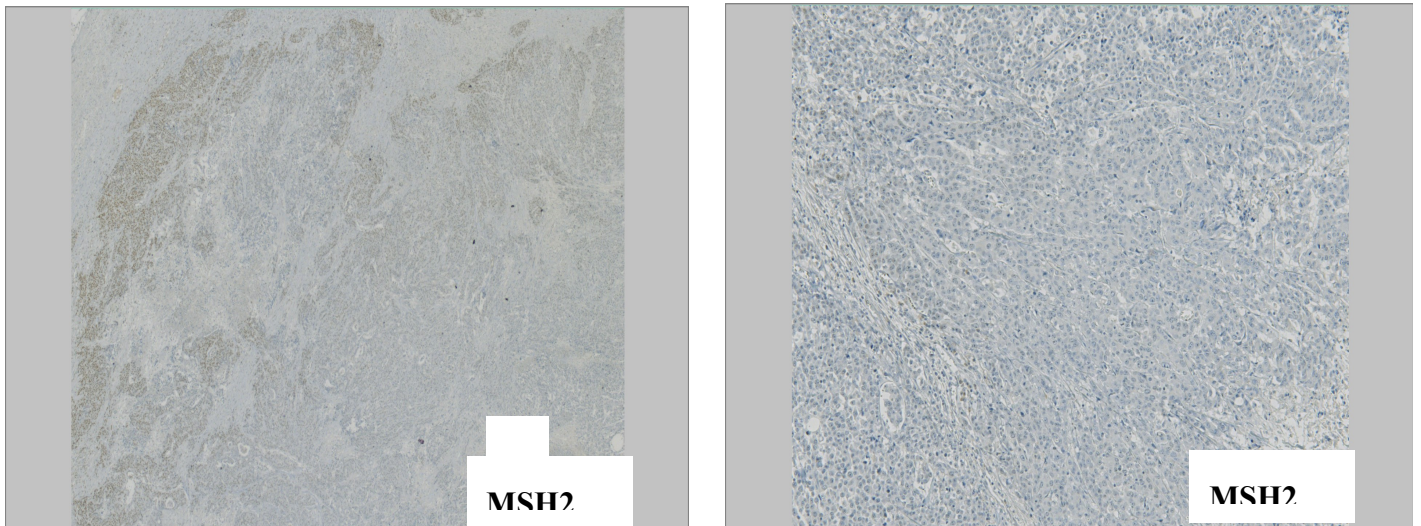


Figure 30 : Cas 14, Hétérogénéité du marquage de MSH2. A gauche(x 250), on observe une hétérogénéité du marquage MSH2 au sein de la tumeur avec une conservation de l'expression en périphérie et une perte d'expression centrale. A droite (x 1000, il s'agit d'une zone centrale où il n'y a pas de témoin interne.

Le renouvellement de l'analyse par biologie moléculaire a mis en évidence un phénotype microsatellitaire stable au sein de la tumeur endométriale du cas 10.

Les deux derniers cas, correspondant respectivement à un cancer colique et à un polype caecal, présentaient un profil intra-tumoral instable (cas 11 et 13).

L'analyse immunohistochimique des protéines MSH6 et PMS2 du cas 10 , des protéines MSH2 et MSH6 du cas 11 et de PMS2 du cas 13 étaient non contributives en raison d'une absence de marquage au sein des cellules tumorales ainsi que des témoins internes.

C. Cas considérés comme véritablement discordants

Le renouvellement des analyses somatiques a permis de confirmer la présence de 6 cas discordants (tableau 3), parmi lesquels 2 cas étaient mutés *MSH2*, 2 cas mutés *MLH1* et enfin 2 cas mutés *MSH6*. Cinq discordances portent sur le profil immunohistochimique.

Seule, une discordance intéresse le phénotype RER.

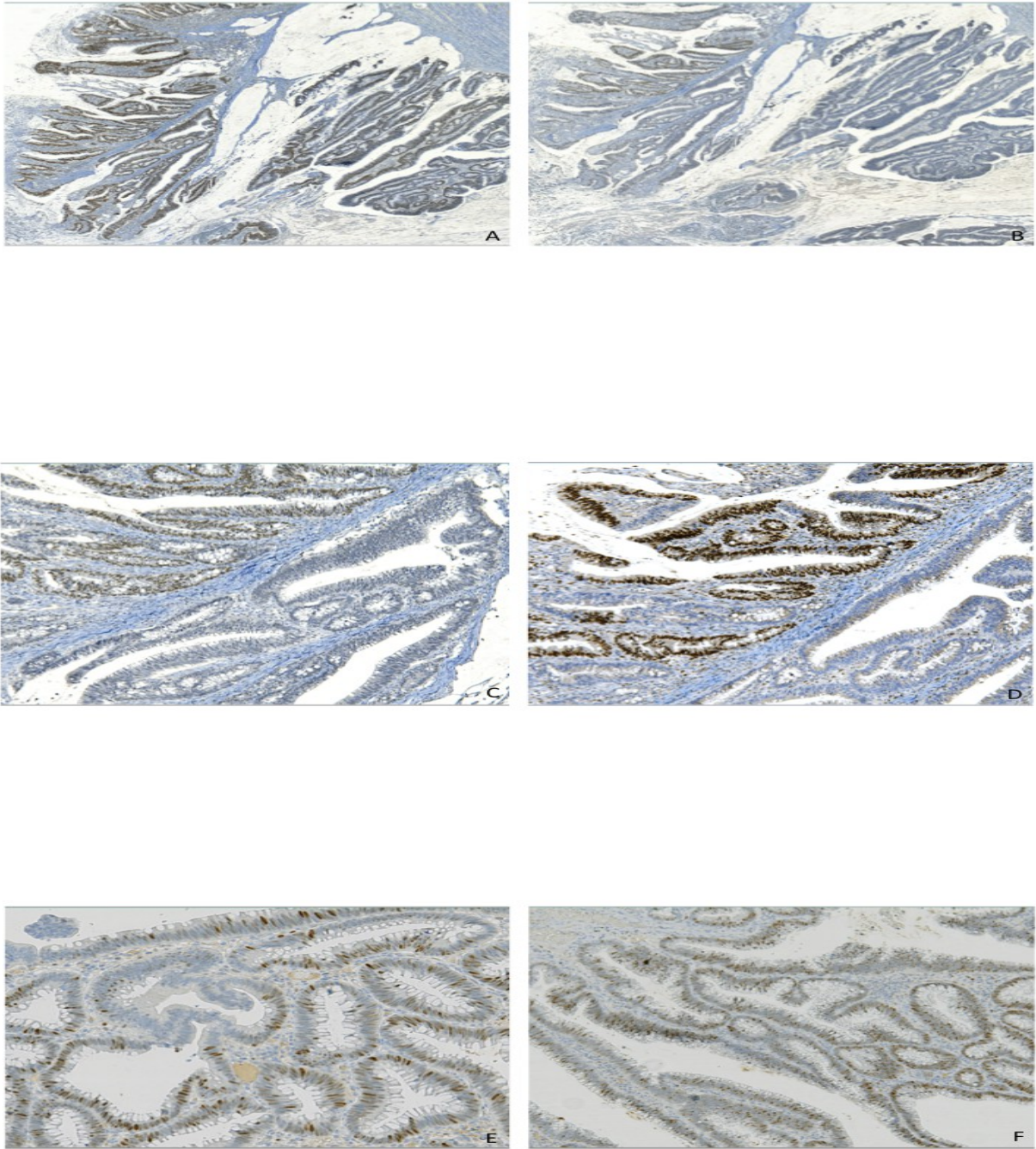
Cas	mutation	MLH1	PMS2	MSH2	MSH6	RER	Tumeur
15	mutation <i>MSH6</i> (c.3261dup,pPhe1088 LeufsX5, ex5)	+	+	+	+	MSI	CC gauche + adénome
16	mutation <i>MSH6</i> (c.3268_3274 del ex5, p.Glu1090LysFs*)	+	+	-	-	MSI	CC droit
17	mutation <i>MSH2</i> (c.2245G>A, p.Glu749Lys, ex14)	+	+	+	+	MSI	CC droit
18	mutation <i>MSH2</i> (c.1705_1706 del ex11)	+	+	-	-	MSS	Adénome tubulo-villeux en dysplasie de BG
19	mutation <i>MLH1</i> (c.1178 T>C, p.Leu393Pro, ex12)	+	+	+	+	MSI	CC gauche
20	mutation <i>MLH1</i> (del ex 17-19)	+	-	+	+	MSI	Carcinome intra- muqueux et adénome en dysplasie de HG

Tableau 3 : Caractéristiques des cas discordants

1 Cas n°15 :

Il intéresse une patiente ayant présenté dans un premier temps un adénocarcinome colique à l'âge de 49 ans (mutation *MSH6* c.3261dup, p.Phe1088LeufsX5, ex5). Puis un polype sessile de 1,3 cm du bas rectum a été découvert lors de la surveillance endoscopique. A l'examen microscopique, la lésion correspondait à un adénome tubulo-villeux en dysplasie de bas grade. Les analyses immunohistochimiques réalisées sur la tumeur colique ainsi que sur l'adénome rectal ont révélé une conservation de l'expression des 4 protéines MMR. Sur la pièce opératoire, l'expression de *MSH2* et *MSH6* était focale (figures 31 C et D). L'adénocarcinome colique était de phénotype instable, en revanche l'adénome était de phénotype stable.

Nous avons retrouvé des résultats identiques après avoir renouvelé ces analyses, avec une expression focale de *MSH6* au sein de l'adénocarcinome colique ainsi que du polype, avec une expression hétérogène au sein même d'une glande adénomateuse. (figures 31 E et F).



Figures 31 : A : Expression de MLH1 au sein de l'adénocarcinome (x250), B : Expression focale de MSH2 au sein de l'adénocarcinome (x250). C et D : expression focale de MSH2 et MSH6 au sein de l'adénocarcinome (x250). E et F : expression hétérogène de MSH6 au sein des glandes adénomateuses (x200).

8) Cas n°16 :

Il s'agit d'une patiente atteinte d'un cancer du colon droit à l'âge de 58 ans et porteuse de la mutation c.3268_3274del de l'exon 5 du gène *MSH6*. Nous avons renouvelé les analyses somatiques confirmant la présence d'une extinction intra-tumorale couplée des protéines MSH2 et MSH6 (figure 32). En cas de mutation de *MSH6*, nous pouvons nous attendre à observer une perte d'expression isolée de MSH6. En effet, la protéine MSH2 peut se coupler avec MSH3 en cas de perte de fonction de MSH6 et ainsi continuer à être effectrice et exprimée en immunohistochimie.

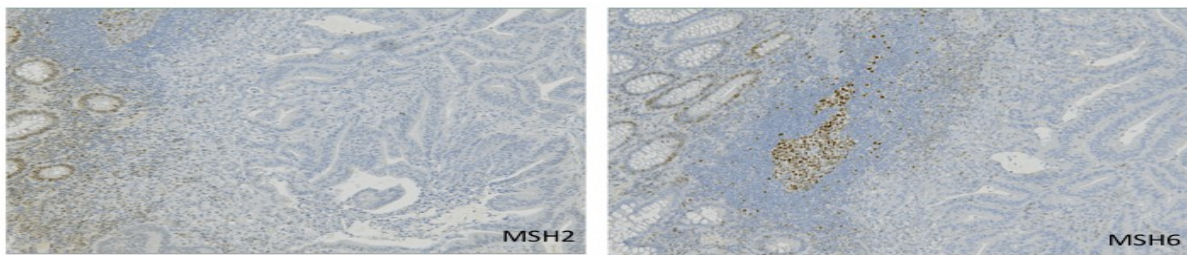


Figure 32 : Perte d'expression de MSH2 et MSH6 au sein de la tumeur chez une patiente porteuse d'une mutation constitutionnelle du gène *MSH6*

9) Cas n°17 :

Cette patiente était porteuse d'une mutation c.2245 G>A de l'exon 14 du gène *MSH2*, et a présenté à l'âge de 48 ans un cancer du colon. Les analyses somatiques retrouvaient une conservation de l'expression des 4 protéines MMR au sein de la tumeur (figure 33).

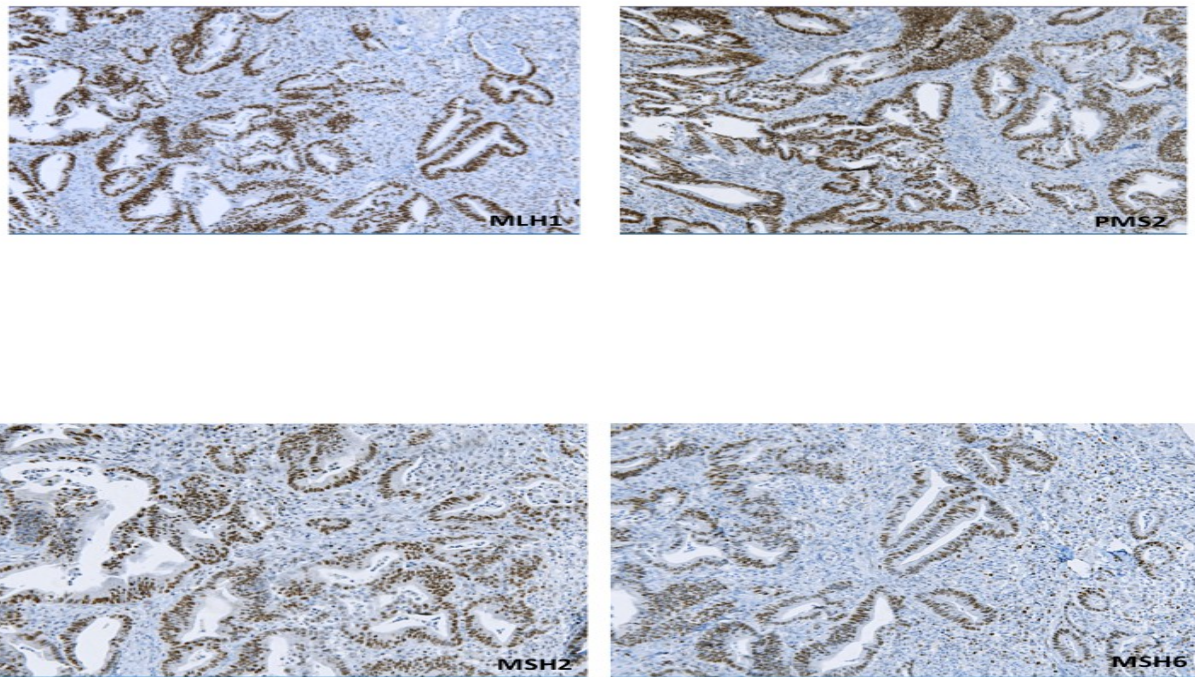


Figure 33 : Expression des 4 protéines MMR au sein du tissu tumoral chez une patiente porteuse d'une mutation faux sens du gène *MSH2*.

10) Cas n°18 :

Ce cas était celui d'un patient porteur de la mutation c. 1705_1706 del de l'exon 11 du gène *MSH2*, présentant un adénome tubuleux en dysplasie de bas grade. Les analyses somatiques confirment la présence d'une extinction des protéines MSH2 et MSH6 associée à un phénotype tumoral stable (figure 34).

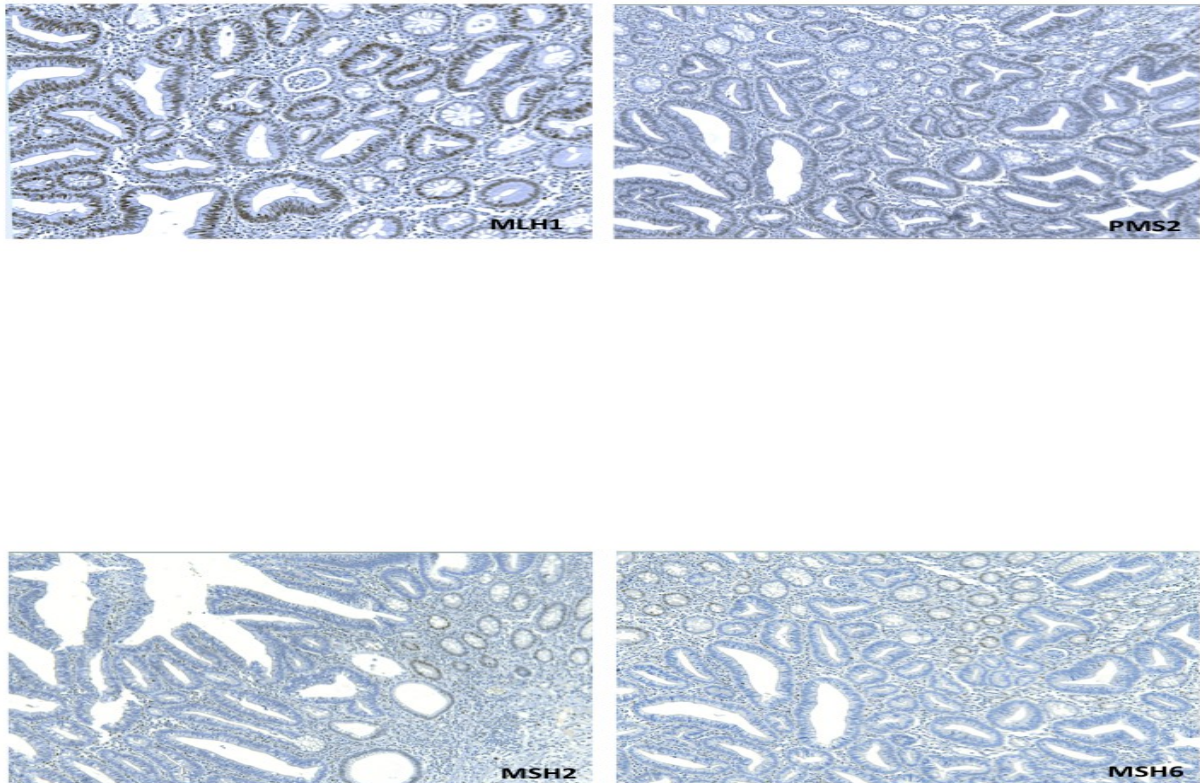


Figure 34 : Forte expression de MLH1 et faible expression de PMS2 avec extinction de l'expression de MSH2 et MSH6 au sein du tissu tumoral.

11) Cas 19 :

Le cas n° 19 intéresse une patiente porteuse d'une mutation c.1178 T>C de l'exon 12 du gène *MLH1*. Elle a présenté une double localisation adénocarcinomeuse colique métachrone droite à 55 ans et gauche à 70 ans. Les analyses somatiques, réalisées sur la tumeur colique gauche mettent en évidence une conservation de l'expression de *MLH1* et *PMS2* avec une expression très faible et focale des protéines *MSH2* et *MSH6* au sein de la tumeur (figures 35 et 36).

Un autre cas (cas n° 13) était porteur de la même mutation. Malheureusement, les problèmes de fixation n'ont pas permis d'obtenir des résultats immunohistochimiques contributifs.

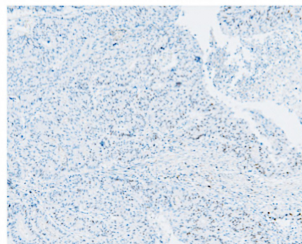


Figure 35 : Expression faible et focale de *MSH6* au sein de la tumeur.

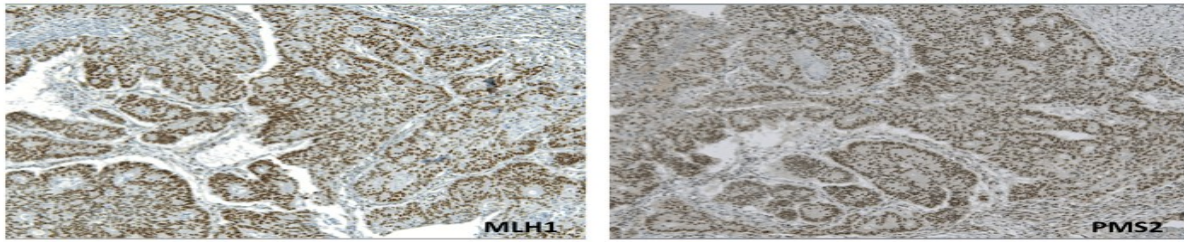


Figure 36 : Conservation d'une forte expression de MLH1 et PMS2 au sein de la tumeur.

12) Cas n°20 :

Le dernier cas est un patient ayant présenté à 43 ans un adénome en dysplasie de haut grade associé à un adénocarcinome colique *in situ*. Il était porteur d'un réarrangement de grande taille du gène *MLH1* correspondant à une délétion des exons 17 à 19. Une extinction isolée de la protéine PMS2 au sein de la tumeur était mise en évidence (figure 39). On observait un très faible marquage de MLH1 en superficie de la lésion tumorale. Cette zone correspondait en partie à un territoire adénomateux (figure 38). En revanche, les glandes tumorales situées plus en profondeur et celles correspondant au territoire de carcinome intra-muqueux n'exprimaient pas la protéine MLH1 (figure 37). L'expression de MSH2 et MSH6 était forte et intense aussi bien en superficie qu'en profondeur (figures 40).

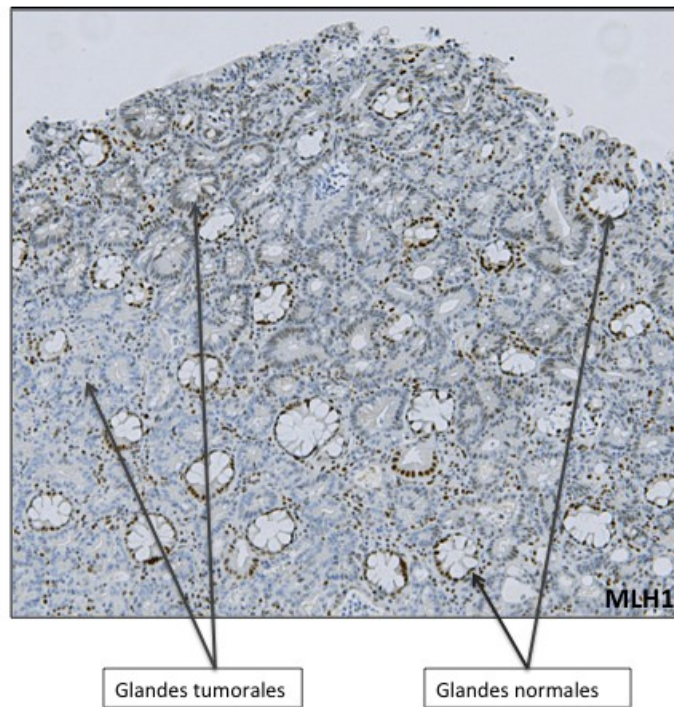


Figure 37: Faible expression nucléaire de MLH1 par les glandes tumorales situées en superficie. Les glandes tumorales plus profondes n'expriment pas MLH1.

Figure

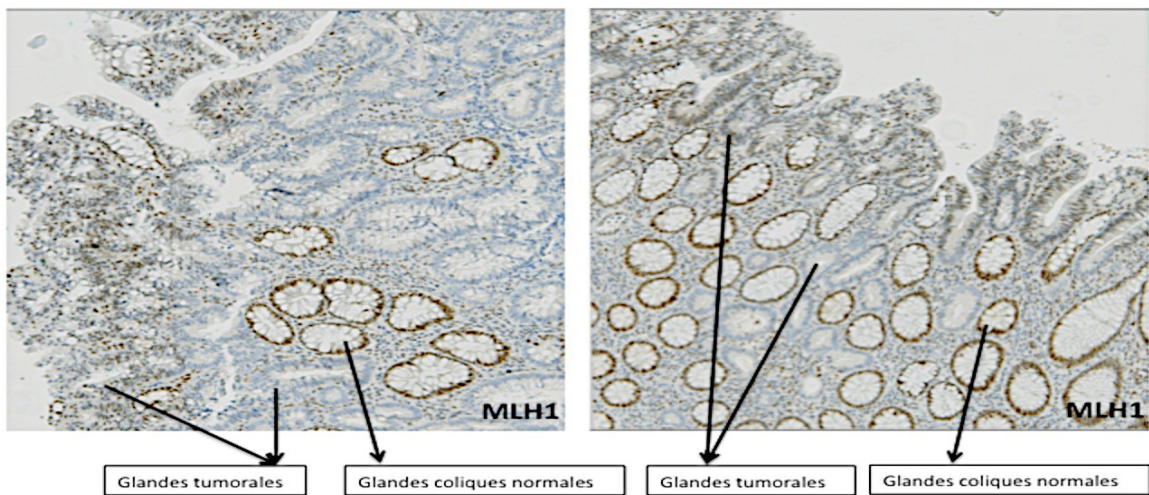


Figure 38: Faible expression de MLH1 au sein de la composante adénomateuse.

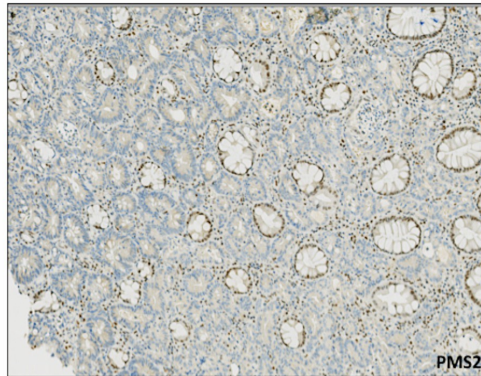


Figure 39 : Perte d'expression de PMS2 au sein de l'adénocarcinome intra-muqueux.

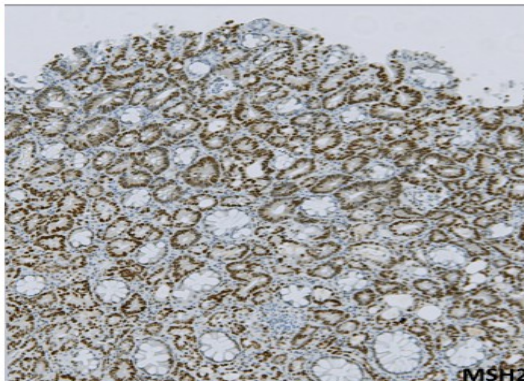
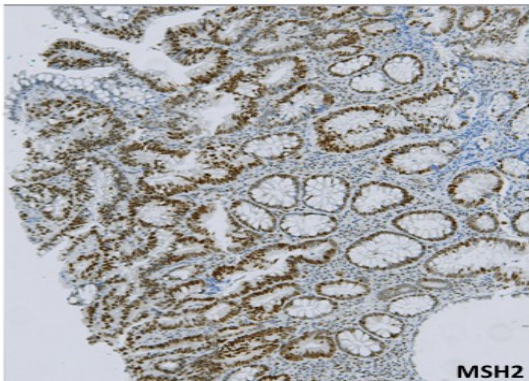
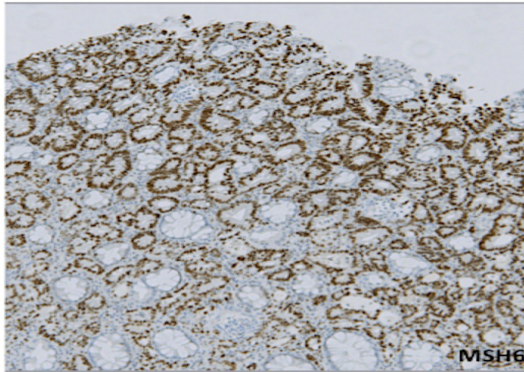
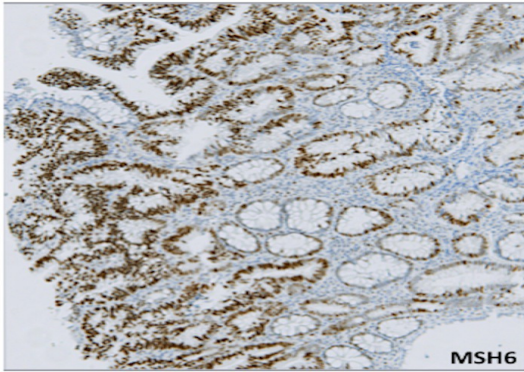


Figure 40: Forte expression homogène de MSH2 et MSH6 au sein de la tumeur.

DISCUSSION

Le phénotype tumoral instable, conséquence de l'inactivation d'un des gènes MMR, est présent dans environ 95% des cancers colorectaux qui se développent dans le cadre du syndrome de Lynch.(89)(90). Ce syndrome nécessite une prise en charge adaptée devant la précocité de survenue des pathologies tumorales du spectre tumoral de cette affection. Le SL est diagnostiqué par la mise en évidence d'une mutation constitutionnelle d'un des gènes MMR. Cependant, cette technique est onéreuse, complexe et longue. C'est pourquoi, la pré-sélection des patients est une étape indispensable permettant de limiter le nombre d'analyses génétiques constitutionnelles. Celle-ci s'effectue par la réalisation d'analyses somatiques qui nécessitent un matériel tumoral adapté et de bonne qualité. La compréhension des mécanismes à l'origine de la perte de fonction des protéines MMR est indispensable afin d'interpréter de façon optimale les résultats de l'analyse immunohistochimique de ces protéines et de l'instabilité microsatellitaire. Les résultats de ce travail montrent que le renouvellement des analyses somatiques a permis de reclasser les cas initialement considérés comme discordants en :

- non discordants pour 8,
- non contributif pour 6,
- et discordants pour 6.

La majorité des cas confirmés comme discordants par le renouvellement des analyses somatiques avait un profil immunohistochimique incohérent avec la nature du gène MMR atteint (5/6). Seul un cas porteur d'une mutation d'un des gènes MMR avait un profil stable (1/6). Cette analyse de biologie moléculaire avait été réalisée à partir d'un adénome en dysplasie de bas grade. La mauvaise fixation tissulaire est la principale cause des cas constituant notre cohorte. La meilleure sensibilité des nouveaux anticorps ainsi que l'expérience du pathologiste a permis de reclasser 8 cas, en finalement non discordants.

XII. Eléments permettant d'expliquer ces discordances et la non contributivité des analyses

A. Spécificité des anticorps

Au cours de ce travail, nous avons observé une variabilité de résultats en fonction des anticorps utilisés, en particulier avec les anticorps anti-MSH2 et anti-MSH6. Celle-ci est très probablement due à un manque de sensibilité de certains anticorps. Ainsi, le renouvellement des analyses immunohistochimiques a permis de reclasser les cas 1 à 8 en non discordants grâce à l'utilisation d'anticorps plus récents, pré-dilués (cf matériels et méthodes). Les anticorps initialement utilisés lors de l'examen immunohistochimique pour ces cas sont répertoriés dans le tableau de l'annexe 6.

Dans la littérature, la majorité des AC utilisés dans les années 2000 figurent dans l'annexe 7. Il n'existe pas de données ni d'étude ayant comparé un anticorps avec un autre pour l'expression d'une des protéines MMR. En revanche, la notion de variabilité de sensibilité d'un anticorps existe notamment pour les récepteurs à l'estrogène dans le cancer du sein avec une meilleure sensibilité de l'anticorps monoclonal SP1. (91). Ainsi, nous pouvons supposer qu'il existe une variabilité de sensibilité en fonction du type d'anticorps anti-MMR utilisé. Ceci pourrait expliquer les 8 cas reclassés en non discordants.

De plus, l'interprétation des immunomarquages des protéines MMR nécessite une expérience, et une maîtrise des différents profils afin d'écartier tout faux positif ou négatif. En effet, l'absence de témoin interne, en présence d'une extinction protéique ne permet pas de conclure. De même, le marquage cytoplasmique sans marquage nucléaire observé pour le cas 2 ne doit pas être faussement interprété comme une expression protéique par la cellule tumorale. Seul un marquage nucléaire est considéré comme positif.

Enfin, l'interprétation de l'immunomarquage nécessite de connaître les paramètres de fixation utilisés. Ces informations sont extrêmement difficiles à obtenir d'autant plus que les prélèvements sont anciens et/ou proviennent de différents centres de pathologie. Certains anticorps sont probablement plus sensibles à une sous fixation. Ainsi, certains marquages

cytoplasmiques, non contributifs, peuvent être obtenus sur des pièces opératoires sous-fixées, avec les mêmes anticorps que ceux utilisés pour la biopsie correspondante à la même tumeur. (92). Sur ces prélèvements biopsiques, le marquage immunohistochimique était contributif.

L'expression protéique est donc conditionnée par les étapes pré-analytiques caractérisées par le temps d'ischémie froide, le fixateur utilisé et le temps de fixation.

B. La fixation

La fixation est un procédé de stabilisation des structures tissulaires. Le fixateur recommandé en anatomie pathologique est le formol (Dilution à 10%, tamponné). Il a été introduit en anatomie pathologique par Ferdinand Blum dans les années 1980.

1 Effet sur les protéines

La fixation au formol provoque un changement de conformation des molécules cibles par la formation de ponts de méthylène intra et intermoléculaires conduisant à la réticulation des protéines. (93) Cette réticulation provoque la rétention de protéines hydrosolubles et d'autres macromolécules par piégeage dans le réseau tridimensionnel formé lors de la fixation tissulaire. Cette réticulation modifie les structures tertiaires et quaternaires des protéines. Ceci provoque une modification de leur antigénicité ou encore la perte de leur activité enzymatique, alors que les structures primaires et secondaires sont inchangées. Lorsque la fixation est optimale, les macromolécules sont suffisamment rigides pour qu'elles ne puissent pas être grossièrement réarrangées par les forces physiques et chimiques rencontrées

pendant le traitement. Les forces attractives et répulsives sont principalement responsables des structures tertiaires complexes des macromolécules.

Dans un milieu aqueux, les composants aminés hydrophiliques ont tendance à ce tourner

vers l'extérieur et les composants hydrophobes vers l'intérieur.

Lorsqu'il existe une sous-fixation, il existe une inversion de la configuration (figure 40). (94).

Cette inversion hydrophobe rend les épitopes inaccessibles aux anticorps. Il existe ainsi un

masquage des sites antigéniques empêchant la formation du complexe antigène-anticorps. Le cas 9 illustre bien ce phénomène. L'analyse immunohistochimique révèle un marquage

focal de rares noyaux tumoraux avec l'anticorps anti-MSH2 (figure 28). Le marquage avec

l'anticorps anti-MSH6 est non contributif car l'absence d'expression intra-tumorale de MSH6

ne s'accompagne pas de témoin interne (figure 28).

De plus, le marquage de MSH2 observé pour le cas 14 est très hétérogène (figure 30) avec

des zones où quelques cellules tumorales expriment faiblement cette protéine, et des zones

où le marquage est plus intense et diffus. Cette hétérogénéité de marquage est due à une

hétérogénéité de fixation au sein de la tumeur entraînant plus ou moins un masquage des

sites antigéniques.

L'hétérogénéité du marquage des protéines MMR au sein de la tumeur s'observe

essentiellement au sein des pièces opératoires. Dans notre étude, 4 cas permettent

d'illustrer ce phénomène (parmi les 6 cas non contributifs). Seuls 2 cas provenaient de

prélèvements biopsiques parmi lesquels un était fixé à l'AFA.

Cette hétérogénéité se caractérise par la présence d'un marquage en périphérie de la zone

tumorale et une négativité avec l'absence de témoin interne plus au centre. La fixation

résulte de la diffusion du fixateur et de la réaction chimique dans le tissu. Seules les cellules

situées dans les zones périphériques des prélèvements sont immédiatement fixées et plus la

fixation est courte, plus les prélèvements sont fixés de manière hétérogène. Les cellules

situées dans les zones profondes sont ainsi moins bien fixées. La pénétration du formol est

rapide tandis que la fixation est plus lente. C'est pourquoi, il est recommandé de respecter

des temps de fixation afin d'éviter une sous-fixation ou une sur-fixation. Dans une étude, les

auteurs ont comparé l'expression des protéines MMR au sein de prélèvements biopsiques et

de pièces opératoires du même cancer colorectal. Alors que 10 cas étaient non contributifs

sur pièce opératoire, tous étaient interprétables sur biopsies.(92) L'intensité du marquage

était significativement plus intense et plus uniforme sur biopsie que sur pièce opératoire. En effet, les biopsies étant de petites tailles, cela permet d'obtenir une meilleure fixation, plus rapide et plus homogène que sur les pièces opératoires.

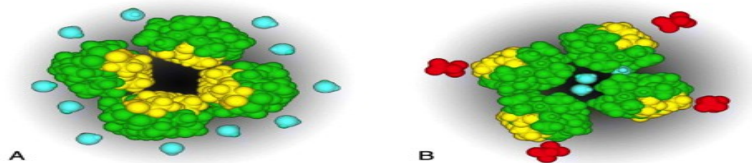


Fig. 3 Hydrophobic inversion. End views of a protein consisting of four helical strands. (A) In a natural aqueous environment, hydrophilic amino acids (green) face outward and are surrounded by water (blue); hydrophobic amino acids (yellow) aggregate inward. This is the native conformation. (B) When placed unfixed or poorly fixed in a non-aqueous solvent (red), the strands rotate on their axes to lessen the tension between hydrophilic components and the hydrophobic environment, frequently trapping water within the protein molecule. (Reprinted with permission from Dapson et al. 2005.)

Published in: *RVF Dapson, Biotechnic & Histochemistry* 2007, 82, 133-140.
DOI: 10.1080/105207006011567616
Copyright © 2007 Informa UK Ltd All rights reserved. reproduction in whole or part not permitted

Figure 40 illustrant l'inversion hydrophobe. (94) A : configuration normale en milieu aqueux (bleu) avec les acides aminés hydrophiles (en vert) tournés vers l'extérieur et les acides aminés hydrophobes (en jaune) tournés vers l'intérieur. B : en cas de sous fixation dans un solvant non aqueux (rouge), on observe une inversion de la configuration. Ce qui entraîne un masquage des sites antigéniques.

13) Effet de la fixation sur les acides nucléiques

De même, les séquences d'ADN de plus de 100 pb ne peuvent être amplifiées en cas de sous fixation. Par conséquent l'analyse des microsatellites n'est pas contributive. Les fragments d'ADN entre 200 et 300pb sont généralement amplifiables par PCR. (95)(96)

Les facteurs susceptibles d'influencer la qualité des acides nucléiques lors de la fixation au formol sont l'action du formol, sa composition, son pH, le temps de fixation et la température.

Les ponts méthylènes irréversibles entre les bases inhibent d'une part la dénaturation de l'ADN double brin et bloquent d'autre part, l'accès aux ARN conduisant à l'échec de la transcription inverse et à l'échec de l'amplification par PCR.

Dans notre étude, les problèmes de fixation se sont traduits par l'impossibilité d'amplifier les séquences d'ADN de plus de 100pb pour les cas 9 et 14. Les quantités d'ADN pour ces 2 cas étaient correctes, avec respectivement 35.2ng/μl et 30.8ng/μl. En revanche, la mauvaise qualité de l'ADN extrait, n'a permis l'analyse que de deux marqueurs microsatellites pour le cas 14 et aucun pour le cas 9.

Les difficultés du formol à pénétrer dans le tissu entraînent une hypoxie des parties profondes du tissu qui est responsable d'une diminution du pH tissulaire. Cet effet a pour conséquence l'extraction d'un faible taux d'acide nucléique.(97)
Lors du stockage, le formaldéhyde est dégradé par la température et la lumière. Cette dégradation aboutit à la formation d'acide formique qui altère les acides nucléiques et forme des dépôts dans le tissu appelés pigments formoliques.
Une fixation prolongée d'une semaine entraîne une dégradation des acides nucléiques par la formation irréversibles de ponts méthylènes.(98)(99)

14) Effet du temps d'ischémie froide

Le temps d'ischémie froide correspond au délai entre l'extraction de la pièce et sa fixation. Il a un impact sur la fixation tissulaire. Ainsi, plus le temps d'ischémie froide est long, plus le marquage immunohistochimique est faible. Ceci a été démontré pour les récepteurs hormonaux dans les cancers du sein par l'équipe de Khoury et al. (100)
De plus l'effet du temps d'ischémie froide sur la qualité du marquage immunohistochimique dépend de la robustesse des épitopes et des différents clones pour un même anticorps (Qiu 2009).

15) Conditions optimales de fixation

Des recommandations ont été établies afin de rendre optimales les analyses immunohistochimiques et moléculaires. Elles correspondent à la phase pré-analytique de la norme ISO 15189.
Une fixation optimale nécessite un temps d'ischémie froide court, allant de quelques minutes pour les biopsies à moins d'une heure pour les pièces opératoires. Cela nécessite donc de connaître la date et l'heure de prélèvement et de fixation.

Le fixateur de référence est le formol tamponné à 4%. Les durées de fixation dépendent de la taille du prélèvement. Ainsi elles peuvent varier entre 6 et 48h pour une biopsie et entre 24 et 72h pour une pièce opératoire.

C. Certaines mutations

Pour interpréter l'expression immunohistochimique des protéines MMR il faut tenir compte du type de mutation. Les mutations faux sens sont le plus souvent responsables d'une conservation de l'expression protéique. A l'inverse, une perte d'expression sera observée en présence d'une mutation tronquée.

Il existe quelques cas décrits de mutations tronquées ou grandes délétions du gène *MLH1* n'induisant pas de perte d'expression de la protéine MLH1 (101) (102) (103)

Dans notre étude, les cas 17 et 19 sont porteurs de mutations faux sens des gènes *MSH2* et *MLH1* n'induisant pas de perte d'expression des protéines MMR au sein de la tumeur. En revanche, on observe une instabilité microsatellitaire au sein de la tumeur.

En effet, certaines mutations ne modifient pas l'épitope reconnu par l'anticorps. Ces mutations altèrent la fonction de la protéine réparatrice produite mais pas son antigénicité.

La protéine est ainsi reconnue par l'anticorps mais elle a perdu sa fonction réparatrice de dommages de l'ADN. Ainsi, la mutation faux sens, c.2245G>A de l'exon 14 du gène *MSH2* du cas 17 n'entraîne pas de perte d'expression des protéines MSH2 et MSH6. Cette mutation est décrite comme pathogène dans la littérature. Elle entraîne un changement d'acide aminé au niveau du codon 749 de la protéine MSH2 : l'acide glutamique est remplacé par la lysine. Sur la représentation schématique de la protéine MSH2, nous pouvons observer que le codon 749 est situé dans le domaine ATPase de cette protéine et en particulier dans la sous unité de liaison de l'ATP, ou d'hydrolyse.

Une conservation de l'expression de MSH2 en présence de cette mutation a été décrite par les équipes d'Ollila *et al* en 2008, et Mangold *et al* en 2005. (71)(101)

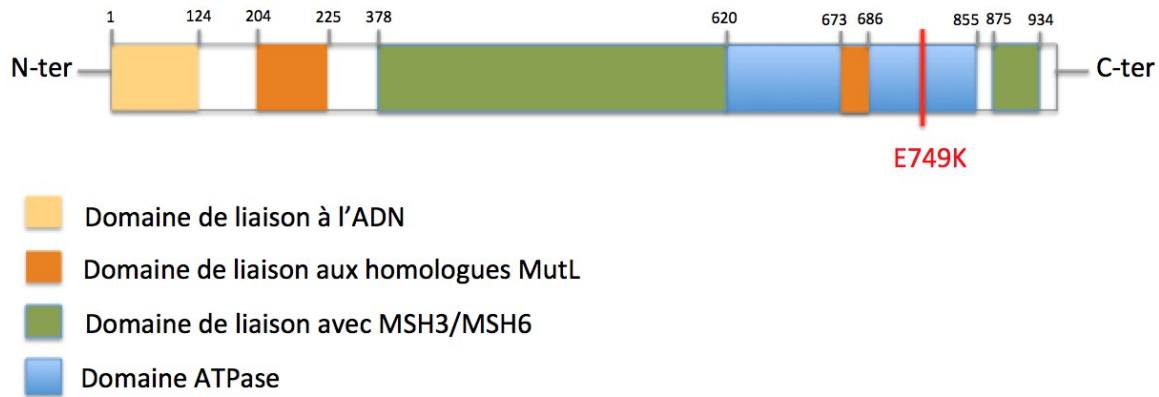


Figure 41: Représentation schématique de la protéine MSH2 avec localisation du changement d'acide aminé en position 749, dans le domaine ATPase, présent dans le cas 17.

En cas de mutation faux-sens n'affectant pas l'épitope de l'anticorps utilisé, nous pouvons observé des faux négatifs. En effet, le changement d'acide aminé résultant d'une mutation faux sens peut influencer la fonction de la protéine mais pas sa capacité de liaison à l'anticorps.

Les mutations faux sens des gènes *MMR* (en particulier *MSH6* et *MLH1*) peuvent induire des altérations de l'activation enzymatique de la protéine correspondante, ainsi la protéine peut subsister dans la cellule et être détectée lors de l'analyse immunohistochimique. Cependant, lorsque cette mutation faux sens est délétère, on observe un phénotype tumoral instable dû à la perte de fonction de la protéine MMR. La réalisation de la biologie moléculaire concomitante à l'analyse immunohistochimique permet de rattraper de nombreux cas, notamment en cas de mutation faux sens.

De plus, l'interprétation du marquage immunohistochimique d'une protéine MMR nécessite une bonne compréhension de la physiopathologie du système MMR de réparation de l'ADN. Les protéines MMR forment des hétérodimères. Ainsi, la protéine MSH2 se dimérise avec MSH6 pour former le complexe MutS (104). MLH1 se dimérise avec PMS2 pour former le complexe MutL (105). C'est pourquoi, une anomalie des protéines MLH1 ou MSH2 entraîne une dégradation du dimère. On observera une perte d'expression des 2 protéines MLH1/PMS2 et MSH2/MSH6 en cas de mutation constitutionnelle des gènes *MLH1* et *MSH2*.

A l'inverse, une mutation de *MSH6* ou de *PMS2* entraîne une perte isolée de MSH6 et PMS2. Dans notre étude, nous avons observé une perte d'expression de MSH2 et MSH6 pour le cas 16 qui est porteur d'une mutation du gène *MSH6* (c.3268_3274 del ex5, p.Glu1090LysFs*). Cette mutation correspond à un changement d'acide aminé en position 1090, situé tout près du domaine de liaison avec MSH2. Cette mutation devrait entraîner une perte isolée de MSH6 comme décrite dans la base de données UMD (Universal Mutation Database) (www.umd.be/). Nous pouvons donc supposer qu'il existe une mutation somatique bi-allélique du gène *MSH2* et mono-allélique du gène *MSH6* en plus de la mutation constitutionnelle du gène *MSH6*. Ceci expliquerait la perte d'expression à la fois de MSH6 mais aussi de MSH2. Les mutations somatiques bi-alléliques du gène *MSH2* ont été décrites dans la littérature.(106) De plus, l'âge de survenue de ces mutations n'était significativement pas plus élevé par rapport à celui du SL causé par une mutation constitutionnelle de *MLH1* ou *MSH2*. MSH6 est une protéine mineure, qui n'est pas indispensable à la stabilité du complexe MSH2-MSH6. En cas de mutation du gène *MSH6*, la protéine MSH2 se lie à la protéine MSH3 et poursuit sa fonction de reconnaissance des délétions/insertions de grande taille. Ainsi, on aura un défaut isolé de réparation des mésappariements de petite taille. C'est pourquoi, en présence d'une mutation *MSH6*, la tumeur peut être MSS. En l'absence de MSH6, MSH3 peut en partie prendre le relais dans la réparation des dommages de l'ADN. Il existe donc une activité partielle des protéines MMR intervenant dans la réparation des mésappariements de l'ADN. Ceci explique l'apparition tardive des tumeurs en présence de cette mutation. On parle ainsi de forme atténuée de SL. Dans notre étude, nous avons observé un phénotype stable pour le cas 10 qui a présenté un carcinome endométrioïde peu différencié à cellules claires à l'âge de 53 ans. Les cancers de l'endomètre sont plus fréquemment retrouvés chez les patientes mutées *MSH6*. De plus, en cas de mutation *MSH6*, ces tumeurs peuvent être de phénotype stable.(107)(108)(109)(110). Ceci s'explique par la fonction mineure de *MSH6*. En effet, l'hétérodimère MSH2/MSH6 reconnaît une base, ou une insertion /délétion de petite taille. En revanche, l'hétérodimère

MSH2/MSH3 reconnaît les grandes boucles d'insertions et délétions. L'hétérodimère MSH2/MSH3 fonctionne toujours en cas de mutation MSH6, ainsi l'instabilité microsatellitaire se limite à une répétition en tandem de mononucléotides. Dans l'étude de You *et al*, un grand nombre de tumeurs endométriales de phénotype MSS initialement retrouvé avec le NCI panel (BAT25, BAT26, D5S346, D2S123, and D17S250) présentait un phénotype instable avec la PCR pentaflex. L'addition du marqueur mononucléotide BAT40, présent dans la PCR pentaflex a permis de reclasser certaines tumeurs MSI-L en MSI-H et certaines tumeurs MSS en tumeur MSI-L. Dans notre étude, nous avons également utilisé la PCR pentaflex. Nous avons observé une faible conservation focale de l'expression de MLH1 avec une perte de PMS2 chez un patient (cas 20) porteur d'un réarrangement de grande taille du gène *MLH1* (del ex 17-19). En effet, seules les glandes tumorales situées en superficie et les glandes adénomateuses exprimaient faiblement la protéine correspondante. Dans la littérature, la perte isolée de PMS2 peut s'observer en cas de mutation faux sens de *MLH1* (111) (112) (113). Cependant, en cas de réarrangement de grande taille, il est difficile d'imaginer que la protéine ne puisse être dégradée ou du moins en partie. C'est pourquoi, devant ce marquage faible et superficiel, nous pouvons nous interroger sur un probable accrochage superficiel de l'anticorps. Néanmoins, nous pouvons constater l'utilité d'utiliser l'anticorps anti-PMS2. En effet, la perte isolée de PMS2 peut s'expliquer par la présence d'une mutation de *PMS2* ou une mutation faux sens de *MLH1*. Cependant, devant le jeune âge du patient (43 ans), l'hypothèse d'une mutation constitutionnelle du gène *PMS2* est très peu probable.

D. Nature de la lésion

La recherche d'instabilité microsatellitaire sur adénome est à ce jour controversée car la sensibilité de détection est diminuée par rapport aux cancers avancés. Dans différentes études, cette sensibilité est estimée à environ 70%. Cependant, elle reste une alternative

lorsque les cancers du colon sont indisponibles (55) Ainsi pour les cas 6, 13 et 18, cette analyse n'a pu être réalisée sur un autre matériel tumoral.

Dans notre étude, il existait 5 cas d'adénome tubuleux dont 3 en dysplasie de bas grade (cas n°6, 15 et 18) et 2 en dysplasie de haut grade (cas 13 et 20).

Les analyses somatiques n'ont pu être réalisées que sur du matériel précancéreux pour les cas 6, 18 et 13.

L'adénome en dysplasie de haut grade (cas 13) avait un phénotype microsatellitaire instable et un marquage immunohistochimique non contributif pour PMS2 car faute de témoin interne, l'absence de marquage par les cellules tumorales pour cette protéine ne peut être interprétée. Les autres protéines MMR étaient exprimées par les cellules tumorales. Ce

patient (cas 13) était porteur d'une mutation constitutionnelle du gène *MLH1*.

En revanche, pour l'adénome en dysplasie de bas grade (cas 18), le phénotype tumoral était stable avec une expression immunohistochimique contributive et concordante avec la mutation constitutionnelle du gène *MSH2*. On observait une perte d'expression de *MSH2* et *MSH6* au sein de la lésion précancéreuse.

Pour le cas 6 correspondant à un adénome tubuleux en dysplasie de bas grade, les deux analyses étaient contributives. En effet, nous avons observé lors du renouvellement des analyses une instabilité microsatellitaire associée à une perte d'expression

immunohistochimique des protéines *MSH2* et *MSH6* (mutation *MSH2*, c.1058del, p.Lys353Argfs*4, exon 6).

Pour les cas 15 et 20, nous disposions également de matériel adénocarcinomeux infiltrant (cas 15) et carcinomeux en intra-muqueux (cas 20).

Pour le cas 15, les analyses somatiques sur l'adénome en dysplasie de bas grade montraient une conservation de l'expression des 4 protéines MMR avec un phénotype microsatellitaire stable.

L'adénome en dysplasie de haut grade et l'adénocarcinome intra-muqueux du cas 20 étaient intriqués, ne permettant pas de réaliser de phénotype RER sur l'unique contingent adénomeux. En revanche, les expressions immunohistochimiques des protéines MMR étaient superposables avec une perte isolée de PMS2.

En fonction des études, l'incidence de l'instabilité microsatellitaire dans les polypes varie entre 41 et 86%, ce qui est comparable à la sensibilité de l'analyse immunohistochimique avec une sensibilité qui varie entre 49 et 82% (114)(115)(55)(116)(56). Dans l'étude de Pino *et al*, l'ensemble des adénomes en dysplasie de haut grade se caractérisaient par une instabilité microsatellitaire accompagnée d'une perte d'expression de la protéine MMR correspondante à la mutation constitutionnelle.(117)

XIII. Analyse des caractéristiques des patients étudiés

Dans cette série, la majorité des patients (4 patients) porteurs d'une mutation *MSH6* avaient plus de 50 ans. Seuls deux patients porteurs d'une mutation *MSH6* avaient 49 ans et 50 ans. Ainsi, par rapport aux autres mutations, la moyenne d'âge de survenue d'un cancer du spectre de syndrome de Lynch est plus élevée pour les mutations *MSH6* (54 ans), que pour les mutations intéressant les gènes *MSH2* (51 ans) et *MLH1* (44 ans). Dans la littérature, il a été décrit que les porteurs d'une mutation *MSH6* ont un cancer colorectal à un âge plus avancé que les porteurs d'une mutation constitutionnelle de *MSH2* et *MLH1* (118) (119). De plus, ils sont le plus souvent localisés dans la partie distale du colon. (120). Parmi les 5 cancers colorectaux de cette série, développés chez des patients porteurs de mutation *MSH6*, 4 étaient localisés dans le colon gauche ou le rectum. Dans notre étude, nous avons observé un cancer de l'endomètre chez une femme porteuse d'une mutation constitutionnelle du gène *MSH6*. De même, dans la littérature les cancers de l'endomètre sont retrouvés plus fréquemment chez les porteuses de mutations *MSH6* par rapport aux mutations de *MSH2* et *MLH1*.(108) (118) Les tumeurs de l'arbre urinaires développées dans le cadre d'un syndrome de Lynch sont significativement plus nombreuses en cas de mutations du gène *MSH2* (121) (79) Le seul cas de cette étude ayant une tumeur urothéliale était porteur d'une mutation *MSH2*. Les mutation faux sens sont essentiellement retrouvées dans les gènes *MLH1* et *MSH2* dans cette étude, où elles représentent 40% (2/5) et 37% (3/8) des mutations de chaque gène. En revanche, un seul cas muté *MSH6* avait une mutation faux sens (1/6 ; 17%). Dans

la littérature, plus d'1/3 des mutations *MSH6* et *MLH1* et environ 20 à 25% des mutations *MSH2* sont des mutations faux sens. (122)

XIV. Sensibilité et spécificité des analyses somatiques

Dans notre étude, nous avons pu observer respectivement pour les analyses immunohistochimique et de biologie moléculaire des sensibilités de 50% et 70%. En général, l'étude immunohistochimique est fiable pour la détection des mutations qui entraînent une protéine tronquée.

Dans la littérature, la sensibilité et la spécificité de l'immunohistochimie et de la biologie moléculaire dépendent du type de mutation évaluée. En effet, les études de la fin des années 90 et du début des années 2000, montraient une sensibilité de la biologie moléculaire globalement plus élevée que l'étude immunohistochimique qui portait uniquement sur *MLH1* et *MSH2*. (54)

Cependant, les études réalisées au milieu des années 2000, étudiant l'expression de *MSH2*, *MSH6*, *MLH1* et *PMS2* avaient montré une sensibilité plus élevée de l'immunohistochimie par rapport à la biologie moléculaire. (6) (123) (124). En effet, la sensibilité moyenne de l'immunohistochimie de ces 3 études était de 94% et de 83% pour la biologie moléculaire. La sensibilité moindre de la biologie moléculaire était due à l'absence de détection d'instabilité microsatellitaire des cas mutés *MSH6* et *PMS2* dans les études de Southey *et al* 2005 et Lagerstedt Robinson *et al* 2007.

Une certaine expérience de l'analyse immunohistochimique des protéines MMR est nécessaire afin d'éviter des erreurs d'interprétation.

De nombreuses mutations constitutionnelles de *MLH1* ne s'accompagnent que d'une perte d'expression isolée de la protéine *PMS2*.

Ainsi, nous pouvons comprendre que les premières études qui n'utilisaient que deux anticorps : anti-MLH1 et anti-MSH2 avaient une valeur prédictive plus faible de sélectionner un syndrome de Lynch que celles qui emploient les quatre anticorps.

La combinaison des analyses immunohistochimique et moléculaire est un outil puissant de pré-sélection dans le cadre du syndrome de Lynch. Ces deux analyses sont complémentaires. L'analyse de biologie moléculaire est très utile en cas de mutation faux sens délétère qui peut se traduire par une conservation de l'expression des 4 protéines MMR (cas 17 et 19). En effet, pour ces cas nous avons observé une instabilité microsatellitaire. Elle permet également de rattraper certains cas d'adénomes en dysplasie de bas grade qui ne présentent qu'un phénotype instable sans extinction des protéines MMR (cas 18). Ainsi, dans notre étude la sensibilité des deux analyses combinées est de 80%.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le renouvellement des analyses de pré-criblage, avec l'analyse d'immunohistochimie de l'expression des protéines MMR et l'analyse de biologie moléculaire, a permis de reclasser les cas étudiés, en particulier en non discordants (8/20). Seuls six cas ont été considérés comme véritablement discordants.

La combinaison de ces analyses a l'avantage de détecter la majorité des cas, en raison de leur complémentarité. L'un des principaux atouts de l'étude immunohistochimique des protéines MMR est d'orienter les analyses constitutionnelles en fonction de la perte d'expression de ces protéines. C'est pourquoi, la meilleure compréhension de ces profils discordants est indispensable afin de cibler le bon gène *MMR* pour les analyses constitutionnelles et de connaître les différentes particularités (ou limites) propres au type de mutation et à la qualité du prélèvement.

La nature du prélèvement et les conditions pré-analytiques en particulier la fixation du prélèvement conditionnent les résultats des analyses somatiques. Comme nous l'avons vu les prélèvements biopsiques ont l'avantage de permettre une fixation homogène et de bonne

qualité par rapport aux pièces opératoires. Ainsi, ce type de prélèvement est à privilégier afin d'éviter la sous fixation et la fixation hétérogène que l'on peut retrouver sur les pièces opératoires.

Les adénomes colorectaux sont des prélèvements de dernier recours pour ces analyses car leur sensibilité est plus faible que pour l'adénocarcinome.

La présence d'un phénotype tumoral instable associé à une conservation de l'expression des quatre protéines MMR doit faire suspecter une mutation faux sens délétère.

Les carcinomes endométrioïdes, peuvent être de phénotype stable, avec une perte d'expression immunohistochimique d'une ou de deux protéines MMR correspondantes à la mutation d'un des gènes MMR. Enfin, certaines mutations *MLH1* peuvent se manifester par une perte isolée de l'expression immunohistochimique de PMS2.

Le nombre de cas analysés est faible. Il s'agit d'une étude rétrospective ne permettant pas de connaître les conditions de prélèvements et de fixation. En effet, les prélèvements proviennent de différents laboratoires privés et publics. Ainsi, la connaissance de ces différents paramètres permettrait d'améliorer les étapes pré-analytiques afin de rendre ces analyses les plus optimales. Cependant, la réalisation d'une étude prospective est difficile à mettre en place car ces cas sont rares, et nécessite la collaboration de nombreux laboratoires de pathologie et de plateformes de génétique somatique.

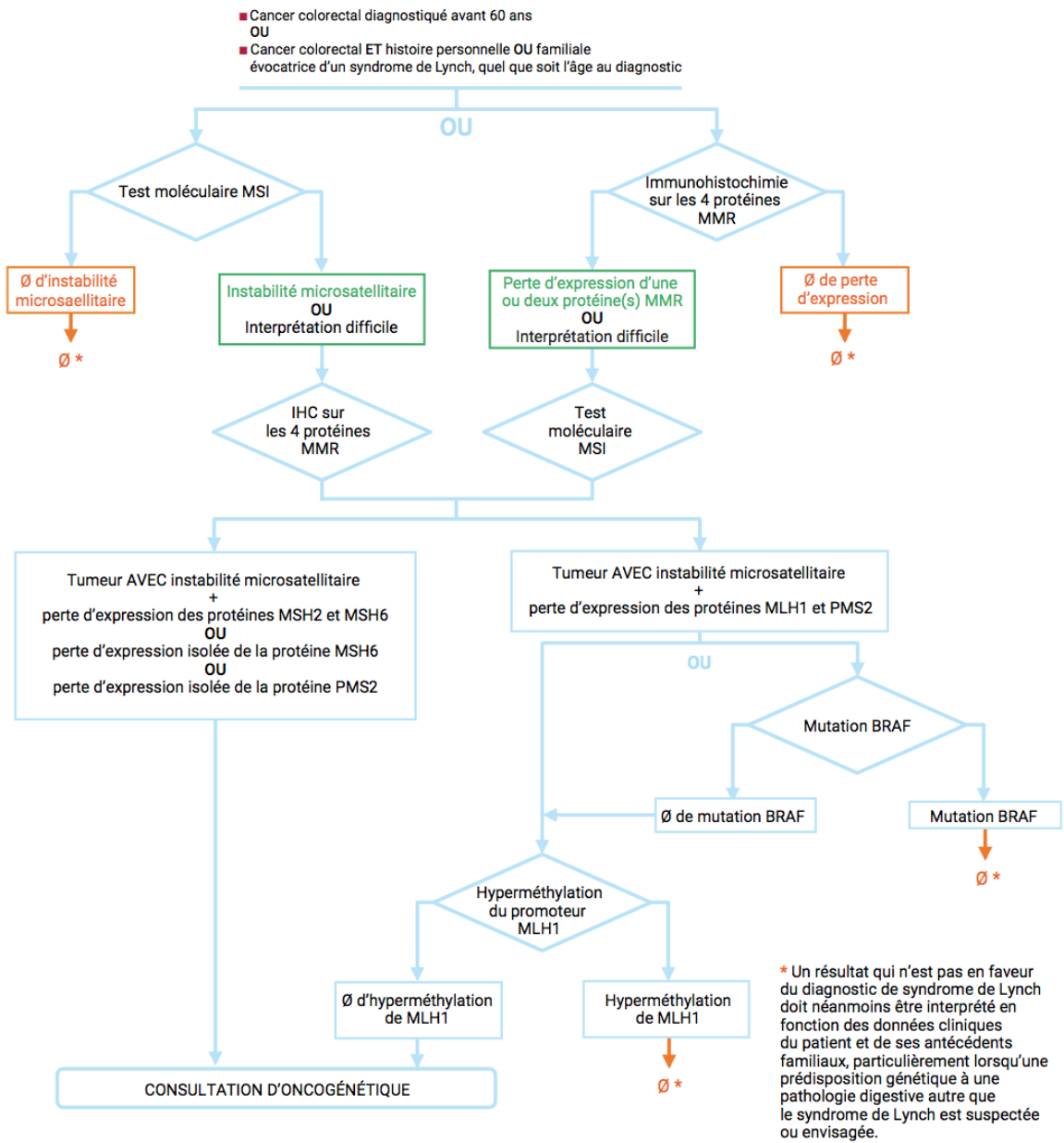
Un séquençage des gènes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* et *PMS2* sur l'ADN tumoral du cas 20 permettrait de comprendre le second événement nécessaire à l'inactivation bi-allélique.

ANNEXES

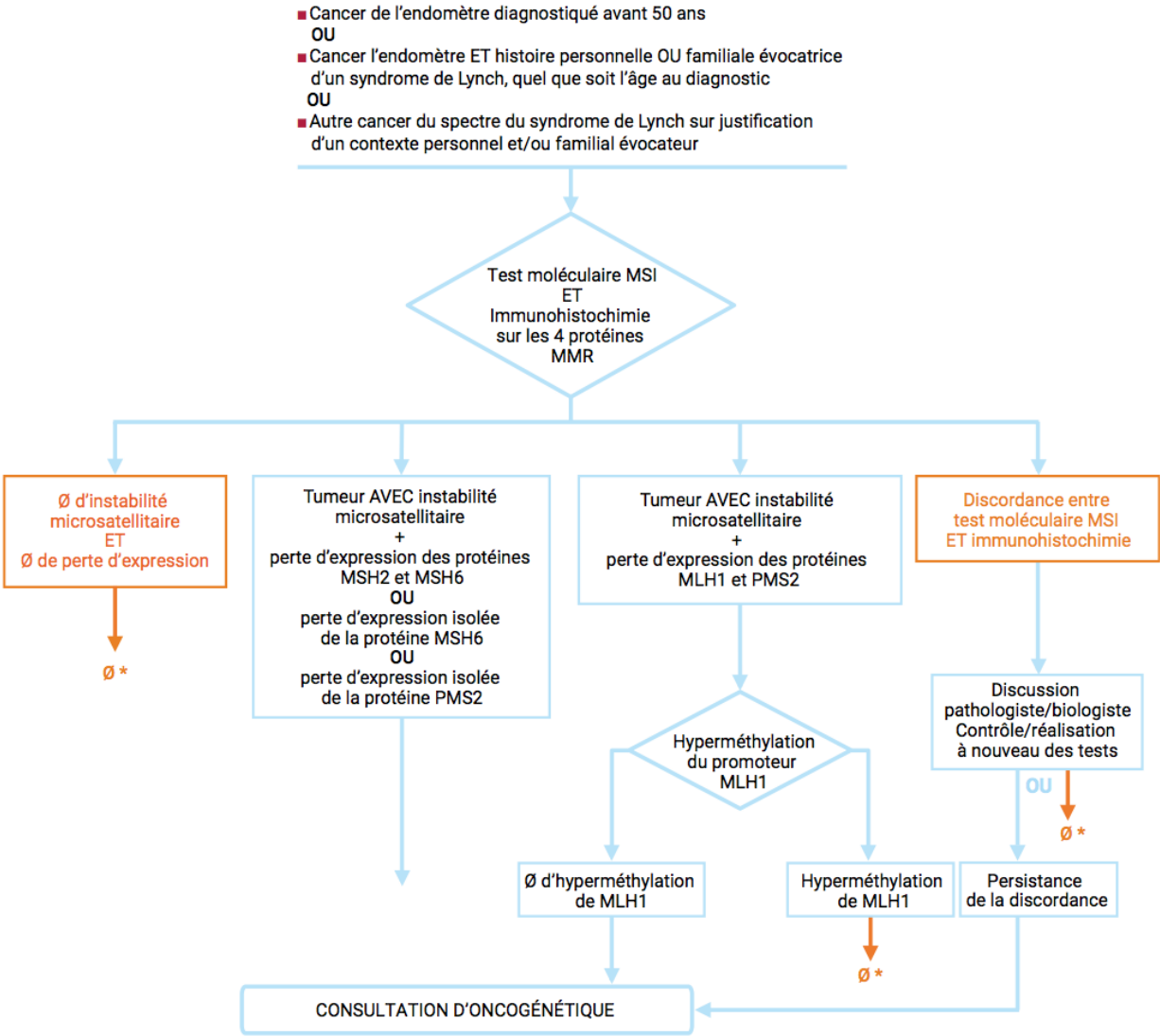
Annexe 1 : Classification TNM 2009 et correspondances cliniques du cancer colorectal

Stade pTNM	Signification	Stade Clinique
Tis	Carcinome in situ : limité à la muqueuse et à la musculaire muqueuse	0
T1	Envahissement de la sous-muqueuse	I
T2	Envahissement de la musculaire	I
T3	Envahissement de la sous-séreuse	IIa
T4a	Envahissement de la séreuse	IIb
T4b	Envahissement par contiguïté d'un organe de voisinage	IIb
N1a	1 ganglion métastasé	III
N1b	2 à 3 ganglions métastasés	III
N1c	1 nodule métastatique sans structure ganglionnaire résiduelle	III
N2a	4 à 6 ganglions métastasés	III
N2b	≥ 7 ganglions métastasés	III
M1a	Métastase viscérale d'un organe	IV
M1b	Métastase viscérale de plus d'1 organe ou métastase péritonéale	IV

Annexe 2: Arbre décisionnel dans la recherche d'une instabilité microsatellitaire dans le cadre d'un cancer colorectal, d'après les recommandations de l'InCa 2016.



Annexe 3: Arbre décisionnel de recherche d'une instabilité microsatellitaire d'un cancer de l'endomètre ou autre cancer du spectre du SL (hors cancer colorectal) d'après les recommandations de l'InCa 2016.



* Un résultat qui n'est pas en faveur du diagnostic de syndrome de Lynch doit néanmoins être interprété en fonction des données cliniques du patient et de ses antécédents familiaux, particulièrement lorsqu'une prédisposition génétique à une pathologie digestive autre que le syndrome de Lynch est suspectée ou envisagée.

Annexe 4 : Séquençage nouvelle génération ILLUMINA GAlIx
Le protocole a été décrit par Tewhey et ses collaborateurs (2009)

1 Préparation des librairies :

- La première étape consiste à fragmenter l'ADN génomique par sonication en molécules de 200pb.
- Des adaptateurs sont ensuite ajoutés de part et d'autre de ces fragments d'ADN.
- Puis vient l'étape de l'amplification qui nécessite une région complémentaire aux adaptateurs à laquelle est ajoutée une séquence qui permettra la fixation des fragments sur le support destiné au séquenceur.
- La sélection des régions d'intérêt se fait par capture en milieu liquide en utilisant des sondes d'ARN biotinylées.

16) Amplification en cluster :

Elle est réalisée par le robot automatisé cBot commercialisé par Illumina Inc.

17) Le séquençage :

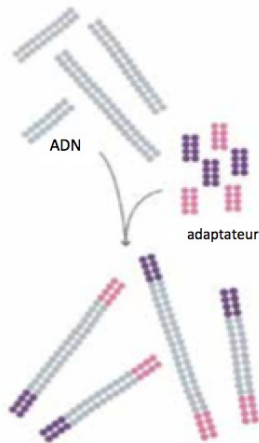
Il est réalisé par le Génome Analyser II Gallx commercialisé par Illumina. Il est basé sur la technologie de séquençage à terminateurs de chaîne réversibles.

18) L'analyse informatique :

Le workflow informatique comprend les étapes suivantes :

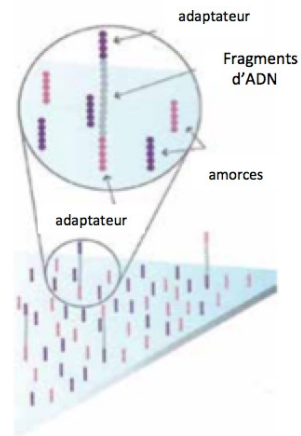
- analyse d'images
- Base calling : Les données brutes sont analysées par le logiciel d'analyse en temps réel d'Illumina RTA 1.10 qui convertit le fichier « image/.tif » en un fichier « texte/.bcl »
- Alignement : les séquences sont alignées sur le génome de référence. Ces étapes sont réalisées par CASAVA 1.8.2.
- Variant calling est effectuée par CASAVA.
- Annotation

1°) Préparation des fragments d'ADN

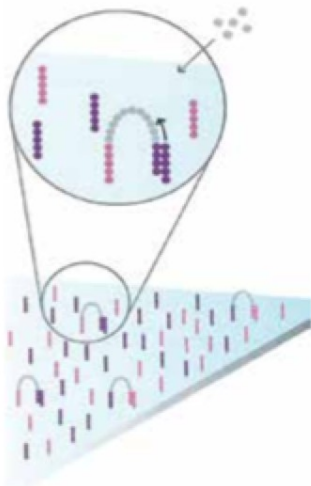


Ligation des adaptateurs aux 2 extrémités des fragments

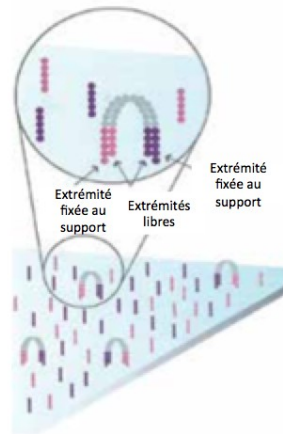
2°) Fixation des fragments sur le support solide



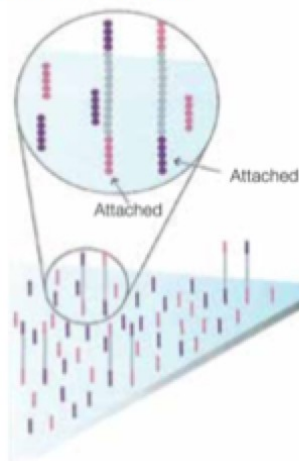
3°) Hybridation du brin sur l'amorce adjacente: formation d'une structure en pont



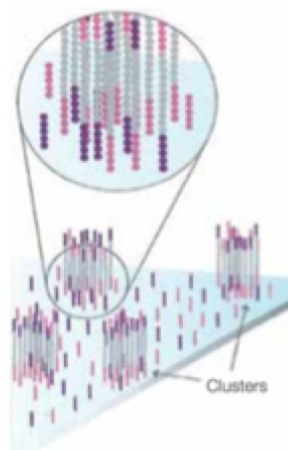
4°) Elongation à partir de la deuxième amorce: formation d'un double brin



5°) Dénaturation des molécules à double brin: formation de molécules anti-parallèles liées de façon covalente à la flow cell



6°) Cluster constitué de 2000 molécules identiques sens



Annexe 5 : Caractéristiques des patients étudiés

Patients	Type de Mutation	Localisation et type tumoral	Pièce opératoire/ Biopsies	Age*
Cas 1	mutation <i>MSH6</i> (c.3202C> T, p.Arg1068X, ex5)	CC	PO	52 ans
Cas 2	mutation <i>MSH6</i> (c.3261del ex5 (NGS) p.Phe1088SerFs*2	CC gauche	Biopsies	50 ans
Cas 3	mutation <i>MSH2</i> (c.2662del, p.leu888Cysfs*4, exon 16)	ADK duodéal	PO	50 ans
Cas 4**	mutation <i>MSH2</i> (c.2459_3T>G, intron 14)	Carcinome transitionnel et papillaire infiltrant	PO : résection trans uréthro-vésicale	42 ans
Cas 5	mutation <i>MSH2</i> c.1864_1865delinsT, p.Pro622X, exon 12	CC droit	PO	64 ans
Cas 6	mutation <i>MSH2</i> (c.1058del, p.Lys353Argfs*4, exon 6)	Adénome colique	Biopsies	47 ans
Cas 7	del ex 1 et 2 et promoteur du gène <i>MSH2</i>	CC droit	PO	34 ans
Cas 8	mutation <i>MLH1</i> (Del ex12 et 13)	CC droit	PO	45 ans
Cas 9	mutation <i>MSH6</i> (c.3261dupC, p.Phe1088LeufsX5, ex5)	CC	PO	63 ans
Cas 10	mutation <i>MSH6</i> (c.2611_2614dup, p.Ile872AsnfsX10, ex4)	Carcinome endométrioïde	PO	53 ans
Cas 11	mutation <i>MSH2</i> (c.2245G>A, p.Glu749Lys, ex14)	CC	PO	48 ans
Cas 12	mutation <i>MSH2</i> (c.2699 C>G, p.Ser900*, ex16)	Carcinome du sein	PO	64 ans
Cas 13	mutation <i>MLH1</i> (c.1178 T>C, p.Leu393Pro ex12)	Polype caecal	Biopsies	43 ans
Cas 14	mutation <i>MLH1</i> (c.678_2A>T, Intron 8)	CC droit	PO	34 ans
Cas 15	mutation <i>MSH6</i> (c.3261dup, p.Phe1088LeufsX5, ex5)	CCR et adénome tubulo-villeux	PO	49 ans
Cas 16	mutation <i>MSH6</i> (c.3268_3274 del ex5, p.Glu1090Lysfs*)	CC droit	PO	58 ans
Cas 17	mutation <i>MSH2</i> (c.2245 G>A, p.Glu 749Lys)	Cancer rectal	Biopsies	56 ans
Cas 18	mutation <i>MSH2</i> (c.1705_1706, p.Glu569 del, 9II*2, ex11 ex11)	Adénome tubulo-villeux en dysplasie de haut grade	PO	51 ans
Cas 19	mutation <i>MLH1</i> (c.1178 T>C, p.Leu393Pro, ex12)	CC gauche	PO	55 ans
Cas 20	mutation <i>MLH1</i> (del ex 17-19)	Adénome en dysplasie de haut grade et carcinome intra-muqueux	PO	43 ans

* Age de la 1^{ère} tumeur du spectre du SL. **Patient ayant pour antécédents un adénocarcinome colique à 42 ans, une tumeur du grêle à 43 ans, un cancer bronchique à 45 ans, un cancer de la prostate à 55 ans et un carcinome urothélial de la vessie à 66ans. CC : cancer colique

Annexe 6 : Anticorps utilisés initialement pour l'étude d'expression des protéines MSH2 et MSH6.

AC	Clone/dilution
Anti-MSH2	servio clone FE II 1/50
Anti-MSH2	FEII Calbochiem 1/25
Anti-MSH2	VWR Na 27-100
Anti-MSH2	oncogene clone FE11
Anti-MSH2	diagnostic biosystem clone G168-728
Anti-MSH6	BD clone 44 1/100
Anti-MSH6	A44 Clinisciences 1/25
Anti-MSH6	Cliniscience 08-1374
Anti-MSH6	diagnostic biosystem clone 44
Anti-MSH6	Zymed clone 44

Etude	AC anti-MSH2	Ac anti-MSH6	AC anti-MLH1	AC anti-PMS2
Salahshor et al 2001	Calbochiem, Clone FE11	Aucun	BD PharMingen clone G168-15	Aucun
Wahlberg et al 2002	Oncogene Research products, clone FE11	Aucun	BD PharMingen clone G168-728	Aucun
Mangold et al 2005	BD PharMingen. Clone G219-1129	Aucun.	BD PharMingen. Clone G168-15	Aucun.
Southey et al 2005	Oncogene Research products, clone FE11	BD Transduction Laboratories clone 44	PharMingen, clone G168-728	PharMingen. Clone A16-4
Lagerstedt et al 2007	Oncogene Research products, clone FE11 dilution 1 :100	BD PharMingen clone 44 dilution 1 :1000	BD PharMingen. Clone G168-15 dilution 1 :100	Aucun
Hampel et al 2008	Oncogene research Products, clone FE11 dilution 1 :200	BD Transduction Laboratories dilution 1 :300	PharMingen, dilution 1 :10	Santa Cruz Biotechnology 1 :400
Kumarasinghe et al 2010	BD PharMingen. Clone G219-1129	BD PharMingen clone 44	BD PharMingen. Clone G168-15	BD PharMingen. Clone A16-4

Annexe 7 : Principaux anticorps utilisés lors des principales études des années 2000

BIBLIOGRAPHIE

1. Coupier I, Gauthier-Villars M, This P, Stoppa-Lyonnet D. [Genetic predisposition and ovarian cancer]. *Rev Prat.* 31 oct 2004;54(16):1757 - 62.
2. Robert-Grandpierre F, Bressoud A, Hutter P, Tschantz P. [When and how to investigate a mutation predisposing to the Lynch syndrome]. *Rev Med Suisse Romande.* mai 2001;121(5):357 - 60.
3. Lynch HT, Lynch JF. Lynch syndrome: history and current status. *Dis Markers.* 2004;20(4-5):181 - 98.
4. Watson P, Riley B. The tumor spectrum in the Lynch syndrome. *Fam Cancer.* 2005;4(3):245 - 8.
5. Olschwang S, Bonaiti C, Feingold J, Frébourg T, Grandjouan S, Lasset C, et al. [Identification and management of HNPCC syndrome (hereditary non polyposis colon cancer), hereditary predisposition to colorectal and endometrial adenocarcinomas]. *Bull Cancer.* avr 2004;91(4):303 - 15.
6. Hampel H, Stephens JA, Pukkala E, Sankila R, Aaltonen LA, Mecklin J-P, et al. Cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: later age of onset. *Gastroenterology.* août 2005;129(2):415 - 21.
7. Young J, Simms LA, Biden KG, Wynter C, Whitehall V, Karamatic R, et al. Features of colorectal cancers with high-level microsatellite instability occurring in familial and sporadic settings: parallel pathways of tumorigenesis. *Am J Pathol.* déc 2001;159(6):2107 - 16.
8. Edelstein DL, Axilbund J, Baxter M, Hyland LM, Romans K, Griffin CA, et al. RAPID DEVELOPMENT OF COLORECTAL NEOPLASIA IN PATIENTS WITH LYNCH SYNDROME. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association.* avr 2011;9(4):340.
9. Raut CP, Pawlik TM, Rodriguez-Bigas MA. Clinicopathologic features in colorectal cancer patients with microsatellite instability. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 21 déc 2004;568(2):275 - 82.
10. Half E, Bercovich D, Rozen P. Familial adenomatous polyposis. *Orphanet J Rare Dis.* 12 oct 2009;4:22.
11. Michael-Robinson JM, Biemer-Hüttmann A, Purdie DM, Walsh MD, Simms LA, Biden KG, et al. Tumour infiltrating lymphocytes and apoptosis are independent features in colorectal cancer stratified according to microsatellite instability status. *Gut.* mars 2001;48(3):360 - 6.
12. Goodfellow PJ, Buttin BM, Herzog TJ, Rader JS, Gibb RK, Swisher E, et al. Prevalence of defective DNA mismatch repair and MSH6 mutation in an unselected series of endometrial cancers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 13 mai 2003;100(10):5908 - 13.
13. Ollikainen M, Abdel-Rahman WM, Moisio A-L, Lindroos A, Kariola R, Järvelä I, et

- al. Molecular analysis of familial endometrial carcinoma: a manifestation of hereditary nonpolyposis colorectal cancer or a separate syndrome? *J Clin Oncol.* 20 juill 2005;23(21):4609 - 16.
14. Baglietto L, Lindor NM, Dowty JG, White DM, Wagner A, Gomez Garcia EB, et al. Risks of Lynch syndrome cancers for MSH6 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst.* 3 févr 2010;102(3):193 - 201.
 15. Bonadona V, Bonaïti B, Olschwang S, Grandjouan S, Huiart L, Longy M, et al. Cancer Risks Associated With Germline Mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 Genes in Lynch Syndrome. *JAMA.* 8 juin 2011;305(22):2304 - 10.
 16. Westin SN, Lacour RA, Urbauer DL, Luthra R, Bodurka DC, Lu KH, et al. Carcinoma of the Lower Uterine Segment: A Newly Described Association With Lynch Syndrome. *JCO.* 20 déc 2008;26(36):5965 - 71.
 17. Garg K, Leitaó MM, Kauff ND, Hansen J, Kosarin K, Shia J, et al. Selection of endometrial carcinomas for DNA mismatch repair protein immunohistochemistry using patient age and tumor morphology enhances detection of mismatch repair abnormalities. *Am J Surg Pathol.* juin 2009;33(6):925 - 33.
 18. Garg K, Soslow RA. Lynch syndrome (hereditary non-polyposis colorectal cancer) and endometrial carcinoma. *J Clin Pathol.* août 2009;62(8):679 - 84.
 19. Carcangiu ML, Radice P, Casalini P, Bertario L, Merola M, Sala P. Lynch syndrome--related endometrial carcinomas show a high frequency of nonendometrioid types and of high FIGO grade endometrioid types. *Int J Surg Pathol.* févr 2010;18(1):21 - 6.
 20. Broaddus RR, Lynch HT, Chen L-M, Daniels MS, Conrad P, Munsell MF, et al. Pathologic features of endometrial carcinoma associated with HNPCC: a comparison with sporadic endometrial carcinoma. *Cancer.* 1 janv 2006;106(1):87 - 94.
 21. Stoffel E, Mukherjee B, Raymond VM, Tayob N, Kastrinos F, Sparr J, et al. Calculation of risk of colorectal and endometrial cancer among patients with Lynch syndrome. *Gastroenterology.* nov 2009;137(5):1621 - 7.
 22. Barrow E, Robinson L, Alduaij W, Shenton A, Clancy T, Lalloo F, et al. Cumulative lifetime incidence of extracolonic cancers in Lynch syndrome: a report of 121 families with proven mutations. *Clin Genet.* févr 2009;75(2):141 - 9.
 23. Walsh CS, Blum A, Walts A, Alsabeh R, Tran H, Koeffler HP, et al. Lynch syndrome among gynecologic oncology patients meeting Bethesda guidelines for screening. *Gynecologic Oncology.* mars 2010;116(3):516 - 21.
 24. Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med.* 13 janv 2000;342(2):69 - 77.
 25. Reitmair AH, Cai J-C, Bjerknes M, Redston M, Cheng H, Pind MTL, et al. MSH2 Deficiency Contributes to Accelerated APC-mediated Intestinal Tumorigenesis. *Cancer Res.* 1 juill 1996;56(13):2922 - 6.
 26. Järvinen HJ, Mecklin JP, Sistonen P. Screening reduces colorectal cancer rate in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology.* mai 1995;108(5):1405 - 11.

27. Engel C, Rahner N, Schulmann K, Holinski-Feder E, Goecke TO, Schackert HK, et al. Efficacy of annual colonoscopic surveillance in individuals with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol.* févr 2010;8(2):174 - 82.
28. Vasen HFA, Abdirahman M, Brohet R, Langers AMJ, Kleibeuker JH, van Kouwen M, et al. One to 2-year surveillance intervals reduce risk of colorectal cancer in families with Lynch syndrome. *Gastroenterology.* juin 2010;138(7):2300 - 6.
29. Rahmi G, Lecomte T, Malka D, Maniere T, Le Rhun M, Guimbaud R, et al. Impact of Chromoscopy on Adenoma Detection in Patients With Lynch Syndrome: A Prospective, Multicenter, Blinded, Tandem Colonoscopy Study. *Am J Gastroenterol.* févr 2015;110(2):288 - 98.
30. Féau S, Barbieux J-P, Dorval E, Lecomte T. Syndrome de Lynch : phénotype endoscopique et stratégie de prise en charge endoscopique. *Hépatogastro & Oncologie Digestive.* 1 déc 2012;19(10):823 - 31.
31. de Jong AE, Hendriks YMC, Kleibeuker JH, de Boer SY, Cats A, Griffioen G, et al. Decrease in Mortality in Lynch Syndrome Families Because of Surveillance. *Gastroenterology.* mars 2006;130(3):665 - 71.
32. Rubenstein JH, Enns R, Heidelbaugh J, Barkun A, Adams MA, Dorn SD, et al. American Gastroenterological Association Institute Guideline on the Diagnosis and Management of Lynch Syndrome. *Gastroenterology.* 1 sept 2015;149(3):777 - 82.
33. Parry S, Win AK, Parry B, Macrae FA, Gurrin LC, Church JM, et al. Metachronous colorectal cancer risk for mismatch repair gene mutation carriers: the advantage of more extensive colon surgery. *Gut.* juill 2011;60(7):950 - 7.
34. Natarajan N, Watson P, Silva-Lopez E, Lynch HT. Comparison of extended colectomy and limited resection in patients with Lynch syndrome. *Dis Colon Rectum.* janv 2010;53(1):77 - 82.
35. Rodríguez-Bigas MA, Vasen HF, Pekka-Mecklin J, Myrhøj T, Rozen P, Bertario L, et al. Rectal cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer after abdominal colectomy. International Collaborative Group on HNPCC. *Ann Surg.* févr 1997;225(2):202 - 7.
36. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, Thibodeau SN, Labianca R, Hamilton SR, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol.* 10 juill 2010;28(20):3219 - 26.
37. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med.* 25 juin 2015;372(26):2509 - 20.
38. Schmeler KM, Lynch HT, Chen L, Munsell MF, Soliman PT, Clark MB, et al. Prophylactic surgery to reduce the risk of gynecologic cancers in the Lynch syndrome. *N Engl J Med.* 19 janv 2006;354(3):261 - 9.
39. Palombo F, Iaccarino I, Nakajima E, Ikejima M, Shimada T, Jiricny J. hMutSbeta, a heterodimer of hMSH2 and hMSH3, binds to insertion/deletion loops in DNA. *Curr Biol.* 1 sept 1996;6(9):1181 - 4.
40. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology.* juin 2010;138(6):2073 - 2087.e3.

41. Umar A, Risinger JI, Hawk ET, Barrett JC. Testing guidelines for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Nature Reviews Cancer*. 1 févr 2004;4(2):153 - 8.
42. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum*. mai 1991;34(5):424 - 5.
43. Watson P, Lynch HT. Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer*. 1 févr 1993;71(3):677 - 85.
44. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology*. juin 1999;116(6):1453 - 6.
45. Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JR, Khan PM, et al. A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst*. 3 déc 1997;89(23):1758 - 62.
46. Syngal S, Fox EA, Eng C, Kolodner RD, Garber JE. Sensitivity and specificity of clinical criteria for hereditary non-polyposis colorectal cancer associated mutations in MSH2 and MLH1. *J Med Genet*. sept 2000;37(9):641 - 5.
47. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst*. 18 févr 2004;96(4):261 - 8.
48. Colonna M, Bossard N, Mitton N, Remontet L, Belot A, Delafosse P, et al. [Some interpretation of regional estimates of the incidence of cancer in France over the period 1980--2005]. *Rev Epidemiol Sante Publique*. déc 2008;56(6):434 - 40.
49. Tariq K, Ghias K. Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer Biol Med*. mars 2016;13(1):120 - 35.
50. Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res*. 1 mars 1997;57(5):808 - 11.
51. Deng G, Bell I, Crawley S, Gum J, Terdiman JP, Allen BA, et al. BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 1 janv 2004;10(1 Pt 1):191 - 5.
52. Lubomierski N, Plotz G, Wormek M, Engels K, Kriener S, Trojan J, et al. BRAF mutations in colorectal carcinoma suggest two entities of microsatellite-unstable tumors. *Cancer*. 1 sept 2005;104(5):952 - 61.
53. Domingo E, Espín E, Armengol M, Oliveira C, Pinto M, Duval A, et al. Activated BRAF targets proximal colon tumors with mismatch repair deficiency and MLH1 inactivation. *Genes Chromosom Cancer*. 1 févr 2004;39(2):138 - 42.
54. Shia J. Immunohistochemistry versus Microsatellite Instability Testing For Screening Colorectal Cancer Patients at Risk For Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome. *J Mol Diagn*. juill 2008;10(4):293 - 300.

55. Walsh MD, Buchanan DD, Pearson S-A, Clendenning M, Jenkins MA, Win AK, et al. Immunohistochemical testing of conventional adenomas for loss of expression of mismatch repair proteins in Lynch syndrome mutation carriers: a case series from the Australasian site of the colon cancer family registry. *Mod Pathol.* mai 2012;25(5):722 - 30.
56. Iino H, Simms L, Young J, Arnold J, Winship IM, Webb SI, et al. DNA microsatellite instability and mismatch repair protein loss in adenomas presenting in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gut.* 7 janv 2000;47(1):37 - 42.
57. Ligtenberg MJL, Kuiper RP, Chan TL, Goossens M, Hebeda KM, Voorendt M, 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.* janv 2009;41(1):112 - 7.
58. Casilli F, Rocco D, Christiana Z, Gad S, Tournier I, Stoppa-Lyonnet D, et al. Rapid detection of novel BRCA1 rearrangements in high-risk breast-ovarian cancer families using multiplex PCR of short fluorescent fragments. *Human Mutation.* 1 sept 2002;20(3):218 - 26.
59. Charbonnier F, Raux G, Wang Q, Drouot N, Cordier F, Limacher J-M, et al. Detection of Exon Deletions and Duplications of the Mismatch Repair Genes in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Families Using Multiplex Polymerase Chain Reaction of Short Fluorescent Fragments. *Cancer Res.* 1 juin 2000;60(11):2760 - 3.
60. Tournier I, Paillerets BB, Sobol H, Stoppa-Lyonnet D, Lidereau R, Barrois M, et al. Significant Contribution of Germline BRCA2 Rearrangements in Male Breast Cancer Families. *Cancer Res.* 15 nov 2004;64(22):8143 - 7.
61. Fiore FD, Charbonnier F, Martin C, Frerot S, Olschwang S, Wang Q, et al. Screening for genomic rearrangements of the MMR genes must be included in the routine diagnosis of HNPCC. *J Med Genet.* 1 janv 2004;41(1):18 - 20.
62. Charbonnier F, Baert-Desurmont S, Liang P, Di Fiore F, Martin C, Frerot S, et al. The 5' region of the MSH2 gene involved in hereditary non-polyposis colorectal cancer contains a high density of recombinogenic sequences. *Hum Mutat.* 1 sept 2005;26(3):255 - 61.
63. Charbonnier F, Olschwang S, Wang Q, Boisson C, Martin C, Buisine M-P, et al. MSH2 in Contrast to MLH1 and MSH6 Is Frequently Inactivated by Exonic and Promoter Rearrangements in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Cancer Res.* 1 févr 2002;62(3):848 - 53.
64. Lindblom A, Tannergård P, Werelius B, Nordenskjöld M. Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary non-polyposis colon cancer. *Nat Genet.* nov 1993;5(3):279 - 82.
65. Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH 1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature.* 17 mars 1994;368(6468):258 - 61.
66. Tannergård P, Zabarovsky E, Stanbridge E, Nordenskjöld M, Lindblom A. Sublocalization of a locus at 3p21.3-23 predisposing to hereditary nonpolyposis colon cancer. *Hum Genet.* août 1994;94(2):210 - 4.
67. Raevaara TE, Korhonen MK, Lohi H, Hampel H, Lynch E, Lönnqvist KE, et al.

Functional significance and clinical phenotype of nontruncating mismatch repair variants of MLH1. *Gastroenterology*. août 2005;129(2):537 - 49.

68. Gradia S, Acharya S, Fishel R. The Human Mismatch Recognition Complex hMSH2-hMSH6 Functions as a Novel Molecular Switch. *Cell*. 26 déc 1997;91(7):995 - 1005.

69. Peltomäki P, Aaltonen LA, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, et al. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science*. 7 mai 1993;260(5109):810 - 2.

70. Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell*. 17 déc 1993;75(6):1215 - 25.

71. Ollila S, Dermadi Bebek D, Jiricny J, Nyström M. Mechanisms of pathogenicity in human MSH2 missense mutants. *Hum Mutat*. nov 2008;29(11):1355 - 63.

72. Drummond JT, Li GM, Longley MJ, Modrich P. Isolation of an hMSH2-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells. *Science*. 30 juin 1995;268(5219):1909 - 12.

73. Papadopoulos N, Nicolaides NC, Liu B, Parsons R, Lengauer C, Palombo F, et al. Mutations of GTBP in genetically unstable cells. *Science*. 30 juin 1995;268(5219):1915 - 7.

74. Miyaki M, Konishi M, Tanaka K, Kikuchi-Yanoshita R, Muraoka M, Yasuno M, et al. Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet*. nov 1997;17(3):271 - 2.

75. Schmutte C, Marinescu RC, Copeland NG, Jenkins NA, Overhauser J, Fishel R. Refined Chromosomal Localization of the Mismatch Repair and Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Genes hMSH2 and hMSH6. *Cancer Res*. 15 nov 1998;58(22):5023 - 6.

76. Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Weit Y-F, Carter KC, Ruben SM, et al. Mutations of two P/WS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature*. 1 sept 1994;371(6492):75 - 80.

77. Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaides NC, Lynch HT, Watson P, et al. Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med*. févr 1996;2(2):169 - 74.

78. Joost P, Therkildsen C, Dominguez-Valentin M, Jönsson M, Nilbert M. Urinary Tract Cancer in Lynch Syndrome; Increased Risk in Carriers of MSH2 Mutations. *Urology*. 1 déc 2015;86(6):1212 - 7.

79. Aarnio M, Säily M, Juhola M, Gylling A, Peltomäki P, Järvinen HJ, et al. Uroepithelial and kidney carcinoma in Lynch syndrome. *Familial Cancer*. 4 avr 2012;11(3):395 - 401.

80. Chan TL, Yuen ST, Kong CK, Chan YW, Chan ASY, Ng WF, et al. Heritable germline epimutation of MSH2 in a family with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet*. oct 2006;38(10):1178 - 83.

81. Ligtenberg MJL, Kuiper RP, Chan TL, Goossens M, Hebeda KM, Voorendt M, 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*. janv 2009;41(1):112 - 7.

82. Kovacs ME, Papp J, Szentirmay Z, Otto S, Olah E. Deletions removing the last exon

of TACSTD1 constitute a distinct class of mutations predisposing to Lynch syndrome. *Hum Mutat.* févr 2009;30(2):197 - 203.

83. Senter L, Clendenning M, Sotamaa K, Hampel H, Green J, Potter JD, et al. The clinical phenotype of Lynch syndrome due to germ-line PMS2 mutations. *Gastroenterology.* août 2008;135(2):419 - 28.

84. Akiyama Y, Sato H, Yamada T, Nagasaki H, Tsuchiya A, Abe R, et al. Germ-line mutation of the hMSH6/GTBP gene in an atypical hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindred. *Cancer Res.* 15 sept 1997;57(18):3920 - 3.

85. Kolodner RD, Tytell JD, Schmeits JL, Kane MF, Gupta RD, Weger J, et al. Germ-line msh6 mutations in colorectal cancer families. *Cancer Res.* 15 oct 1999;59(20):5068 - 74.

86. Wijnen J, de Leeuw W, Vasen H, van der Klift H, Møller P, Stormorken A, et al. Familial endometrial cancer in female carriers of MSH6 germline mutations. *Nat Genet.* oct 1999;23(2):142 - 4.

87. Sheng J-Q, Zhang H, Ji M, Fu L, Mu H, Zhang M-Z, et al. Genetic diagnosis strategy of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 28 févr 2009;15(8):983 - 9.

88. Laiho P, Launonen V, Lahermo P, Esteller M, Guo M, Herman JG, et al. Low-level microsatellite instability in most colorectal carcinomas. *Cancer Res.* 15 févr 2002;62(4):1166 - 70.

89. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from Hereditary Colorectal Cancer. *Cell.* 18 oct 1996;87(2):159 - 70.

90. Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science.* 7 mai 1993;260(5109):812 - 6.

91. Brock JE, Hornick JL, Richardson AL, Dillon DA, Lester SC. A comparison of estrogen receptor SP1 and 1D5 monoclonal antibodies in routine clinical use reveals similar staining results. *Am J Clin Pathol.* sept 2009;132(3):396 - 401.

92. Kumarasinghe AP, de Boer B, Bateman AC, Kumarasinghe MP. DNA mismatch repair enzyme immunohistochemistry in colorectal cancer: a comparison of biopsy and resection material. *Pathology.* 2010;42(5):414 - 20.

93. Plénat F, Montagne K, Weinbreck N, Corby S, Champigneulle J, Antunes L, et al. [Molecular consequences of fixation and tissue processing: the examples of nucleic acids and proteins]. *Ann Pathol.* févr 2006;26(1):8 - 21.

94. Dapson RW. Macromolecular changes caused by formalin fixation and antigen retrieval. *Biotech Histochem.* juin 2007;82(3):133 - 40.

95. Cronin M, Pho M, Dutta D, Stephans JC, Shak S, Kiefer MC, et al. Measurement of gene expression in archival paraffin-embedded tissues: development and performance of a 92-gene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Am J Pathol.* janv 2004;164(1):35 - 42.

96. Godfrey TE, Kim SH, Chavira M, Ruff DW, Warren RS, Gray JW, et al. Quantitative mRNA expression analysis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using 5' nuclease quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Mol Diagn.* mai 2000;2(2):84 - 91.

97. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol.* déc 2002;161(6):1961 - 71.
98. Lehmann U, Kreipe H. Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. *Methods.* déc 2001;25(4):409 - 18.
99. van Maldegem F, de Wit M, Morsink F, Musler A, Weegenaar J, van Noesel CJM. Effects of processing delay, formalin fixation, and immunohistochemistry on RNA Recovery From Formalin-fixed Paraffin-embedded Tissue Sections. *Diagn Mol Pathol.* mars 2008;17(1):51 - 8.
100. Khoury T, Sait S, Hwang H, Chandrasekhar R, Wilding G, Tan D, et al. Delay to formalin fixation effect on breast biomarkers. *Mod Pathol.* nov 2009;22(11):1457 - 67.
101. Mangold E, Pagenstecher C, Friedl W, Mathiak M, Buettner R, Engel C, et al. Spectrum and frequencies of mutations in MSH2 and MLH1 identified in 1,721 German families suspected of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Int J Cancer.* 20 sept 2005;116(5):692 - 702.
102. Salahshor S, Koelble K, Rubio C, Lindblom A. Microsatellite Instability and hMLH1 and hMSH2 expression analysis in familial and sporadic colorectal cancer. *Lab Invest.* avr 2001;81(4):535 - 41.
103. Wahlberg SS, Schmeits J, Thomas G, Loda M, Garber J, Syngal S, et al. Evaluation of microsatellite instability and immunohistochemistry for the prediction of germ-line MSH2 and MLH1 mutations in hereditary nonpolyposis colon cancer families. *Cancer Res.* 15 juin 2002;62(12):3485 - 92.
104. Acharya S, Wilson T, Gradia S, Kane MF, Guerrette S, Marsischky GT, et al. hMSH2 forms specific mispair-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. *Proc Natl Acad Sci USA.* 26 nov 1996;93(24):13629 - 34.
105. Kadyrov FA, Dzantiev L, Constantin N, Modrich P. Endonucleolytic function of MutLalpha in human mismatch repair. *Cell.* 28 juill 2006;126(2):297 - 308.
106. Mensenkamp AR, Vogelaar IP, van Zelst-Stams WAG, Goossens M, Ouchene H, Hendriks-Cornelissen SJB, et al. Somatic mutations in MLH1 and MSH2 are a frequent cause of mismatch-repair deficiency in Lynch syndrome-like tumors. *Gastroenterology.* mars 2014;146(3):643 - 646.e8.
107. Garg K, Soslow RA. Endometrial carcinoma in women aged 40 years and younger. *Arch Pathol Lab Med.* mars 2014;138(3):335 - 42.
108. Hampel H. Screening for Lynch Syndrome (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer) among Endometrial Cancer Patients. *Cancer Research.* 1 août 2006;66(15):7810 - 7.
109. You J-F, Buhard O, Ligtenberg MJL, Kets CM, Niessen RC, Hofstra RMW, et al. Tumours with loss of MSH6 expression are MSI-H when screened with a pentaplex of five mononucleotide repeats. *Br J Cancer.* 7 déc 2010;103(12):1840 - 5.
110. Zhang L. Immunohistochemistry versus Microsatellite Instability Testing for Screening Colorectal Cancer Patients at Risk for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome. *J Mol Diagn.* juill 2008;10(4):301 - 7.
111. de Jong AE, van Puijenbroek M, Hendriks Y, Tops C, Wijnen J, Ausems MGEM, et al.

- Microsatellite instability, immunohistochemistry, and additional PMS2 staining in suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 1 févr 2004;10(3):972 - 80.
112. Rosty C, Clendenning M, Walsh MD, Eriksen SV, Southey MC, Winship IM, et al. Germline mutations in PMS2 and MLH1 in individuals with solitary loss of PMS2 expression in colorectal carcinomas from the Colon Cancer Family Registry Cohort. *BMJ Open.* 19 févr 2016;6(2):e010293.
113. Dudley B, Brand RE, Thull D, Bahary N, Nikiforova MN, Pai RK. Germline MLH1 Mutations Are Frequently Identified in Lynch Syndrome Patients With Colorectal and Endometrial Carcinoma Demonstrating Isolated Loss of PMS2 Immunohistochemical Expression. *Am J Surg Pathol.* août 2015;39(8):1114 - 20.
114. Yurgelun MB, Goel A, Hornick JL, Sen A, Turgeon DK, Ruffin MT, et al. Microsatellite Instability and DNA Mismatch Repair Protein Deficiency in Lynch Syndrome Colorectal Polyps. *Cancer Prev Res.* 4 janv 2012;5(4):574 - 82.
115. German HNPCC Consortium, Müller A, Beckmann C, Westphal G, Bocker Edmonston T, Friedrichs N, et al. Prevalence of the mismatch-repair-deficient phenotype in colonic adenomas arising in HNPCC patients: results of a 5-year follow-up study. *Int J Colorectal Dis.* oct 2006;21(7):632 - 41.
116. Ferreira S, Claro I, Lage P, Filipe B, Fonseca R, Sousa R, et al. Colorectal adenomas in young patients: microsatellite instability is not a useful marker to detect new cases of Lynch syndrome. *Dis Colon Rectum.* juin 2008;51(6):909 - 15.
117. Pino MS, Mino-Kenudson M, Wildemore BM, Ganguly A, Batten J, Sperduti I, et al. Deficient DNA mismatch repair is common in Lynch syndrome-associated colorectal adenomas. *J Mol Diagn.* mai 2009;11(3):238 - 47.
118. Hendriks YMC, Wagner A, Morreau H, Menko F, Stormorken A, Quehenberger F, et al. Cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer due to MSH6 mutations: impact on counseling and surveillance. *Gastroenterology.* juill 2004;127(1):17 - 25.
119. Bonadona V, Bonaïti B, Olschwang S, Grandjouan S, Huiart L, Longy M, et al. Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome. *JAMA.* 8 juin 2011;305(22):2304 - 10.
120. Berends MJW, Wu Y, Sijmons RH, Mensink RGJ, van der Sluis T, Hordijk-Hos JM, et al. Molecular and Clinical Characteristics of MSH6 Variants: An Analysis of 25 Index Carriers of a Germline Variant. *Am J Hum Genet.* janv 2002;70(1):26 - 37.
121. Joost P, Therkildsen C, Dominguez-Valentin M, Jönsson M, Nilbert M. Urinary Tract Cancer in Lynch Syndrome; Increased Risk in Carriers of MSH2 Mutations. *Urology.* déc 2015;86(6):1212 - 7.
122. Peltomäki P, Vasen H. Mutations Associated with HNPCC Predisposition — Update of ICG-HNPCC/INSiGHT Mutation Database. *Dis Markers.* 2004;20(4 - 5):269 - 76.
123. Southey MC, Jenkins MA, Mead L, Whitty J, Trivett M, Tesoriero AA, et al. Use of molecular tumor characteristics to prioritize mismatch repair gene testing in early-onset colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 20 sept 2005;23(27):6524 - 32.
124. Lagerstedt Robinson K, Liu T, Vandrovcova J, Halvarsson B, Clendenning M, Frebourg T, et al. Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer)

RESUME

INTRODUCTION : L'instabilité microsatellitaire (MSI) est le reflet d'une altération du système de réparation des mésappariements de l'ADN ou Mismatch Repair System (MMR), constitué principalement de 4 protéines : MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2. Une altération de ce système peut être constitutionnelle dans le syndrome de Lynch ou somatique par hyperméthylation du promoteur de MLH1. La recherche d'une déficience de ce système se fait par des techniques complémentaires de biologie moléculaire et d'immunohistochimie (IH). Dans le syndrome de Lynch, l'IH permet d'orienter les analyses génétiques constitutionnelles.

OBJECTIF : Etudier les discordances entre les analyses somatiques et génétiques constitutionnelles dans le cadre du syndrome de Lynch.

PATIENTS ET METHODES : Nous avons étudié rétrospectivement 20 patients porteurs d'une altération constitutionnelle délétère d'un des gènes du système MMR pour lesquels les analyses somatiques n'avaient pas été contributives ou discordantes. Nous avons renouvelé l'analyse en biologie moléculaire, l'IH des protéines MMR ou les deux en fonction des données initiales discordantes. Ces analyses ont été interprétées en double aveugle.

RESULTATS : La meilleure sensibilité des nouveaux anticorps ainsi que l'expérience du pathologiste a permis de reclasser 8 cas, en finalement non discordants. La mauvaise fixation tissulaire est la principale cause des cas non contributifs de notre cohorte (5/6). Elle se caractérise en immunohistochimie par une hétérogénéité du marquage nucléaire au sein de la tumeur et l'absence de témoin interne, et en biologie moléculaire par l'impossibilité d'amplifier les fragments de moins de 150pb. La majorité des cas confirmés comme discordants par le renouvellement des analyses somatiques avait un profil immunohistochimique incohérent avec la nature du gène MMR atteint (5/6). Seul un cas (1/6) porteur d'une mutation constitutionnelle d'un des gènes MMR avait un profil stable et une analyse immunohistochimique cohérente avec le gène MMR déficient au sein de l'adénome en dysplasie de bas grade (cas 18). Il existait une conservation de l'expression des protéines MMR associée à une instabilité microsatellitaire, pour deux cas porteurs d'une mutation faux sens, une portant sur le gène *MSH2* (c.2245G>A, p.Glu749Lys, ex14) et une sur le gène *MLH1* (c.1178 T>C, p.Leu393Pro, ex12). En présence d'une lésion tumorale infiltrante et d'une lésion adénomateuse, l'interprétation de l'immunomarquage n'est pas toujours évidente (cas 20).

CONCLUSION : Les discordances entre les analyses constitutionnelles et somatiques observées dans le syndrome de Lynch semblent souvent liées à un défaut de fixation des prélèvements. La qualité des anticorps utilisés en IH semble s'être améliorée au cours des dernières années et a permis une meilleure interprétation de certains cas. L'expertise du pathologiste dans l'interprétation des immunomarquages semble également jouer un rôle. Les analyses de biologie moléculaire et d'immunohistochimie sont complémentaires et doivent être réalisées de façon concomitante. Certaines mutations faux sens délétères ne s'accompagnent pas de perte d'expression protéique du fait de la conservation de l'immunogénicité de celle-ci malgré une fonction déficiente. Enfin, il existe quelques particularités liées à la nature de la lésion, notamment certains adénomes en dysplasie de bas grade et certains carcinomes endométrioïdes de phénotype stable avec une analyse immunohistochimique plus ou moins cohérente.

MOTS CLÉS :

Syndrome de Lynch, immunohistochimie, fixation, instabilité microsatellitaire, adénome dysplasie bas grade, adénome dysplasie haut grade

