



Université Lille 2
Droit et Santé

UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE - LILLE 2
FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG
Année : 2014

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN MEDECINE

**Mise en place d'un test fonctionnel pour évaluer les Variants de
Signification Inconnue des gènes *MLH1* et *MSH2* responsables du
syndrome de Lynch**

Présentée et soutenue publiquement le vendredi 20 juin à 14 heures
au Pôle Recherche

Par Catherine KAZMIERCZAK-VERMAUT

JURY

Président :

Madame le Professeur Sylvie MANOUVRIER

Assesseurs :

Madame le Professeur Nicole PORCHET

Madame le Docteur Marie-Pierre BUISINE

Madame le Docteur Sophie LEJEUNE

Monsieur le Docteur Stéphane CATTAN

Directeur de Thèse :

Madame le Docteur Marie-Pierre BUISINE

Avertissement

La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Liste des abréviations

CCR : cancer colorectal

IDL : *Insertion/Deletion Loop*

IHC : immunohistochimie

INCa : Institut National du Cancer

kDa : kilodalton

MMR : *Mismatch Repair*

MSI : *Microsatellite Instability*

MSS : *Microsatellite Stability*

NGS : *Next Generation Sequencing*

Pb : paire de base

UMD : *Universal Mutation Database*

VSI : Variant de Signification biologique et clinique Inconnue

WB : Western Blot

Table des matières

Introduction.....	1
I. Le syndrome de Lynch : Physiopathologie, présentation clinique et prise en charge	1
A. Généralités	1
B. Physiopathologie.....	2
1. Le système MMR	2
2. Mécanisme d'inactivation du système MMR dans le syndrome de Lynch ..	5
3. L'instabilité microsatellitaire : marqueur de l'inactivation du système MMR	6
C. Présentation clinique.....	7
D. Prise en charge	14
1. Recommandations de l'INCa	14
2. Suggestions du consortium européen.....	16
II. Stratégie diagnostique.....	17
A. Critères cliniques	17
B. Phénotype tumoral	19
1. Recherche d'une instabilité microsatellitaire.....	20
2. Analyse en immunohistochimie des protéines MMR.....	21
III. Génétique moléculaire	24
A. Place du diagnostic génétique.....	24
B. Les gènes MMR.....	25
C. Types et répartitions des mutations.....	27
D. Méthodes d'identification	30
E. Diagnostics différentiels	30
F. Problèmes des variants de Signification Clinique et Biologique Inconnue (VSI).....	31
1. Définition.....	31
2. Outils pour l'interprétation des VSI	33
IV. Objectif du travail	35
Matériels et Méthodes.....	36
I. Choix des mutations	36
II. Analyses <i>in silico</i>	37

III. Etude <i>ex vivo</i> de l'expression des variants	38
A. Obtention des constructions.....	40
1. Mutagenèse dirigée	40
2. Transformation bactérienne	41
3. Extraction d'ADN.....	41
4. Séquençage	42
B. Transfection cellulaire	42
1. Lignées cellulaires et conditions de culture.....	42
2. Transfection transitoire.....	43
C. Analyse par Western blot.....	44
1. Préparation du lysat protéique	44
2. Migration électrophorétique et transfert des protéines sur membrane	44
3. Immunomarquage et révélation	45
4. Interprétation.....	46
 Résultats.....	 48
I. Caractéristiques cliniques des patients porteurs de VSI et phénotypes tumoraux.....	51
II. Données concernant l'impact des variants sur l'épissage.....	52
III. Analyses <i>in silico</i> de l'effet des variants sur la protéine	52
A. Variants MLH1	53
B. Variants MSH2.....	53
IV. Analyses <i>ex vivo</i> de l'expression des protéines MMR mutées	54
A. Obtention des constructions	54
B. Etudes des contrôles	55
C. Etudes des VSI	57
1. Variants MLH1	57
2. Variants MSH2	58
 Discussion.....	 61
Conclusion	74
Références bibliographiques.....	75

Introduction

Le cancer est une maladie multifactorielle survenant généralement de manière sporadique et isolée, liée à une interaction entre facteurs environnementaux et facteurs héréditaires, même si dans la majorité des cas, la contribution de ces derniers est mineure (1). Depuis 2005, les études d'associations pangénomiques ont permis d'identifier des loci de susceptibilité au cancer à faible pénétrance, dont l'association pourrait augmenter de manière significative le risque de cancer, suggérant possiblement dans les années à venir la mise en place d'une surveillance appropriée (2)(3)(4).

Plus rarement, la pathologie tumorale revêt un caractère héréditaire avec une origine génétique clairement identifiée, notamment lorsqu'elle se présente sous la forme de tumeurs multiples dans une même famille ou chez un même individu, survenant de manière précoce, et appartenant à un spectre tumoral caractéristique. On parle alors de syndrome de prédisposition héréditaire au cancer. Parmi les plus fréquents, le syndrome de Lynch prédispose notamment au cancer colorectal (CCR) et au cancer de l'endomètre. Le dépistage spécifique de ce syndrome, son diagnostic, ainsi que sa prise en charge nécessitent une étroite collaboration entre généticiens, biologistes et spécialistes d'organes.

I. Le syndrome de Lynch : physiopathologie, présentation clinique et prise en charge

A. Généralités

Le syndrome de Lynch est la forme la plus fréquente des cancers colorectaux héréditaires. La prévalence dans la population générale est estimée entre 1/600 et 1/2000 (5). Ce syndrome, à transmission autosomique dominant, est causé par une mutation constitutionnelle d'un des quatre gènes appartenant au système de réparation des mésappariements de l'ADN ou MMR (*MisMatch Repair*) : *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* et *PMS2*.

Ce syndrome a été décrit la première fois en 1913 par l'anatomopathologiste Alfred Warthin, puis caractérisé en 1966 par Lynch, qui lui donnera son nom. En 1991,

l'International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC) énonce les critères d'Amsterdam, définissant ce syndrome sur le plan clinique.

Ce syndrome est associé à un risque accru de développer des CCR, avec la survenue fréquente de CCR multiples (CCR synchrones ou métachrones dans 35% des cas) et d'apparition précoce (45 ans en moyenne contre 63 ans pour les cancers sporadiques (6)(7)). De plus, des risques tumoraux extracoliques sont également reliés au syndrome de Lynch. Ils sont classiquement séparés en deux catégories selon le risque relatif de développer un cancer par rapport à la population générale. Le spectre étroit est associé à un risque relatif supérieur à 8 et possède une bonne valeur prédictive du syndrome de Lynch (valeur prédictive de l'existence d'une mutation constitutionnelle élevée). Il inclut, outre le CCR, les cancers de l'endomètre, des voies urinaires et de l'intestin grêle. Le spectre large, associé à un risque intermédiaire de développer un cancer (risque relatif entre 5 et 8), comprend les cancers de l'ovaire, des voies biliaires et de l'estomac. C'est la raison pour laquelle le terme ancien de syndrome HNPCC pour *Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer* est à éviter au profit du Syndrome de Lynch.

La manière d'aborder le diagnostic du syndrome de Lynch a beaucoup évolué ces 15 dernières années. Les outils actuels permettent, par l'analyse de la tumeur, d'améliorer le dépistage de ce syndrome et de guider les investigations pour l'identification de la mutation constitutionnelle responsable du syndrome. Finalement, l'identification d'une mutation délétère d'un gène MMR conduit au diagnostic formel de la maladie et amène à adapter la prise en charge du patient et de sa famille.

B. Physiopathologie

1. Le système MMR

La fidélité de la réplication de l'ADN est essentielle pour préserver l'intégrité du génome. On estime qu'à chaque division cellulaire, le taux d'erreur de réplication de

l'ADN Polymérase est d'environ une mutation toutes les 10^4 à 10^5 paires de bases (pb). Grâce au système de relecture de l'ADN polymérase, ce taux descend à une mutation toutes les 10^7 à 10^8 pb (8). Les erreurs de réplication ayant échappé à ce système de relecture sont alors corrigées par un système très efficace de réparation des mésappariements, qui contribue à abaisser le taux d'erreur de réplication à une mutation toutes les 10^{10} pb : **le système MMR**. Ce système, particulièrement conservé au cours de l'évolution, cible les mésappariements de nucléotides, mais également les petites boucles d'insertions/délétions (*Insertion Deletion Loops* ou IDL) qui résultent d'erreurs de réplication. Ainsi, l'inactivation du système MMR confère un phénotype mutateur qui se caractérise par un taux de mutations spontanées élevé.

Le système MMR a été très étudié chez la bactérie *Escherichia coli* et a pu être entièrement reconstitué *in vitro* à partir de protéines purifiées (9). La conservation de ce système a grandement contribué à définir le système MMR eucaryote où tous les orthologues des gènes bactériens ont pu être identifiés à l'exception du gène *MutH* (**Tableau 1**).

Protéine <i>E. coli</i>	Orthologue chez l'Homme	Fonction
MutS	MSH2-MSH6 (MutS α)	<u>Liaison aux mésappariements</u> Réparation des mésappariements nucléotidiques et des IDL ≤ 2 pb
	MSH2-MSH3 (MutS β)	Réparation des IDL >2 pb
MutL	MLH1-PMS2 (MutL α)	Recrutement des autres acteurs
	MLH1-MLH2 (MutL β)	Inconnue
	MLH1-MLH3 (MutL γ)	Suppression de quelques IDL et recombinaisons méiotiques
MutH	Aucun	Reconnaissance du brin fils et activité endonucléasique
β -Clamp	PCNA	Interaction avec MutS et MutL au niveau de la fourche de réplication
ExoI, ExoX	EXO1	Fonction Exonucléasique
DNA Pol III	DNA pol δ	Synthèse de l'ADN
DNA ligase	DNA ligase	Scelle la coupure après la synthèse de l'ADN

Tableau 1: Principaux acteurs impliqués dans la voie de réparation MMR chez *E. coli* et chez l'Homme (d'après (10)). IDL : boucles insertions-délétions.

Contrairement à *E. coli*, les eucaryotes possèdent plusieurs homologues de MutS et MutL, composés de deux sous-unités distinctes. Le choix des sous-unités est dicté par le substrat et la spécificité de la fonction. Par exemple, MutS α , constitué des sous-unités MSH2 et MSH6, cible les mésappariements de base et les IDL d'un à deux nucléotides, alors que MutS β , constitué des sous-unités MSH2 et MSH3, cible les IDL de plus de deux nucléotides (10). Chez l'Homme, le complexe MutS α est présent en quantité plus élevée que MutS β (11). La fonction des protéines MSH3 et MSH6 étant partiellement redondante, l'altération d'un des deux gènes correspondants est associée à un phénotype mutateur atténué (11).

Les trois sous-unités homologues de MutL, MLH3, PMS1 et PMS2, interagissent avec la même région de la protéine MLH1. Le composant majeur du système MMR est le complexe MutL α constitué de MLH1 et PMS2. Bien que PMS1 et MLH3 soient capable de se fixer sur MLH1 avec une haute affinité, leur rôle dans la réparation des mésappariements de l'ADN reste à démontrer. Comme MLH1 est le composant commun à ces trois hétérodimères, son altération entraîne un phénotype mutateur sévère, alors que la perte de la sous-unité PMS2, qui peut être partiellement compensée par MLH3, est associée à un phénotype atténué (10).

La première étape dans la correction des erreurs de réplication consiste en une efficace reconnaissance des mésappariements et des IDL au cours de la phase S de la réplication, réalisée par le complexe MutS (**Figure 1**). Cette étape nécessite la fixation d'une molécule d'ATP sur un domaine ATPase très conservé du complexe, permettant sa stabilisation vers une conformation de pince coulissante entourant l'ADN. Puis, le complexe MutS recrute l'hétérodimère MutL, agissant également de manière ATP dépendante. Celui-ci, à son tour, dirige la machinerie réparatrice, constituée notamment d'une exonucléase et de l'ADN Polymérase afin de dégrader et réparer le brin nouvellement synthétisé contenant le mésappariement.

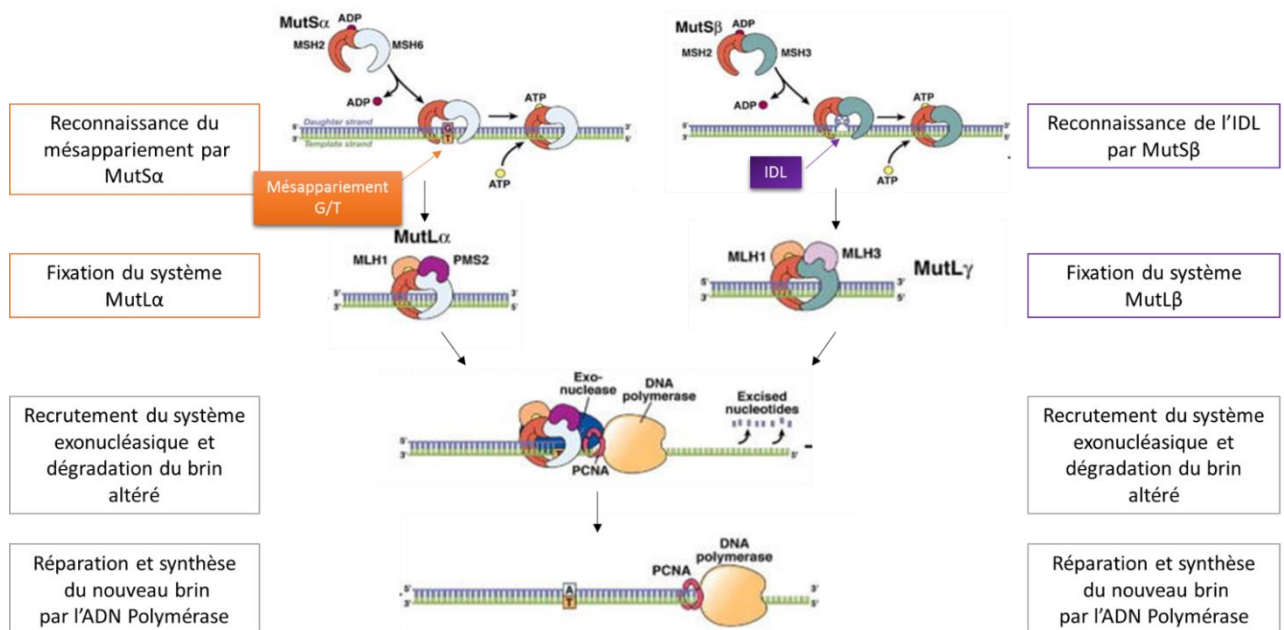


Figure 1 : Mode d'action du système MMR chez l'Homme. (D'après (12)) : Le système MMR fonctionne en plusieurs étapes : le complexe MutS α (MSH2 et MSH6) reconnaît les mésappariements de base et IDL de petite taille (≤ 2 nucléotides) et adopte une conformation de pince coulissante entourant l'ADN. Cette étape nécessite l'échange de l'ADP en ATP. Ce complexe est ensuite lié à MutL α (MLH1 et PMS2). Celui-ci interagit avec la protéine PCNA et l'Exonucléase 1 qui va dégrader le brin fils jusqu'au mésappariement. Finalement, le complexe se dissout quand la synthèse du nouveau brin par l'ADN Polymérase est effectuée. Selon le même principe, le complexe MutL β (MSH2-3) agit sur les IDL de plus grande taille (> 2 nucléotides).

Outre son rôle dans la réparation des mésappariements, le système MMR est également impliqué dans d'autres mécanismes. Par exemple, il prévient les recombinaisons homologues au cours de la mitose et de la méiose. Il est également impliqué dans la régulation du cycle cellulaire et le déclenchement des voies de transduction provoquant l'apoptose (13).

2. Mécanisme d'inactivation du système MMR dans le syndrome de Lynch

L'inactivation du système MMR est la conséquence de l'inactivation des deux allèles d'un gène MMR. Dans les cancers sporadiques, une inactivation bi-allélique d'un gène MMR se produit de façon aléatoire au sein d'une cellule d'un tissu cible. Dans le syndrome de Lynch, une inactivation constitutionnelle d'un allèle dans toutes les cellules de l'organisme (par mutation ponctuelle inactivatrice, réarrangement génomique ou épimutation) est suivie

d'une mutation somatique du second allèle dans une cellule d'un tissu cible (par perte d'allèle, mutation ponctuelle inactivatrice ou hyperméthylation du promoteur).

3. L'instabilité microsatellitaire : marqueur de l'inactivation du système MMR

Une des caractéristiques majeures du syndrome de Lynch est la présence dans les tumeurs d'une instabilité microsatellitaire. Les microsatellites sont des séquences d'ADN constituées de motifs de 1 à 5 pb répétées en tandem. Ces séquences sont réparties sur l'ensemble du génome et font l'objet d'un polymorphisme inter-individuel (nombres variables de répétitions). Les microsatellites sont particulièrement sujets aux erreurs de réplication, ceci se traduisant lors de défaut du système MMR, par des altérations du nombre de répétitions nucléotidiques au sein d'un même tissu. Ces insertions ou délétions de quelques nucléotides définissent l'instabilité microsatellitaire (**Figure 2**).

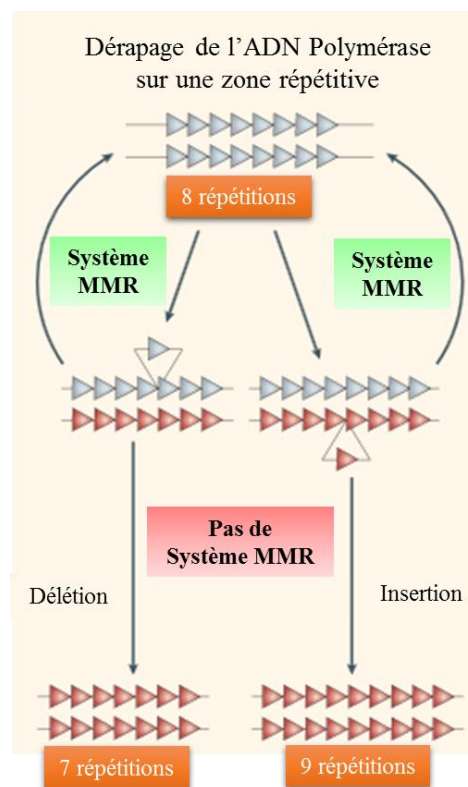


Figure 2 : Mécanismes de l'instabilité microsatellitaire. D'après (14)
L'ADN Polymérase dérape plus fréquemment au niveau de séquences répétées, créant temporairement des boucles d'insertions ou de délétions. Lors de la réplication suivante, en l'absence d'un système MMR efficace, il en résulte un raccourcissement ou une élévation de la séquence.

La plupart des microsatellites sont situés dans des régions non codantes de l'ADN et une mutation de ces séquences aura généralement peu de conséquences pour la cellule. Cependant, on estime qu'environ 20 % des gènes humains possèdent des microsatellites dans leur région codante et sont potentiellement sujets à des mutations (15). Parmi eux, certains sont impliqués dans la régulation de la croissance cellulaire (comme le gène *TGFβR2*), l'apoptose (comme le gène *BAX*) ou la réparation de l'ADN. Une mutation aboutira donc à une altération de la fonction protéique contribuant ainsi à la cancérogenèse. La recherche dans les tumeurs du spectre d'une instabilité microsatellitaire est très utile pour le dépistage du syndrome de Lynch, car elle constitue un excellent marqueur de déficience des gènes MMR.

C. Présentation clinique

Le syndrome de Lynch se caractérise par une susceptibilité accrue au cancer pouvant toucher divers organes. Les risques cumulés des cancers du spectre du syndrome de Lynch, comparés aux risques dans la population générale, ainsi que l'âge moyen de découverte sont résumés dans le **Tableau 2**.

Type cancer	Risque population générale	Risque syndrome de Lynch	Age médian de découverte
Côlon	5,5 %	35 % (30-60)	45 ans (15-95)
Endomètre	2,7 %	34 % (17-60)	49 ans (26-87)
Estomac	<1 %	0,7 % (0,08-4,4)	52 ans (24-81)
Ovaire	1,6 %	8 % (2-39)	44 ans (20-58)
Voies biliaires	<1%	0,6 % (0,07-2,5)	54 ans (28-97)
Voies urinaires	<1 %	1,9 % (0,3-5,3)	55 ans (30-82)
Intestin grêle	<1 %	0,6 % (0,1-1,3)	51 ans (29-71)

Tableau 2 : Risques cumulés à 70 ans de survenue des différents cancers dans le syndrome de Lynch, comparés avec la population générale. L'âge médian de découverte dans le syndrome de Lynch est également indiqué (d'après (16),(17)). Entre parenthèses : intervalle de confiance à 95%.

Le risque majeur associé au syndrome de Lynch est le risque de CCR avec un risque cumulé à 70 ans évalué à 35 % (16). Il représente 2 à 5 % de l'ensemble des CCR. Les premières études affichaient des risques cumulés de l'ordre de 80 % (18). Depuis, ce taux a été reconsidéré à la baisse, les études plus récentes visant à minimiser les effets des biais de recrutement, liés notamment à une inclusion basée sur des critères cliniques d'agrégation familiale. Le risque cumulé à 70 ans de CCR est plus élevé chez l'homme que chez la femme, comme pour le cancer sporadique (compris entre 27 et 45 % pour l'homme et entre 22 et 38 % chez la femme) (19).

Des corrélations génotype-phénotype ont été décrites, ainsi que des particularités histologiques par rapport aux cancers sporadiques. En effet, le risque cumulé concernant les patients porteurs de mutations *MLH1* ou *MSH2* est de l'ordre de 50 %, alors qu'il est d'environ 22 % pour *MSH6* et compris entre 15 et 20 % pour le gène *PMS2* (20) (16). La moyenne d'âge au diagnostic est de 38,5 ans pour *MLH1*, 43,8 ans pour *MSH2*, alors qu'il est de 49 ans pour le gène *MSH6* et 59 ans pour le gène *PMS2* (21). La pénétrance est généralement moins élevée pour *PMS2*, mais l'âge de découverte peut parfois être similaire à celle observée chez les patients porteurs de mutations dans un autre gène MMR, avec des cas décrit à 30 ans (20). Les CCR isolés, sans histoire familiale apparente, semblent plus souvent liés à des mutations des gènes *PMS2* ou *MSH6*. Cependant, il est difficile de conclure pour ces deux gènes, car les études concernant leurs risques tumoraux sont généralement réalisées sur des petites cohortes (22).

Dans deux tiers des cas, le CCR est situé au niveau du côlon proximal, à l'inverse des cancers sporadiques (23). Les cancers rectaux sont plus volontiers rencontrés chez les patients atteints de mutations *MSH6* (24). Sur le plan histologique, on observe généralement une faible différenciation, un stroma lymphocytaire dit *Crohn-like* ; ils sont fréquemment mucineux, cribiformes ou à cellules indépendantes en bague à chaton (14). Le risque élevé de CCR dans le syndrome de Lynch n'est pas tant lié à l'initiation de la cancérogenèse qu'à une

accélération de la séquence adénome-carcinome. Dans le syndrome de Lynch, un adénome peut se transformer en adénocarcinome en l'espace de 2 à 3 ans, contre 8 à 10 ans chez une personne de la population générale, justifiant la recommandation d'une coloscopie tous les 2 ans (**Figure 3**) (6) (25). Généralement, les adénomes se présentent à un âge précoce, ont une composante villeuse et sont découverts au stade de dysplasie de haut grade (26).

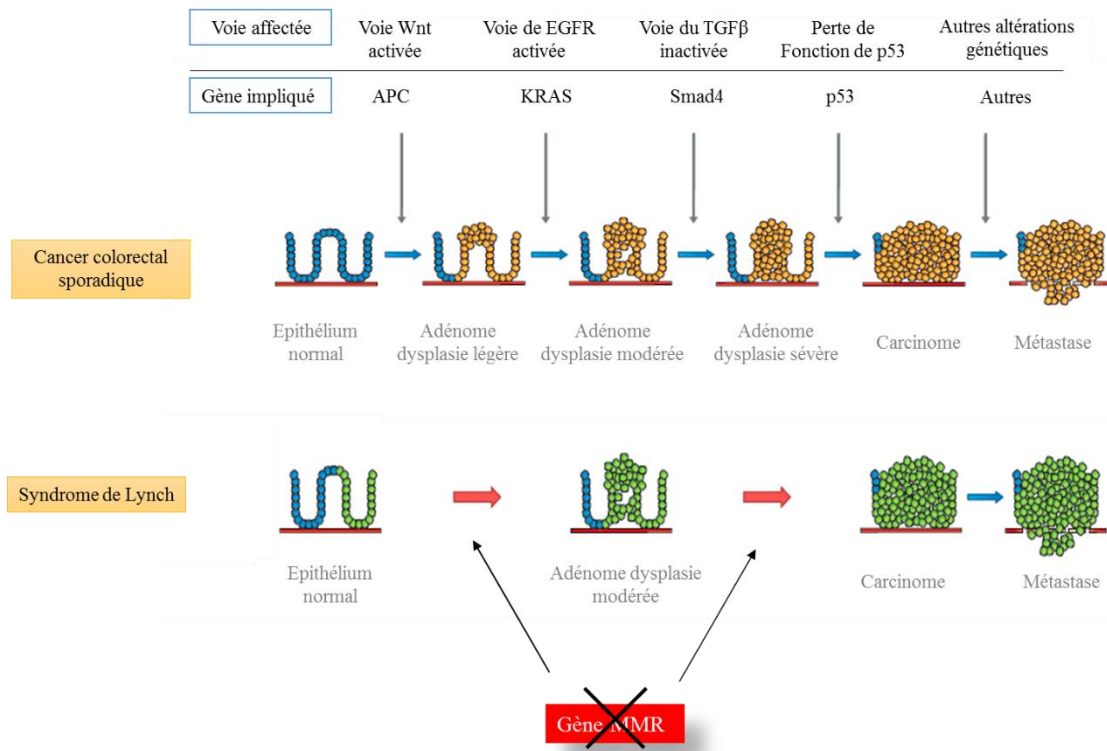


Figure 3 : Carcinogénèse colorectale : processus biologico-pathologique au cours du cancer sporadique et du syndrome de Lynch. L'accumulation de mutations au sein de gènes associés à la cancérogenèse colorectale contribue à l'accélération du processus néoplasique au cours du syndrome de Lynch. D'après (27).

Les CCR associés au syndrome de Lynch sont généralement de meilleur pronostic que les CCR sporadiques, indépendamment du stade de la maladie (28).

Le **cancer de l'endomètre** est le 2^{ème} cancer le plus fréquent dans le syndrome de Lynch. Lorsqu'il est associé à un CCR, il le précède dans la moitié des cas (29). Le syndrome de Lynch explique 2 % de l'ensemble des cancers de l'endomètre (30). Le risque cumulé à 70 ans est d'environ 34 %. La moyenne d'âge de découverte est environ de 50 ans, soit 10 ans avant les cas sporadiques, et est rarement rencontré avant l'âge de 40 ans (19). Pour une

femme, le risque de développer un cancer de l'endomètre est sensiblement supérieur à celui de développer un CCR (compris entre 33% pour l'endomètre *versus* 31 % pour le CCR (16)). Il n'y a pas de caractéristiques anatomopathologiques spécifiques du cancer de l'endomètre développé au cours du syndrome de Lynch (31). Comme pour les cancers sporadiques, le type histologique le plus représenté est le type endométrioïde. Au cours du développement des cancers de l'endomètre sporadiques, seule l'hyperplasie glandulaire avec atypie est considérée comme une lésion précancéreuse des adénocarcinomes de type endométrioïde. Au cours du syndrome de Lynch, à la fois l'hyperplasie complexe avec atypie ou l'hyperplasie sans atypie peuvent être associées aux lésions précancéreuses de cancer de l'endomètre (18). Dans 40 % des cas, on n'observe pas de lésions précancéreuses à type d'hyperplasie. Le pronostic du cancer de l'endomètre est relativement bon, avec un taux de survie à 10 ans de 80 % (18).

Le risque cumulé à 70 ans du *cancer de l'ovaire* est d'environ 8 % (16). Il est diagnostiqué chez des femmes de moins de 35 ans dans 30 % des cas. Le risque serait plus élevé chez les patients porteurs d'une mutation du gène *MSH2* (16). Comme pour les tumeurs ovariennes sporadiques, les tumeurs épithéliales sont les plus fréquemment rencontrées dans le syndrome de Lynch. La répartition des sous-types histologiques est cependant différente, avec une prévalence augmentée des tumeurs de type endométrioïdes, suivies des adénocarcinomes à cellules claires et plus rarement des tumeurs mucineuses, dans le syndrome de Lynch alors que les cancers sporadiques sont représentés principalement par les tumeurs de type séreux. Des lésions frontières ou « *bordeline* » ont également été décrites. Dans 20 % des cas, un cancer endométrial synchrone est diagnostiqué (32). La plupart des cas sont diagnostiqués à un stade précoce (84 % stade 1 ou 2 de FIGO (*Federation of Gynecology and Obstetrics*)) et donc le pronostic global est meilleur que celui des cancers sporadiques, probablement en lien avec des mécanismes moléculaires différents (33).

Le risque cumulé de **cancer urothélial** est de l'ordre de 1,9 % (16). Il est généralement diagnostiqué vers 55 ans, soit 10 à 15 ans avant les cancers sporadiques. Les mutations du gène *MSH2* sont plus souvent impliquées. Contrairement aux formes sporadiques, les tumeurs urothéliales siègent le plus souvent au niveau des voies excrétrices supérieures (66%), mais il existe également un risque plus important de tumeurs vésicales (34)(35). Le type histologique le plus rencontré est le carcinome à cellules transitionnelles de l'uretère et du bassin.

Le risque cumulé à 70 ans de **cancer de l'estomac** est d'environ 0,7 % (16). Il affiche une prévalence plus élevée dans les pays où d'autres facteurs de risque sont surreprésentés, comme l'infection par *Helicobacter pylori*. Il est rarement diagnostiqué avant 40 ans. Le type histologique le plus rencontré est l'adénocarcinome de type intestinal (73 à 79 % des cas (18)), contrairement aux cancers gastriques causés par des mutations du gène *CDH1* (*MIM* *192090) qui sont de type diffus à cellules indépendantes. Néanmoins, il ne faut pas exclure un syndrome de Lynch devant un cancer gastrique de type diffus (20 % des cas).

Le risque cumulé des autres tumeurs du spectre est faible, de l'ordre de 3 % (16). Cependant, les risques relatifs sont très élevés par rapport à celui de la population générale, notamment pour le cancer de l'intestin grêle. En effet, la plupart des cancers de **l'intestin grêle** se développent dans le cadre du syndrome de Lynch, faisant de ce cancer un bon marqueur prédictif de syndrome de Lynch. Il est plus fréquemment rencontré chez homme et est rarement associé aux mutations du gène *MSH6* (18). Il est plus fréquemment localisé au niveau du duodénum, puis au niveau du jéjunum et enfin au niveau de l'iléon (respectivement 43 %, 33 % et 7 % des cas) (36). Le risque cumulé du **cancer des voies biliaires** est de l'ordre de 0,6 %. Ces cancers ne présentent pas de particularités par rapport aux cancers sporadiques.

Enfin, certaines tumeurs font l'objet de controverses, justifiant qu'elles ne fassent pas partie du spectre classique. Il s'agit notamment des cancers du sein, du pancréas et de la prostate.

Les études sur le risque de cancer du sein sont généralement rétrospectives et discordantes. Une seule étude prospective a montré une incidence plus élevée de cancer du sein chez les patientes atteintes du syndrome de Lynch, notamment après l'âge de 40 ans (37). Dans 50% des cas, la tumeur présentait une instabilité microsatellitaire, ainsi que des caractéristiques histologiques similaires au CCR (réaction lymphocytaire péri-tumorale, faible différenciation) et des récepteurs hormonaux négatifs (38).

Le cancer du pancréas est associé à un risque relatif de l'ordre de 8 par rapport à la population générale, avec un risque cumulé de l'ordre de 3,7 %. Il serait le plus souvent de type médullaire, faiblement différencié avec un infiltrat lymphocytaire. La mise en évidence d'une instabilité microsatellitaire est rare (39)(40).

D'autre part, des études ont mis en évidence un RR de cancer de la prostate chez les patients atteints du syndrome de Lynch plus élevé, notamment chez des patients porteurs d'une mutation du gène *MSH2*. La présence d'une instabilité microsatellitaire était aléatoire et l'âge au diagnostic était supérieur à 60 ans (35).

Des études prospectives indépendantes sont nécessaires afin de déterminer l'implication de ces types tumoraux dans le syndrome de Lynch.

Le syndrome de Muir-Torre (OMIM #158320) est un variant du syndrome de Lynch associant des lésions dermatologiques de type adénomes sébacés, carcinomes sébacés, kératoacanthomes (**Figure 4**) et tumeurs viscérales. Dans un quart des cas, ces lésions dermatologiques précèdent les manifestations viscérales. Les mutations du gène *MSH2* sont le plus souvent rencontrées. La recherche d'une déficience du système MMR de manière

systématique au niveau de ces lésions dermatologiques peut permettre de détecter un syndrome de Lynch (41).



Figure 4 : Le **kératoacanthome** est une tumeur épithéliale qui se développe aux dépens d'un follicule pilo-sébacé. Il se caractérise par une apparition brutale puis une croissance rapide et une régression spontanée en passant par différents stades morphologiques et évolutifs. *Atlas de Dermatologie*

Le syndrome de Turcot (OMIM #276300) est un autre variant du syndrome de Lynch défini par l'association d'un cancer colorectal ou d'adénomes colorectaux avec une tumeur du système nerveux central, liée à une mutation d'un gène MMR, notamment du gène *PMS2*. La tumeur du système nerveux central la plus fréquemment rencontrée est le glioblastome à cellules géantes et astrocytomes anaplasiques, de pronostic sombre et diagnostiqué précocement (souvent dans la deuxième décennie). Il peut être inaugural ou être mis en évidence en même temps que les signes digestifs (42). Une autre forme de ce syndrome associant des tumeurs de type médulloblastome et nombreux polypes est liée à des mutations du gène *APC*, responsable de Polypose Adénomateuse Familiale.

Les gènes MMR sont également impliqués dans un autre syndrome, appelé syndrome de déficit constitutionnel du système MMR ou **Constitutional Mismatch Repair Deficiency** (CMMR-D), secondaire à des mutations bialléliques (*PMS2* dans 60% des cas, *MSH6* 20%). Le spectre des cancers observés diffère du syndrome de Lynch, ainsi que l'âge de diagnostic (43). En effet, ce syndrome est principalement caractérisé par le développement de cancers pédiatriques à type de tumeurs cérébrales (glioblastome, médulloblastome, moyenne d'âge comprise entre 7 et 9 ans, principale cause de mortalité), de tumeurs du tractus digestifs (adénomes colorectaux dont le nombre peut être élevé, CCR, moyenne d'âge : 16,4 ans et tumeur de l'intestin grêle, surtout duodénum, moyenne d'âge : 25 ans) et de

tumeurs hématologiques (lymphome non hodgkin à cellules T, leucémie aiguë lymphoblastique, moyenne d'âge : 5 ans). De rares cas de tumeurs de l'endomètre et des voies urinaires ont également été décrits.

Des signes de neurofibromatose, tels que des taches café au lait sont très souvent associés à ce syndrome. Enfin, des taches cutanées hypopigmentées et des malformations congénitales sont également observées.

Un consortium européen, en 2013, a essayé de définir des modalités de surveillance, bien que la valeur de celles-ci ne soit pas connue (43).

D. Prise en charge

L'identification d'un syndrome de Lynch a peu d'impact sur le traitement initial du cancer. A l'inverse, elle influe considérablement sur la surveillance à long terme des patients et permet le dépistage des apparentés.

1. Recommandations de l'INCa

Un groupe d'expert français mandaté par l'INCa (Institut National du Cancer) a publié en 2009 des recommandations de prise en charge du syndrome de Lynch, qui reposent sur des publications internationales (44). Compte tenu du niveau de risque absolu des différents cancers, seules les localisations colorectales et endométriales relèvent d'un dépistage systématique.

✓ Cancer colorectal

La surveillance coloscopique est la seule dont les recommandations soient fortes, venant d'études bien conduites dans une population représentative (45). Elle repose sur une coloscopie totale, réalisée dans des conditions optimales, avec chromoendoscopie à l'indigo-carmin avec résection des polypes précancéreux (46). Elle doit être renouvelée tous les deux

ans, dès l'âge de 20-25 ans, le risque de développer un CCR avant 25 ans étant très faible (47). Comme la coloscopie est une mesure préventive efficace, on ne recommande pas de colectomie prophylactique.

Quand un CCR est avéré, deux options chirurgicales sont possibles : la colectomie subtotala avec anastomose iléo-rectale ou la colectomie segmentaire. La première option est particulièrement recommandée chez le sujet jeune, en raison d'un risque important de cancer métachrone. En effet, le risque de second CCR après 10 ans est évalué à 16 % (47). Ce risque élevé impose la mise en place d'une surveillance du segment digestif restant après le traitement d'un premier cancer. Cependant, dans la majorité des cas, le syndrome de Lynch est diagnostiqué après la chirurgie digestive.

✓ Cancers de l'endomètre et de l'ovaire

La surveillance endométriale est basée au minimum sur l'échographie endovaginale à réaliser tous les deux ans, à partir de l'âge de 30 ans. De plus, il est préconisé que le gynécologue réalise un prélèvement endométrial, de préférence par Pipelle de Cornier. Il est préconisé de surveiller les ovaires lors de cette échographie. En cas de dysplasie avérée, l'hystérectomie doit être réalisée (48). L'indication d'une hystérectomie et d'une annexectomie prophylactique est une option qui doit systématiquement être évoquée avec les patientes et après accomplissement du projet parental (47), (46). Il est recommandé de réaliser une hystérectomie plutôt qu'un traitement conservateur en cas de chirurgie utérine (pour fibrome par exemple) ou en cas d'indication à une chirurgie ovarienne (46)

✓ Autres cancers

Compte tenu des niveaux de risque et de l'absence de modalités consensuelles, aucune prise en charge n'est actuellement proposée pour les autres cancers du spectre (48). Il est néanmoins préconisé de coupler à la première coloscopie une fibroscopie, afin de rechercher

une éventuelle infection à *H.Pylori*, et de procéder le cas échéant à son éradication. La réalisation d'une fibroscopie tous les 2 ans a été préconisée, mais n'a pas permis une réduction de l'incidence de ce cancer (19).

2. Suggestions du consortium européen

Un groupe d'experts européens se réunit ponctuellement (en 2007 (47), puis 2013 (18)) afin d'examiner les mises à jour concernant la littérature du syndrome de Lynch. Il donne des pistes de réflexion et suggère des recommandations pour améliorer la prise en charge des patients.

Concernant la surveillance coloscopique chez les patients porteurs de mutations du gène *MSH6* et *PMS2*, il a ainsi été suggéré que l'âge de la première coloscopie pourrait être décalé à 30-35 ans, mais des études prospectives sont nécessaires pour le confirmer (19).

Par ailleurs, le groupe préconise une surveillance urologique par échographie rénale et cytologie urinaire chez les patients avec une histoire familiale de cancer urothélial, et notamment chez les patients porteurs de mutations *MSH2*. Cependant, la sensibilité de cette surveillance n'excédant pas 30 %, aucune recommandation n'est actuellement validée (18) (19).

Enfin, bien que le mécanisme d'action ne soit pas élucidé, le rôle de l'aspirine dans la réduction du risque de CCR a été montré dans de nombreuses études (49). Une d'entre elles s'est intéressée à ce traitement préventif au cours du syndrome de Lynch. Ainsi, une prise quotidienne d'aspirine sur une période d'au moins deux ans réduirait d'environ 60 % le risque de développer un CCR. Le résultat est détectable environ 5 ans après le début de la prise, même si le traitement a été interrompu (50). En l'absence de consensus, concernant notamment la dose optimale, la prise d'aspirine ne fait actuellement pas l'objet de recommandations spécifiques.

Une surveillance coloscopique adaptée prévient la survenue de la moitié des CCR et réduit le taux de mortalité globale de 65 %, grâce à un traitement précoce des lésions précancéreuses (51). Les recommandations spécifiques de prise en charge ont fait preuve d'une réduction quasi complète de la mortalité liée au syndrome de Lynch (52). Ainsi, le dépistage du syndrome de Lynch, puis l'établissement du diagnostic par l'identification d'une mutation délétère d'un gène MMR sont primordiaux afin de pouvoir proposer une surveillance adaptée.

II. Stratégie diagnostique

Initialement, le syndrome de Lynch était identifié exclusivement sur la base de l'âge de découverte du cancer et sur les caractéristiques de l'histoire familiale. Aujourd'hui, des tests de dépistage peu coûteux, efficaces et rapides réalisés sur la tumeur permettent de guider l'indication de l'analyse génétique.

A. Critères cliniques

Les critères d'Amsterdam I, énoncés en 1991, visaient à définir les critères diagnostiques cliniques du syndrome de Lynch afin d'uniformiser des études multicentriques.

Critères d'Amsterdam I

- ✓ **Au moins trois membres de la famille atteints de cancer du côlon, dont un apparenté au premier degré par rapport aux autres**
- ✓ **Deux générations atteintes**
- ✓ **Un des cancers diagnostiqué avant l'âge de 50 ans**
- ✓ **Absence de polypose colique dans la famille**

Ces critères, prenant en compte uniquement les CCR, ont ensuite été élargis afin d'inclure les tumeurs extracoliques.

Critères d'Amsterdam II

- ✓ **Au moins trois membres de la famille atteints de cancer du spectre, dont un apparenté au premier degré par rapport aux autres**
- ✓ **Deux générations atteintes**
- ✓ **Un des cancers diagnostiqué avant l'âge de 50 ans**
- ✓ **Absence de polypose colique dans la famille**

Environ la moitié des familles présentant un syndrome de Lynch ne répondent pas aux critères d'Amsterdam (47). La sensibilité pour les critères d'Amsterdam II a été évaluée à 72 %, et à 61 % pour les critères d'Amsterdam I. En effet, les critères d'Amsterdam présentent des limites notamment dans les petites familles. De plus, ils ne prennent pas en compte une agrégation de cancers chez une même personne, à un âge jeune.

Pour améliorer la sensibilité de détection des patients atteints d'un syndrome de Lynch parmi la population générale, les critères de Bethesda, ont été énoncés en 1997, puis révisés en 2004 (53). Ils correspondent à un ensemble de situations cliniques dans lesquelles la recherche d'une instabilité microsatellitaire est recommandée. Les critères de Bethesda permettent ainsi d'obtenir une sensibilité pouvant atteindre 94 %.

Critères de Bethesda

- ✓ **Cancer colorectal avant 50 ans**
- ✓ **Deux tumeurs du spectre large, synchrones ou métachrones, chez un même patient quel que soit l'âge**
- ✓ **Cancer colorectal avec histologie évocatrice, diagnostiqué avant 60 ans**
- ✓ **Deux cancers du spectre large chez 2 apparentés au premier degré, dont l'un à moins de 50 ans**
- ✓ **Trois cancers du spectre large chez 3 apparentés au premier ou second degré, quel que soit l'âge**

Les critères de Bethesda incluent les CCR de moins de 50 ans. Néanmoins, une attention particulière doit être portée aux patients entre 50 et 60 ans devant des critères

histologiques évocateurs. En effet, 10% des CCR ne répondant pas aux critères de Bethesda sont les patients entre 50 et 60 ans. En France, les indications de la recherche d'instabilité microsatellitaire ont été élargies afin d'optimiser la stratégie diagnostique du syndrome de Lynch : elle est recommandée pour tout cancer colorectal ou du spectre (endomètre, intestin grêle, urothélium, voies biliaires, estomac, ovaire) diagnostiqué à un âge inférieur à 60 ans ou quel que soit l'âge au diagnostic chez un individu dont un apparenté au premier degré a été atteint d'un cancer colorectal ou du spectre (44)(46). De nouvelles recommandations internationales évoquent la possibilité de cribler tous les CCR diagnostiqués avant l'âge de 70 ans (18).

B. Phénotype tumoral

L'étude du phénotype tumoral a pour but de dépister un syndrome de Lynch et d'aider à l'identification du gène impliqué dans la maladie. Deux techniques complémentaires sont utilisées :

- la recherche d'instabilité microsatellitaire ou MSI (*Microsatellite Instability*) (autrefois appelé RER pour Replication ERror), qui est un indicateur de la fonctionnalité du système MMR.
- l'immunohistochimie (IHC) des protéines MMR.

Ces analyses nécessitent une collaboration étroite entre laboratoire d'anatomopathologie et de biologie moléculaire qui a été favorisée par la mise en place en 2006 grâce à l'INCa des plateformes de génétique des cancers. Ces analyses sont réalisées le plus souvent à partir de tissus fixés au formol et inclus en paraffine. Il est indispensable, pour garantir la fiabilité de l'examen, de sélectionner une zone riche en cellules tumorales.

1. Recherche d'une instabilité microsatellitaire

La recherche d'instabilité microsatellitaire est basée sur la physiopathologie du syndrome de Lynch, caractérisée un défaut de la réparation de l'ADN. Celui-ci se traduit par une accumulation de mutations dans l'ADN, survenant préférentiellement au sein de microsatellites. Le principe consiste à détecter la présence de longueurs de répétition différentes dans les cellules tumorales par rapport au tissu normal (**Figure 5**).

En 1997, le National Cancer Institute a proposé un panel de référence pour la détection de MSI, constitué de 2 marqueurs mononucléotidiques et de trois marqueurs dinucléotidiques. Cependant, ce panel n'étant pas très sensible, d'autres panels ont été proposés afin d'optimiser la détection de l'instabilité microsatellitaire, à l'aide notamment de marqueurs mononucléotidiques, plus sensibles que les marqueurs dinucléotidiques (54) (55).

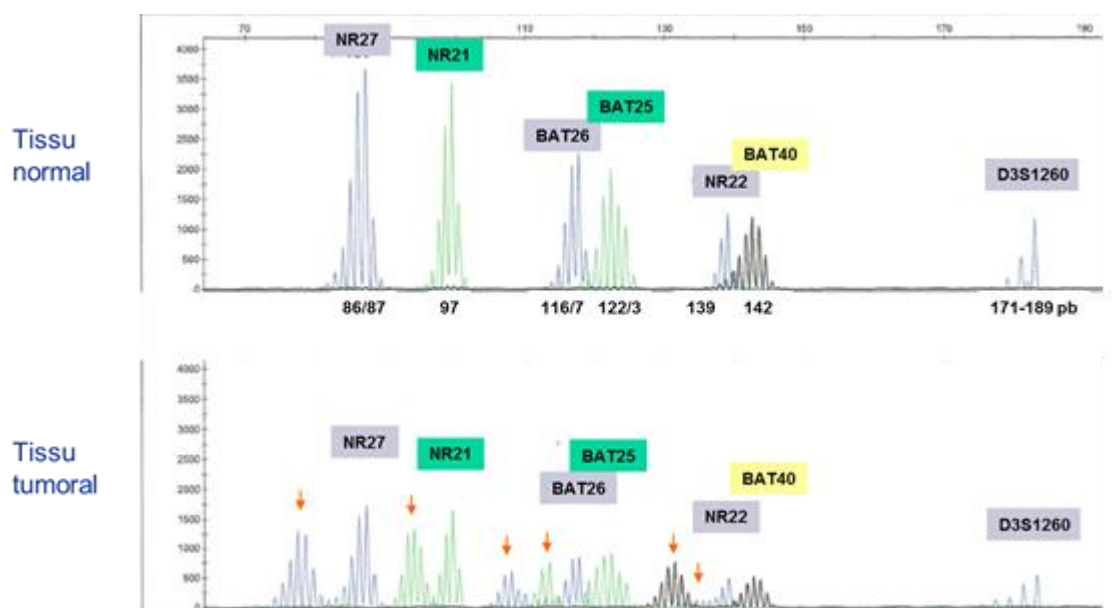


Figure 5 : Exemple d'un profil d'une tumeur MSI. La recherche d'une instabilité microsatellitaire est mise en évidence par la comparaison de taille des produits d'amplification par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) obtenus à partir de l'ADN tumoral (en bas) et de l'ADN non tumoral (en haut) du même patient. Le phénotype MSI se traduit par l'apparition dans la tumeur d'allèles différents (flèches oranges) n'existant pas dans le tissu non tumoral du patient (généralement de taille plus petite traduisant la présence de délétions)

Il est à noter qu'outre le dépistage du syndrome de Lynch, la recherche d'instabilité microsatellitaire est également réalisée chez les personnes avec un CCR de stade II pour orienter la prise en charge thérapeutique. En effet, les tumeurs MSI ont un risque de récurrence

moindre et un meilleur pronostic que les tumeurs MSS et il n'a pas été observé de bénéfice d'un traitement adjuvant à base de 5 FU pour les patients atteints de CCR de stade II ou III, dont la tumeur était MSI (56).

2. Analyse en immunohistochimie des protéines MMR

L'analyse immunohistochimique a pour but de détecter une perte d'expression des protéines altérées du système MMR dans les cellules tumorales (**Figure 6**). Une anomalie des protéines MLH1 ou MSH2 entraîne également une perte de la stabilité de la sous-unité partenaire conduisant à la perte d'expression simultanée des protéines PMS2 et MSH6 respectivement. En revanche, une perte d'expression des protéines PMS2 ou MSH6 peut être isolée, en raison de la redondance du système MMR. La sensibilité et la spécificité de l'analyse immunohistochimique sont excellentes et cette technique permet d'indiquer la protéine défectueuse et d'orienter ainsi les analyses génétiques.

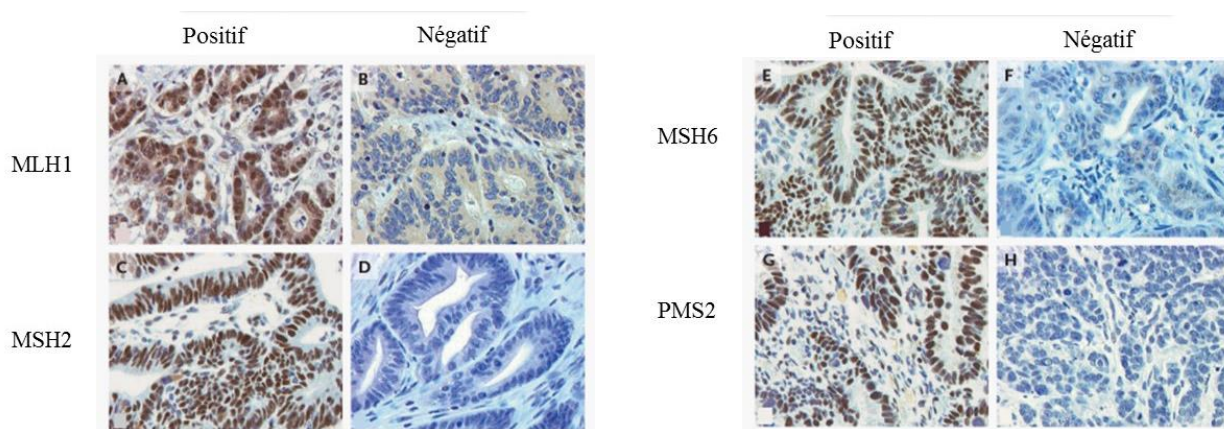


Figure 6 : Exemple de résultats d'immunohistochimie des protéines MMR. D'après (57). Des coupes histologiques d'adénocarcinome colorectal montrent la présence (gauche) ou l'absence (droite) d'expression des protéines MMR.

Les avantages et inconvénients des deux méthodes sont résumés dans le **Tableau 3**. La recherche d'instabilité microsatellitaire a une sensibilité légèrement supérieure à l'IHC, à l'exception des cas associés à une mutation du gène *MSH6*, pour lesquels la sensibilité du test peut parfois être prise en défaut (21). Concernant l'IHC, l'anticorps peut parfois détecter un fragment d'une protéine MMR normalement exprimée, mais non fonctionnelle, augmentant le

risque de faux négatif. Par ailleurs, les deux techniques peuvent être prises en défaut sur des tumeurs autres que colorectales, dont le cancer de l'endomètre (58). De plus, bien que l'analyse du phénotype tumoral puisse être réalisée sur des adénomes, la sensibilité des techniques est moindre, avec cependant un rendement qui augmente avec le degré de dysplasie et la taille de l'adénome. Ainsi, on estime que l'analyse sur un adénome n'a de valeur que si elle est positive (26). L'utilisation combinée de ces deux techniques permet d'obtenir une sensibilité proche de 100% (57).

	INSTABILITE MICROSATELLITAIRE	IMMUNOHISTOCHEMIE
AVANTAGES	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Sensibilité : 97 à ~100 % (54) (59) ➤ Hautement reproductible 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Sensibilité : ~ 93 à 94 % (59)(57) ➤ Disponible dans de nombreux centres et facilement réalisable techniquement ➤ Oriente vers le gène responsable, donc réduit le coût de l'analyse moléculaire des gènes MMR ➤ Fiable même quand faible pourcentage de cellules tumorales
LIMITES	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Nécessité d'être équipé pour la réalisation d'analyse moléculaire ➤ Problèmes des tumeurs mucineuses non macrodissécables ➤ Difficulté d'identifier les défaillances du système MMR liées à des mutations du gène <i>MSH6</i> car l'instabilité est plus faible ➤ N'identifie pas le gène défectueux donc augmentation du coût de l'analyse moléculaire des gènes MMR ➤ Peu fiable quand faible pourcentage de cellules tumorales (<15-20%) ➤ Difficulté d'identifier les défaillances du système MMR dans certains tissus (endomètre, urothélium) car instabilité plus faible 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Problème de bruit de fond des tumeurs mucineuses et de fixation tissulaire ou autres problème techniques résultant en un marquage faible ou hétérogène ➤ Mutations ne modifiant pas l'épitope sont reconnues par l'anticorps ➤ Moins fiable sur des échantillons de petite taille ➤ Difficulté d'interprétation pour certaines tumeurs (endomètre, urothélium, système nerveux central) ➤ Variabilité d'interprétation entre observateurs

Tableau 3 : Avantages et limites de l'immonohistochimie et de la recherche d'instabilité microsatellitaire pour le dépistage du syndrome de Lynch

L'instabilité microsatellitaire n'est cependant pas spécifique des tumeurs survenant dans le cadre d'un syndrome de Lynch puisqu'elle est observée dans environ 15 % des cancers sporadiques (12-15% des CCR, 20-30% des cancers de l'endomètre, 9% des cancers de l'ovaire) (53). Ceci est lié, dans la plupart des cas, à l'acquisition d'une hyperméthylation somatique biallélique du promoteur du gène *MLH1* entraînant l'inactivation et la perte d'expression du gène *MLH1*, de manière analogue à ce qui est observé dans le syndrome de Lynch (60). Les CCR sporadiques MSI partagent les mêmes caractéristiques histopathologiques, la même localisation que les cancers développés dans le cadre du syndrome de Lynch. Cependant, ces deux entités semblent avoir une origine différente. Les tumeurs MSI sporadiques dériveraient d'adénomes sessiles festonnés, qui affichent des caractéristiques moléculaires uniques incluant la mutation V600E (c.1799A>T) du gène *BRAF* (58). Ces tumeurs sont secondaires à un phénotype méthylateur lié en général à la sénescence (CIMP ou *CpG island methylator phenotype*, observé dans plus de la moitié des CCR à 90 ans) et se produisant en l'absence de contexte héréditaire. La mutation du gène *BRAF* est présente dans environ 60 à 70 % des tumeurs sporadiques, alors qu'elle est absente dans le cas du syndrome de Lynch (61). De même, la méthylation du promoteur du gène *MLH1* présente dans la quasi-totalité des tumeurs sporadiques MSI est absente dans la quasi-totalité des tumeurs développées dans le cadre du syndrome de Lynch. Ainsi, la présence d'une mutation du gène *BRAF* et d'une hyperméthylation somatique du gène *MLH1* est hautement prédictive de l'absence de syndrome de Lynch, même s'il existe des exceptions (62).

Le phénotype tumoral est insuffisant pour établir le diagnostic du syndrome de Lynch. Ce dernier repose sur l'identification de la mutation constitutionnelle causale. Cependant, les techniques d'analyses étant lourdes et coûteuses, diverses stratégies intégrant les critères cliniques et le phénotype tumoral ont été développées et évaluées afin d'améliorer la

probabilité d'identifier une mutation constitutionnelle. Un exemple de stratégie largement utilisée en France est résumé dans la **Figure 7**.

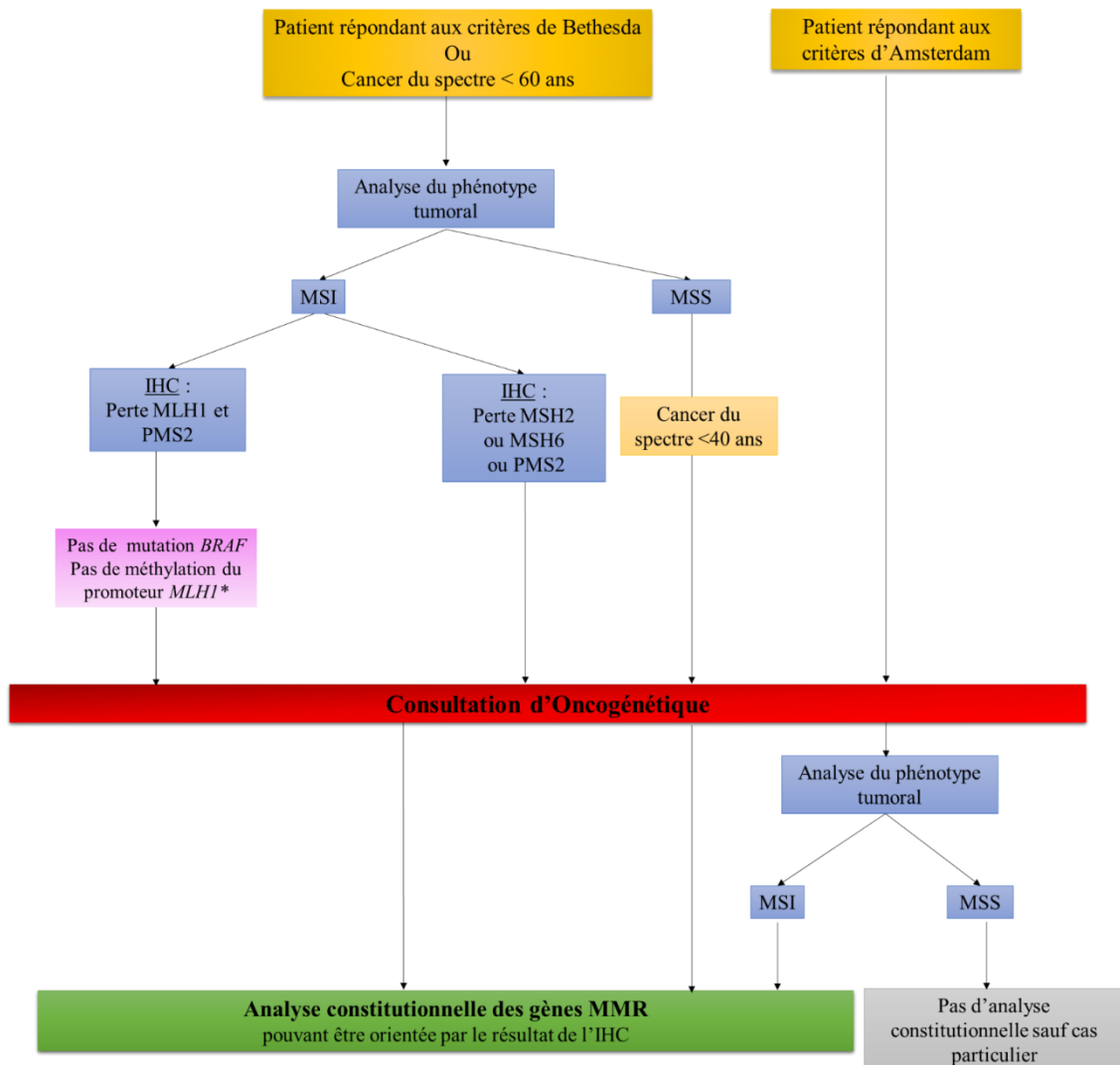


Figure 7 : Stratégie diagnostique du syndrome de Lynch d'après (44) et les recommandations de l'INCa.

* : Une hyperméthylation somatique du gène *MLH1* peut être associée à une hyperméthylation constitutionnelle nécessitant des investigations complémentaires (cf paragraphe III. C)

III. Génétique moléculaire

A. Place du diagnostic génétique

L'identification d'une mutation constitutionnelle *délétère* chez l'individu suspecté de syndrome de Lynch est indispensable afin de :

- *poser le diagnostic formel de la maladie* : une surveillance adaptée sera alors recommandée (plan personnalisé de suivi selon les recommandations de l'INCa) ;
- *préciser le conseil génétique* : le syndrome de Lynch se transmettant selon un mode autosomique dominant, la descendance a un risque de 50% d'hériter de la mutation et du risque associé de cancer ;
- *proposer un test présymptomatique aux apparentés* : les personnes porteuses de la mutation familiale et donc à risque élevé de cancer seront invitées à adopter une surveillance spécifique, tandis que les non porteurs pourront en être exemptés. Pour ces derniers, le risque tumoral devient celui de la population générale.

Le test génétique est réalisé sur l'ADN leucocytaire, obtenu à partir d'une prise de sang. Il peut être effectué après avoir fourni une information au patient sur les caractéristiques de la maladie, les moyens de la détecter, les possibilités de prévention et de traitement et après recueil du consentement libre et éclairé par une information préalable comportant les indications sur la portée de l'examen (article L.1131-1 du code de la santé publique). Il n'est généralement pas réalisé chez le mineur, le risque de cancer avant 20 ans étant rare dans le syndrome de Lynch.

Le diagnostic génétique consiste à identifier une mutation constitutionnelle sur un des quatre gènes MMR : *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* ou *PMS2*.

B. Les gènes MMR

- *MLH1*

Le gène *MLH1* (MIM# 120436), localisé sur le chromosome 3 en position 3p21.3, comprend 19 exons. Il code pour une protéine de 84 kDa constituée de 756 acides aminés (**Figure 8**).

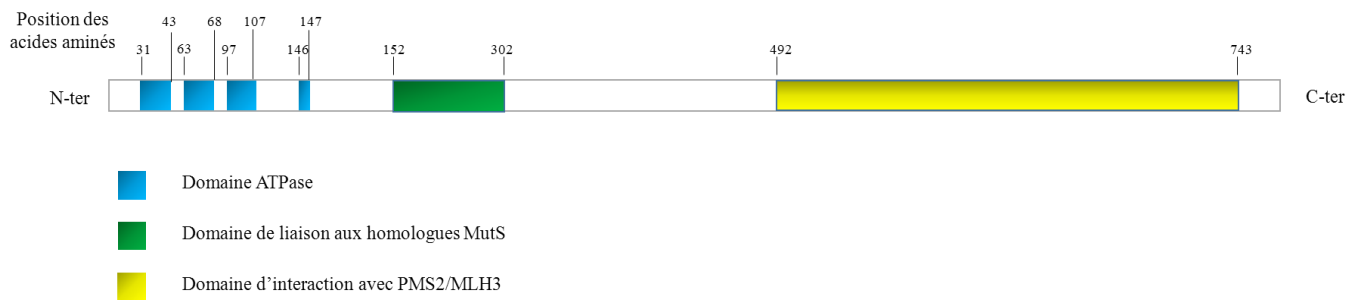


Figure 8 : Représentation schématique de la protéine MLH1. D'après (63)(64)

La protéine est constituée de domaines très conservés et indispensables dans la fonction de coordination du système MMR, dont un domaine ATPase, un domaine de liaison aux homologues MutS (MSH2 et MSH6), ainsi qu'un domaine d'interaction avec la protéine partenaire constituant le dimère MutL (PMS2 ou MLH3).

- MSH2

Le gène *MSH2* (MIM# 609309) est le premier gène MMR identifié par analyse de liaison dans les familles où les tumeurs colorectales arboraient un profil MSI (65). Il est situé sur le chromosome 2 en position p22-p21. Ce gène comprend 16 exons codant pour une protéine de 104 kDa constituée de 934 acides aminés (**Figure 9**).

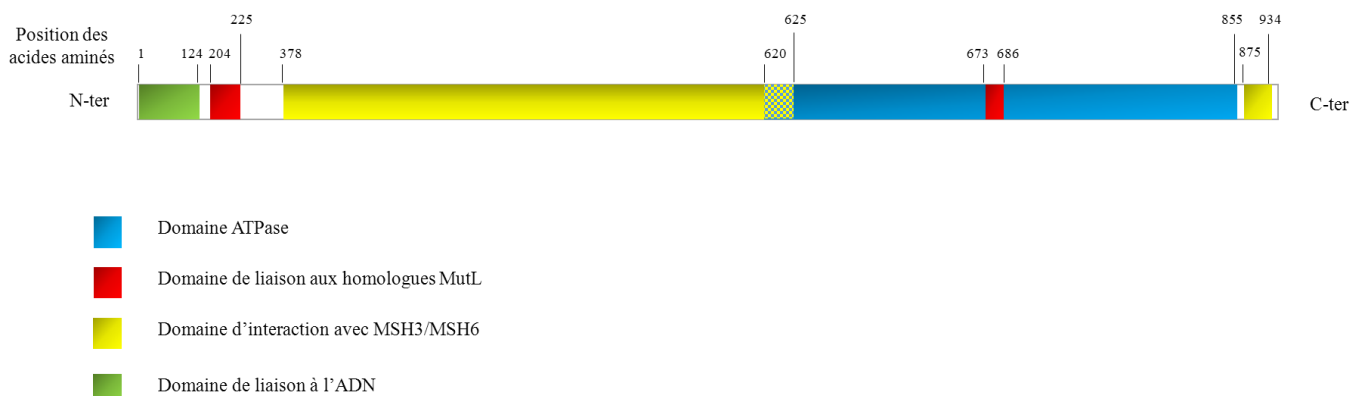


Figure 9 : Représentation schématique de la protéine MSH2. D'après (66)(64).

De manière analogue à la protéine MLH1, les domaines fonctionnels de la protéine MSH2 sont composés d'un domaine ATPase, un domaine de liaison aux homologues MutL (PMS2 et MLH1), ainsi qu'un domaine d'interaction avec la protéine partenaire constituant le

dimère MutS (MSH3 ou MSH6). De plus, la protéine est composée d'un domaine d'interaction avec l'ADN, intervenant dans la reconnaissance du mésappariement.

- *MSH6*

Le gène *MSH6* (MIM# 600678) est situé sur le chromosome 2 en position 2p16. Il comprend 10 exons, codant pour une protéine de 1360 acides aminés. Celle-ci est constituée d'un domaine ATPase, un domaine de liaison à la protéine PNCA, un domaine de liaison aux mésappariements et un domaine d'interaction avec la protéine MSH2.

- *PMS2*

Le gène *PMS2* (MIM# 600259), situé en position 7p22, comprend 15 exons codant pour une protéine de 862 acides aminés. Le gène *PMS2* comporte de nombreux pseudogènes (environ 15 sur le même chromosome), dont le pseudogène *PMS2CL* très proche du gène fonctionnel, qui possède des exons quasi identiques aux exons 9 et 11 à 15 du gène *PMS2*, avec des conversions géniques fréquentes entre les deux (67)(68).

C. Type et répartition des mutations

Les mutations identifiées dans le syndrome de Lynch sont principalement des mutations ponctuelles, suivies de réarrangements de grande taille et plus rarement d'épimutations. Les différents types de mutations par gène sont représentés sur la **Figure 10**.

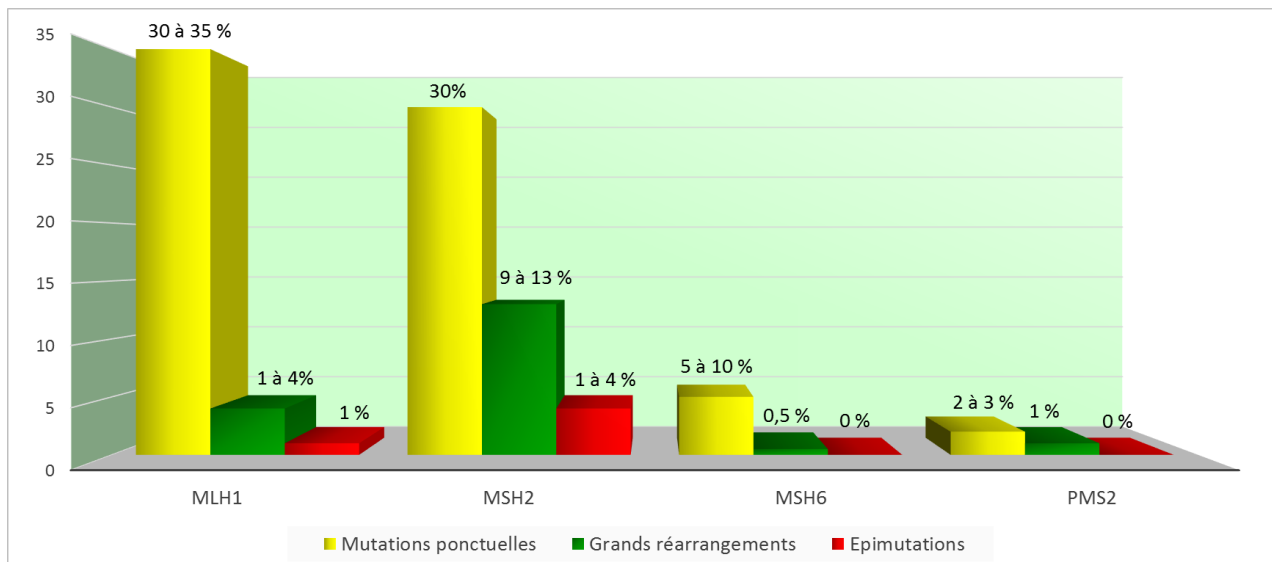


Figure 10 : Répartition des mutations des gènes MMR dans le syndrome de Lynch (d'après (69) (70)).

Les mutations des gènes *MLH1* et *MSH2* représentent jusqu'à 90 % de l'ensemble des mutations des gènes MMR dans le syndrome de Lynch (environ 45 % pour *MLH1* et 45 % pour *MSH2*). Les grands réarrangements, à type de délétions, sont particulièrement représentés pour le gène *MSH2* (environ 20% de l'ensemble des mutations du gène *MSH2* contre 5% des mutations du gène *MLH1*), en raison de sa richesse particulière en séquences *Alu*, particulièrement sujettes aux recombinaisons intragéniques inégales favorisant les délétions (71)(72) (**Figure 10**). Des mutations fondatrices telles que la délétion des exons 1 à 6 du gène *MSH2* peuvent représenter jusqu'à 20 % des mutations dans certaines populations (11).

Les mutations des gènes *MSH6*, principalement des mutations ponctuelles, comptent pour environ 10 % de l'ensemble des mutations identifiées.

Les mutations du gène *PMS2* sont rares (environ 2 à 4 %), probablement sous évaluées en raison de la difficulté pour les mettre en évidence. Les grands réarrangements constituent une part importante des anomalies détectées (68).

Outre les anomalies génétiques, des anomalies épigénétiques peuvent également être responsables de syndrome de Lynch.

Des délétions des derniers exons du gène *EPCAM* (ou *TACSTD1*), gène situé 16 kb en amont du gène *MSH2*, ont été décrites comme responsables d'une hyperméthylation du promoteur du gène *MSH2*. Elles représentent en moyenne entre 1 et 2,8 % des anomalies responsables de syndrome de Lynch et jusque 4 % dans certaines études (73)(74). Le mécanisme d'inactivation du gène *MSH2* est lié à la délétion de la portion terminale du gène *EPCAM*, qui englobe le signal de terminaison de la transcription. Celle-ci se poursuit alors jusqu'au gène *MSH2*, situé en aval. Cette délétion provoque la formation d'un transcrit de fusion *EPCAM-MSH2* qui, par un mécanisme encore non élucidé, entraîne une méthylation du promoteur du gène *MSH2* et donc sa répression transcriptionnelle. Ce mécanisme compte pour 10-40% des familles avec syndrome de Lynch dont les tumeurs affichent une perte d'expression de la protéine *MSH2* (74). Le risque de cancer de l'endomètre chez les personnes avec une délétion du gène *EPCAM* semble être étroitement lié à la taille de la délétion (75).

L'hyperméthylation constitutionnelle du gène *MLH1* représente 0,6 à 1 % de l'ensemble des anomalies responsables de syndrome de Lynch. Environ cinquante cas ont été confirmés jusqu'à ce jour avec un phénotype classique de syndrome de Lynch (76). Quelques cas ont été décrits de familles avec une transmission sur un mode autosomique dominant secondaire à une altération génétique sous-jacente, parmi lesquelles des mutations ponctuelles dans la région 5'UTR du gène *MLH1*, de larges duplications ou encore des délétions partielles du gène *MLH1* et de son promoteur. Cependant, la plupart des épimutations surviennent *de novo* et sont effacées à la génération suivante ou sont transmises de manière non mendélienne (77). L'hyperméthylation constitutionnelle du gène *MLH1* représente environ 10 % cas de syndrome de Lynch avec perte de l'expression de la protéine *MLH1* au niveau tumoral (78).

D. Méthodes d'identification

La recherche de mutations ponctuelles (substitutions, insertions et délétions de petite taille) consiste actuellement à amplifier par PCR à partir de l'ADN génomique les exons codants et séquences introniques flanquantes du gène, puis à analyser les produits obtenus par séquençage Sanger. Les grands réarrangements sont détectés le plus souvent par la technique de MLPA (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*) ou de QMPSF (*Quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments*) qui déterminent le nombre de copies pour chaque exon (71). Les épimutations du gène *MLH1*, encore peu recherchées, sont identifiées par la recherche d'hyperméthylation au sein du promoteur du gène (région proximale) par différentes techniques telles que la MS-PCR (*Methylation Specific-PCR*) ou l'amplification par PCR et pyroséquençage à partir d'ADN traité au bisulfite de sodium ou encore la MS-MPLA (62).

Lorsque le phénotype tumoral est disponible, l'analyse génétique est orientée par le résultat de l'immunohistochimie. En l'absence de phénotype tumoral, la séquence des analyses génétiques est basée sur la répartition, en terme de fréquence, des différentes mutations, à savoir une recherche de mutations des gènes *MLH1* et *MSH2* dans un premier temps (environ 90 % des mutations identifiées), puis des gènes *MSH6* (environ 10 % des mutations identifiées) et *PMS2* (2 à 4 % des mutations identifiées) (69).

Ces stratégies et méthodes d'analyses sont en cours d'évolution avec le développement du NGS (*Next Generation Sequencing*).

E. Diagnostics différentiels

L'analyse génétique a révolutionné le diagnostic du syndrome de Lynch. La définition génétique de ce syndrome a permis de réévaluer la proportion des patients atteints du syndrome de Lynch parmi les CCR. En effet, en cas de définition basée sur les critères familiaux et sur l'âge de découverte, le syndrome de Lynch représente environ 5% de

l'ensemble des CCR. En revanche, les syndromes de Lynch confirmés par la détection d'une mutation constitutionnelle des gènes MMR comptent pour moins de 3% des CCR, car certaines présentations cliniques, proches du syndrome de Lynch, ne sont pas confirmées par une anomalie des gènes MMR(79).

Dans certaines familles, les critères d'Amsterdam sont remplis, mais le phénotype tumoral est normal (MSS *Microsatellite Stability* avec conservation de l'expression des protéines MMR). Ce syndrome, dénommé « Cancer Colorectal Familial de Type X » ou « Syndrome X », est associé à un risque de CCR plus tardif que dans le syndrome de Lynch et par l'absence de cancers extra-coliques. Le risque de CCR dans ces familles est augmenté d'un facteur 2,5 (80).

Dans 10 à 15% des cas, l'analyse génétique ne permet pas d'identifier de mutations dans les gènes MMR, alors que le phénotype tumoral et l'histoire familiale sont évocateurs. Des mutations du gène *MUTYH*, entrant dans le cadre du syndrome MAP (*MUTYH-associated Polyposis*), peuvent parfois mimer un syndrome de Lynch, en raison de mutations somatiques secondaires de gène MMR, révélées par un phénotype tumoral positif (81).

Enfin, certains cas sans mutations MMR identifiées peuvent être secondaires à des mutations de gènes inconnus, ou encore à un défaut de sensibilité des techniques analytiques actuelles. L'évolution des technologies vers le NGS va probablement apporter une aide majeure pour ces cas particuliers en attente d'une identification génétique (2).

F. Problèmes des variants de Signification Clinique et Biologique inconnue

1. Définition

La majorité des mutations ponctuelles correspondent à des mutations tronquantes, soit par mutation non-sens (substitution d'un acide aminé par un codon stop), soit par décalage du cadre de lecture ou encore par mutation sur un site d'épissage (**Figure 11**). L'interprétation de ces mutations comme délétères et responsables du syndrome de Lynch est alors aisée.

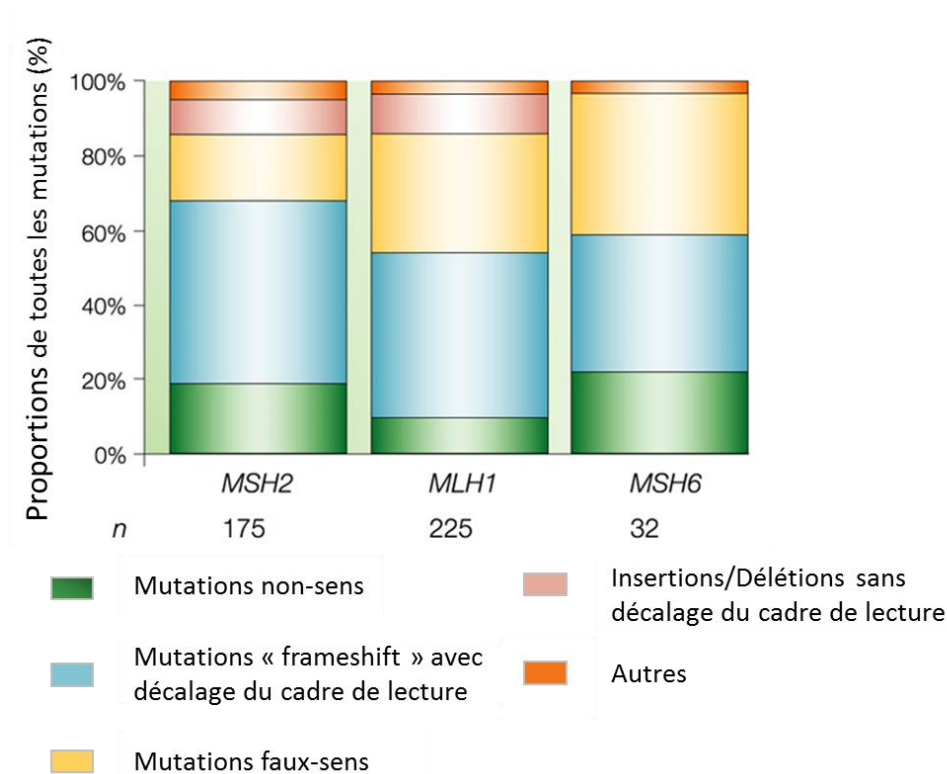


Figure 11 : Répartition des mutations ponctuelles des gènes *MLH1*, *MSH2* et *MSH6*. D'après (79)

Néanmoins, une proportion non négligeable de mutations n'aboutit pas à la synthèse d'une protéine tronquée. Elles correspondent à des mutations faux-sens (substitutions d'acides aminés) ou à de petites insertions/délétions n'entraînant pas de décalage du cadre de lecture.

Toutes ces mutations sont définies *a priori* comme Variants de Signification Clinique et Biologique Inconnue (ou VSI), car le lien de causalité avec la pathologie ne peut être établi avec certitude. Ces mutations délicates à interpréter nécessitent des investigations complémentaires pour documenter leur impact sur la fonction MMR.

Un groupe de travail a proposé de les distinguer en cinq classes, en fonction des arguments disponibles (82) :

- Classe 1. Neutre
- Classe 2. Probablement neutre
- Classe 3. Signification inconnue
- Classe 4. Probablement délétère
- Classe 5. Délétère

2. Outils pour l'interprétation des VSI

Dans la plupart des cas, le rôle pathogène des VSI ne peut être établi à partir de données cliniques, telles que la ségrégation de la pathologie dans la famille, en raison de familles peu informatives par leur taille, de la pénétrance incomplète des mutations des gènes MMR et de la possibilité de mutations délétères additionnelles non mises en évidence. En effet, un phénotype délétère peut être secondaire à des mutations délétères non identifiées par les techniques utilisées, localisées *en cis* sur le même gène ou dans une région régulatrice à distance.

Un faisceau d'arguments, tels que la conservation d'un résidu d'acide aminé au cours de l'évolution, la fréquence du variant dans la population générale, la présence d'une mutation délétère associée ou encore les caractéristiques tumorales, est pris en compte pour tenter d'évaluer la pathogénicité d'un variant. De plus, des analyses *in silico* se basant sur la structure protéique (PolyPhen et SIFT), les comparaisons phylogénétiques (conservation de l'acide aminé entre les espèces) (Align-GVGD, PolyPhen...) et évaluant l'impact du variant sur l'épissage (MaxEntScann, NNSplice, ESEfinder...), permettent d'apporter des arguments supplémentaires.

Cependant, ces stratégies ne permettent pas de conclure avec certitude quant au rôle du variant sur le syndrome de Lynch. Des tests évaluant l'effet direct des variants sur la protéine sont nécessaires pour appuyer ce classement.

En France, le Réseau National des Laboratoires d'Oncogénétique Digestive (coordonné par le Dr S. Olschwang), soutenu et financé par l'INCa, a mis en place une base de données des mutations des gènes MMR identifiés dans les laboratoires français (base de données UMD : www.umd.be). Il a notamment pour but de classer les variants répertoriés, sur la base des critères familiaux (critères d'Amsterdam, études de coségrégation (calcul du LOD score)), tumoraux (étude du phénotype tumoral) et de prédictions bioinformatiques. De plus, des analyses fonctionnelles ont été réalisées afin d'évaluer l'impact des variants sur les

transcrits, de façon directe sur l'ARN des patients ou de façon indirecte grâce au développement de test d'épissage *ex vivo* (83). Ces tests ont fourni des informations importantes pour classer les VSI.

Ainsi, par une approche combinée associant les données cliniques, les résultats des analyses tumorales et des tests fonctionnels étudiant l'épissage, le Réseau National des Laboratoires d'Oncogénétique Digestive a contribué au reclassement de 25 % des VSI en mutations délétères (84). Il reste néanmoins un nombre important de VSI qui sont en attente d'arguments qui permettront leur interprétation. En effet, on estime que les VSI représentent respectivement 29 %, 16 % et jusqu'à 39 % de l'ensemble des mutations des gènes *MLH1*, *MSH2* et *MSH6* (85)(86).

Les tests d'épissage sont actuellement les seuls tests fonctionnels utilisés dans les laboratoires de diagnostic afin d'étudier l'impact des VSI. Les résultats de ces tests ont une valeur limitée. En effet, une absence d'effet sur l'épissage pour un variant donné ne permet pas d'éliminer un effet de celui-ci sur la transcription des ARNm, la traduction des protéines ou les modifications post-traductionnelles par exemple. Divers tests fonctionnels permettant d'évaluer l'impact des variants sur les protéines MMR ont été proposés. Cependant, il s'agit le plus souvent de tests complexes, en systèmes hétérologues (levures) et difficilement implantables dans un laboratoire hospitalier.

A l'heure actuelle, aucun test n'est disponible au sein du Réseau National des Laboratoires d'Oncogénétique Digestive afin d'étudier les effets des variants à l'échelon de la protéine.

IV. Objectifs du travail

L'objectif de ce travail était de développer un test fonctionnel, facilement applicable en laboratoire, visant à étudier de façon directe l'impact des VSI des gènes *MLH1* et *MSH2*, sur l'expression des protéines correspondantes. De manière analogue à l'analyse en IHC des tumeurs de patients atteints de syndrome de Lynch, une protéine MMR défectueuse se traduira par une perte de son expression. La mise en place d'un tel outil est importante pour les patients dans l'attente d'un résultat informatif.

Matériels et Méthodes

I. Choix des mutations

Dix-huit variants ont été sélectionnés pour l'étude. Seize correspondent à des variants identifiés dans le laboratoire chez des patients suspects de syndrome de Lynch et classés comme VSI ou longtemps restés classés comme tels dans la base de données nationale. Les données familiales, les résultats des phénotypes tumoraux, de même que les résultats des analyses réalisées préalablement sur les transcrits ont été collectés. Deux variants supplémentaires ont été sélectionnés dans la base de données UMD touchant un même codon (MSH2 : G692E et G692V).

Au total, 6 VSI ont été analysés pour *MLH1* et 12 pour *MSH2* (**Tableau 4**).

	Nomenclature nucléotidique*	Nomenclature protéique
MLH1	c.199G>A c.229T>C c.1268G>A c.2041G>A c.2059C>T c.2223_2231del	p.Gly67Arg (G67R) p.Cys77Arg (C77R) p.Arg423Lys (R423K) p.Ala681Thr (A681T) p.Arg687Trp (R687W) p.Q742_A744del
MSH2	c.455T>C c.518T>G c.815C>T c.1022T>C c.1409T>A c.1786_1788delAAT c.2006G>T c.2074G>T c.2075G>A c.2075G>T c.2168C>T c.2651T>G	p.Met152Thr (M152T) p.Leu173Arg (L173R) p.Ala272Val (A272V) p.Leu341Pro (L341P) p.Val470Glu (V470E) p.Asn596del (N596del) p.Gly669Val (G669V) p.Gly692Trp (G692W) p.Gly692Glu (G692E) p.Gly692Val (G692V) p.Ser723Phe (S723F) p.Ile884Ser (I884S)

Tableau 4 : Liste des VSI MLH1 et MSH2 étudiés.

Séquences de référence *MLH1* : NM_000249.3 et *MSH2* : NM_000251.2

La nomenclature des mutations est indiquée selon les recommandations HGVS (*Human Genome Variation Society*) avec les séquences de référence *MLH1* : NM_000249.3

et *MSH2* : NM_000251.2 La nomenclature protéique a été volontairement simplifiée pour ne pas alourdir le texte et les figures.

Des mutations clairement délétères (MLH1 K618del et MSH2 C697R) et des polymorphismes (MLH1 I219V MSH2 T8M et G322D) ont également été sélectionnés dans la base UMD afin d'être utilisés comme contrôles positifs et négatifs respectivement dans le test d'expression protéique.

II. Analyses *in silico*

Les variants ont été analysés à l'aide de différents outils bioinformatiques par l'intermédiaire du logiciel Alamut-2.2.0 (*Interactive Biosoftware*) permettant d'évaluer leur impact sur la protéine correspondante :

- Le logiciel SIFT (*Sort Intolerant from Intolerant*) utilise l'homologie de séquence entre les domaines et les gènes de la même famille pour déterminer le degré de conservation d'un résidu d'acide aminé, ainsi que les propriétés physiques des acides aminés pour prédire la pathogénicité d'un variant.
- PolyPhen-2 (*Polymorphism Phenotyping v2*) est un outil qui, en plus de la conservation des séquences, utilise l'information de la structure protéique et de la structure tridimensionnelle, lorsqu'elle est disponible, pour prédire les effets sur la structure secondaire et les sites fonctionnels de la protéine.
- Align-GVGD (*Align-Grantham Variation Grantham Deviation*) est un programme basé sur la combinaison des caractéristiques biophysiques des acides aminés et sur la conservation au cours de l'évolution d'un résidu acide aminé pour prédire l'impact de mutations faux-sens sur une protéine donnée.

III. Etude *ex vivo* de l'expression des variants

La stratégie utilisée consiste à transfecter des lignées cellulaires cancéreuses d'origine colique, HCT116 et LoVo respectivement déficientes en *MLH1* et *MSH2*, à l'aide d'un vecteur d'expression contenant la séquence codante du gène *MLH1* et *MSH2* portant le variant d'intérêt. L'expression est ensuite analysée à 16, 24 et 48 h après la transfection par la technique de Western blot (WB). Le niveau d'expression est comparé à celui d'un témoin correspondant à la séquence normale, transfectée dans les mêmes conditions. Le principe de la technique est résumé dans la **Figure 12**.

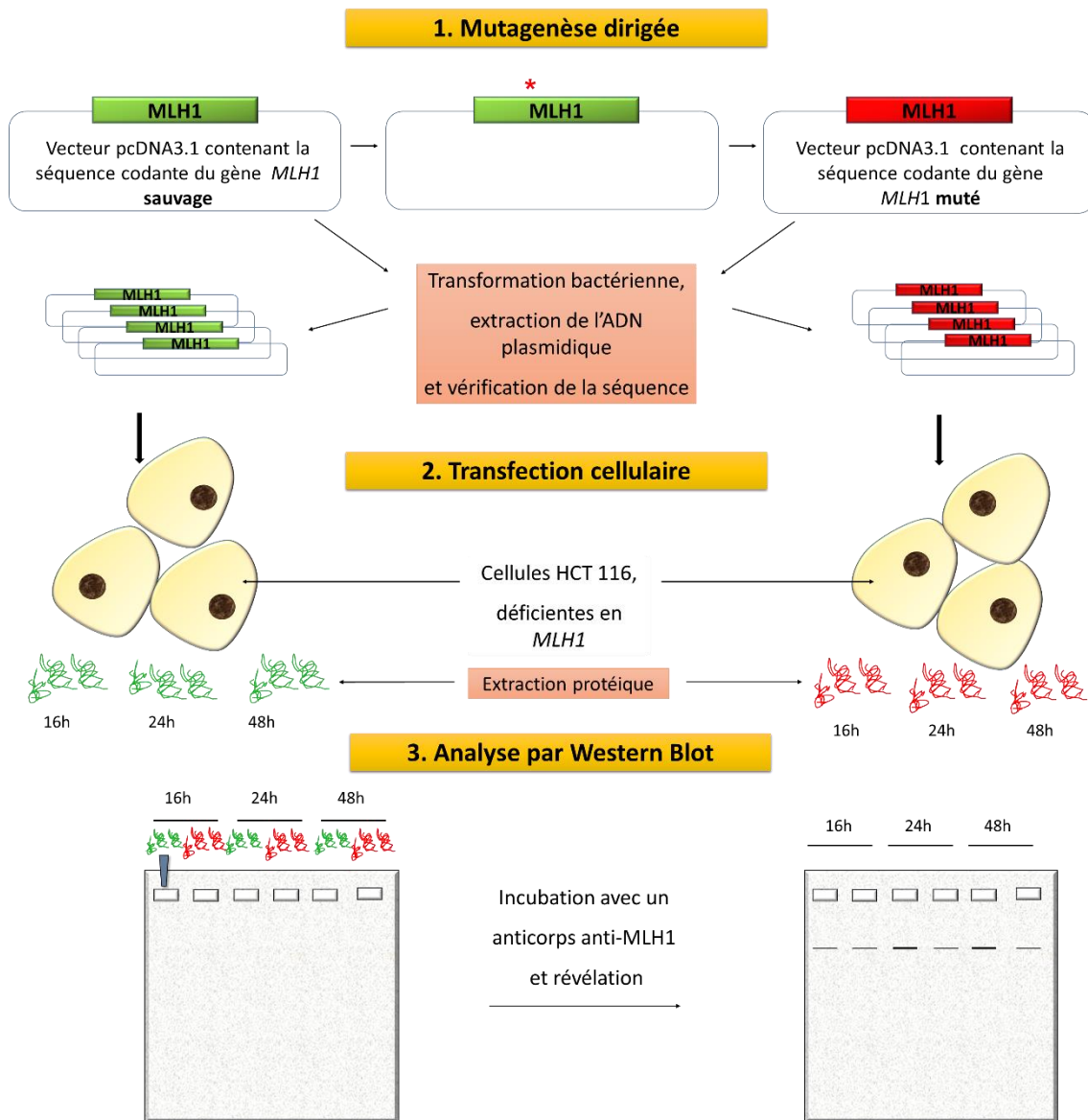


Figure 12 : Principe du test fonctionnel. Exemple du gène *MLH1*.

1. La séquence codante du gène *MLH1* sauvage est clonée dans le vecteur d'expression pcDNA3.1. Le variant d'intérêt est créé par le principe de la *mutagenèse dirigée*. Après une transformation des bactéries compétentes, l'ADN plasmidique est extrait, puis la séquence de l'insert est vérifiée par séquençage.

2. L'ADN plasmidique est introduit dans des cellules HCT116, déficientes pour *MLH1* par une étape de *transfection cellulaire*. Parallèlement, des cellules HCT116 sont transfectées dans les mêmes conditions avec la séquence *MLH1* sauvage.

3. A 16, 24 et 48h après la transfection, les protéines sont extraites en vue de l'analyse par *Western Blot*. Le niveau d'expression du variant d'intérêt est comparé à celui de la séquence sauvage, au même temps de transfection. Le principe est identique pour le gène *MSH2*, avec des cellules LoVo, déficientes pour le gène *MSH2*.

A. Obtention des constructions

1. Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée consiste à créer artificiellement une mutation dans une séquence d'ADN afin d'en étudier les conséquences (**Figure 13**).

Les séquences codantes des gènes *MLH1* et *MSH2* sauvages ont tout d'abord été intégrées dans le vecteur plasmidique d'expression pcDNA3.1. Les différentes étapes de la mutagenèse dirigée ont été réalisées à l'aide du QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) selon les instructions du fournisseur. Les amorces comprenant les mutations souhaitées ont été choisies à l'aide du logiciel PrimerX (http://www.bioinformatics.org/primerx/cgi-bin/DNA_1.cgi).

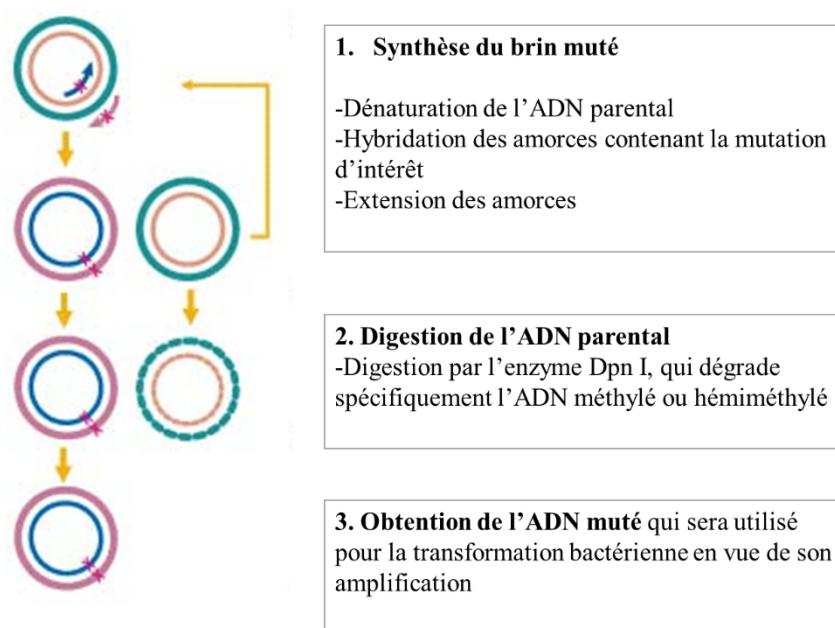


Figure 13 : Principe de la mutagenèse dirigée

- Synthèse du brin muté

La synthèse du brin muté est réalisée par une amplification par PCR. Celle-ci est réalisée sur un volume final de 50 μ l de mélange réactionnel contenant 50 ng d'ADN plasmidique contenant la séquence codante *MLH1* ou *MSH2*, 1 μ l de désoxyribonucleotides (dNTP mix fourni avec le kit), 2,5 U de PfuUltra HF DNA Polymérase, 125 ng d'amorces

sens et antisens contenant la mutation et 5 µl de tampon de réaction 10X. L'amplification s'effectue en 14 cycles, chaque cycle correspondant aux étapes successives suivantes : dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, hybridation des amorces à 55°C pendant une minute et élongation à 68°C pendant 8 minutes.

- Digestion de l'ADN parental

L'ADN parental est dégradé par l'enzyme *DpnI*, qui digère spécifiquement l'ADN méthylé ou hémiméthylé. Pour cela, 1 µl d'enzyme (10 U) est ajouté au mélange réactionnel qui est ensuite incubé pendant une heure à 37°C.

2. Transformation bactérienne

Cette étape consiste à introduire un vecteur dans des bactéries compétentes, qui permettront, au cours de leur multiplication, d'amplifier le plasmide.

Les bactéries utilisées sont les XL1-Blue Supercompétantes. Un aliquot de 50 µl de bactéries est mis en contact avec 1 µl d'ADN digéré. L'ensemble est incubé pendant 30 minutes dans la glace. Puis, on effectue un choc thermique à 42°C pendant 45 secondes précisément, suivi d'un temps de refroidissement de deux minutes dans la glace. Ensuite, 500 µl de SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*, Invitrogen) sont ajoutés, puis les tubes sont incubés 1 h sous agitation (225 rpm). Enfin, 100 µl et 250 µl de ce mélange sont étalés sur des boîtes de Pétri LB-Agar contenant 50 mg/mL d'ampicilline, qui sont incubés une nuit à 37°C.

Deux colonies sont sélectionnées et transférées dans des tubes contenant 4 mL de milieu LB avec de l'ampicilline, qui sont incubés une nuit à 37°C sous agitation.

3. Extraction d'ADN

Une extraction d'ADN est réalisée afin d'obtenir les plasmides amplifiés à l'aide du kit de purification Nucleospin Plasmid Quickpure (*Macherey Nagel*), selon les

recommandations du fournisseur. Les ADN sont ensuite dosés au spectrophotomètre (Nanodrop, Spectrophotometer ND-1000).

4. Séquençage

Afin de s'assurer de la présence de la mutation attendue et de l'absence de mutations supplémentaires, un séquençage complet de l'insert est réalisé pour chaque ADN plasmidique. Pour cela, les inserts sont amplifiés préalablement par PCR. Celle-ci est réalisée sur un volume final de 25 µl contenant 2,5 µl de tampon 10X, 4 µl de dNTP à 10 mM, 5 pmoles d'amorces sens et antisens, 0,25 U d'ADN polymérase LA Taq (Takara), puis 1 µl d'ADN plasmidique. Le programme utilisé est le suivant : 1 cycle à 94°C pendant 1 minute, suivi de 30 cycles comprenant 15 secondes à 98°C, 30 secondes à 60°C et 3 minutes 68°C, puis un cycle final d'élongation à 72°C pendant 10 minutes.

Après vérification de l'efficacité de l'amplification et de la taille de l'insert par analyse du produit par électrophorèse sur gel d'agarose (1 %), celui-ci est séquençé à l'aide d'amorces internes sur séquenceur automatique 3730XL. Les séquences sont analysées et comparées aux séquences de références à l'aide du logiciel SeqScape v2.7 (*Applied Biosystems*).

B. Transfection cellulaire

La transfection cellulaire consiste à introduire un plasmide au sein des cellules.

1. Lignées cellulaires et conditions de culture

Nos deux lignées cellulaires d'étude sont les lignées cancéreuses humaines HCT116 et LoVo, commandées auprès de l'ATCC (American Type Culture Collection). La lignée cellulaire HCT116 est une lignée cancéreuse issue d'un adénocarcinome colorectal, qui porte une mutation non-sens homozygote du gène *MLH1* (c.755C>A, p.Ser252*). La lignée

cellulaire LoVo a été établie à partir d'une métastase dérivant d'un adénocarcinome colorectal et porte une délétion homozygote des exons 3 à 8 du gène *MSH2*.

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de culture stériles de type T25 (25cm²), contenant du milieu DMEM supplémenté par 10 % de sérum de veau fœtal, 1% de glutamine, et 0,5% d'antibiotiques (Pénicilline et Streptomycine à 10 000U/mL) (Gibco). Les cellules sont cultivées à 37°C dans une atmosphère humide et enrichie en CO₂ (10%).

2. Transfection transitoire

Les cellules sontensemencées dans une plaque de 6 puits à raison de 500 000 cellules par puits pour HCT116 et 600 000 cellules par puits pour les cellules LoVo. Puis, les cellules sont transfectées 24 h après ensemencement (confluence cellulaire d'environ 50%) avec 1 µg d'ADN plasmidique.

La transfection transitoire a été réalisée à l'aide du kit « Effectene Transfection Reagent » (Qiagen). L'ADN plasmidique est dilué en présence de Buffer EC, afin d'obtenir une quantité d'ADN de 1 µg pour 100 µl. Puis, 3,2 µl d'enhancer sont ajoutés au milieu qui est incubé quelques minutes à température ambiante, suivi d'une nouvelle incubation de quelques minutes après ajout de 5 µl d'agent de transfection et de 0,6 mL de milieu de culture. Puis, après avoir rincé le tapis cellulaire au PBS 1X et recouvert celui-ci de 1,6 mL de milieu de culture, le mélange est transféré goutte à goutte sur toute la surface du puits. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C jusqu'au moment de la récupération des cellules en vue de la préparation des lysats protéiques pour l'analyse par Western blot (WB) (16, 24 ou 48 h après la transfection). De plus, un vecteur dépourvu d'insert (vecteur vide) est également transfecté dans les cellules HCT116 et LoVo dans les mêmes conditions pour être utilisé comme contrôle négatif.

C. Analyse par Western blot

Le WB est une méthode qui consiste à séparer des protéines par électrophorèse en gel de polyacrylamide, puis à les transférer sur une membrane de nitrocellulose et enfin à les détecter à l'aide d'anticorps spécifiques.

1. Préparation du lysat protéique

Après élimination du milieu de culture, les cellules sont lavées au PBS 1X. Puis, 150 µl (temps 16 h après transfection) ou 200 µl (temps 24 et 48 h après transfection) de tampon de lyse contenant un cocktail d'inhibiteurs (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich dilué au 100^{ème} et préparé extemporanément) sont ajoutés dans les puits. Les cellules sont grattées et le lysat est récupéré dans un tube eppendorf placé dans la glace. L'opération est répétée une fois. Les lysats sont passés à l'aiguille 22 G afin de rompre les membranes cellulaires. Le mélange est centrifugé à 4°C pendant 5 min. Le surnageant est récupéré et est stocké à -80°C jusqu'à utilisation. Un dosage protéique par technique BCA (BC Assay, automate Konélab 60, Thermo-Fisher Scientific) est effectué sur un aliquot.

2. Migration électrophorétique et Transfert des protéines sur membrane

Tout d'abord, les protéines sont préparées en vue de leur migration sur gel. Pour cela, une quantité de 25 µg de protéines pour *MLH1* ou 15 à 25 µg pour *MSH2* est ajoutée à 5 µl LDS (lithium dodecyl sulfate, NuPAGE® LDS 4X, Sample Buffer) et 2 µl d'agent réducteur (NuPAGE® Sample Reducing Agent (10X) NuPAGE®, *Invitrogen*). Ce mélange est complété avec de l'eau afin d'obtenir un volume de 40 µl. Les protéines sont dénaturées en plaçant le mélange à 100 °C pendant 5 minutes, puis dans la glace. Les échantillons sont ensuite déposés sur gel de polyacrylamide (Gel NuPAGE® 4-12%, *Life Technologies*) recouvert de tampon de migration et séparés par électrophorèse (200 V pendant environ 45 minutes).

Les protéines sont ensuite transférées sur membrane de nitrocellulose par transfert semi-sec à l'aide du coffret Iblot Gel Transfer Stack (*Life Technologies*) sur l'appareil iBlot Gel Transfer System (*Invitrogen*) (**Figure 14**).

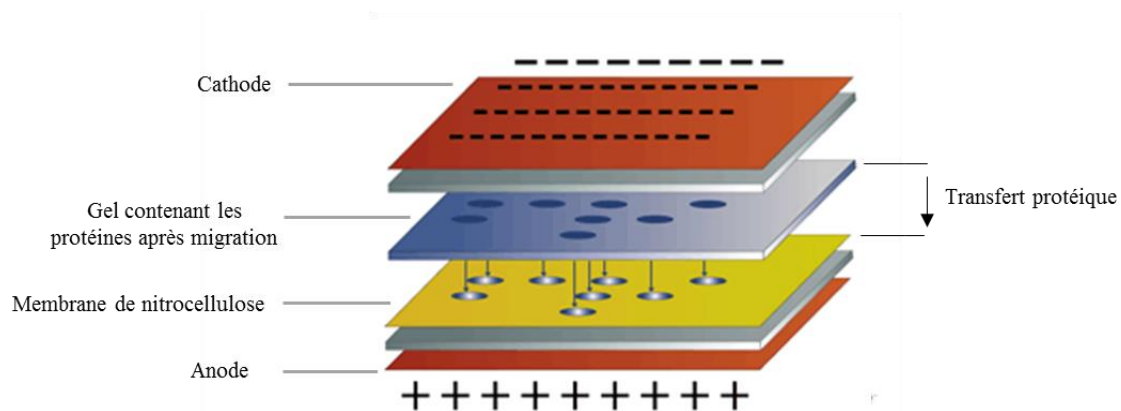


Figure 14 : Schéma illustrant le principe du transfert protéique semi-sec

La membrane est colorée au rouge Ponceau afin de s'assurer que le transfert des protéines sur la membrane de nitrocellulose se soit effectué correctement.

3. Immunomarquage et révélation

La membrane est incubée pendant 2 heures dans du lait écrémé à 5% afin de saturer les sites de reconnaissance d'anticorps aspécifiques. Puis, l'anticorps primaire préalablement dilué dans du lait (MLH1 : 1/250, Monoclonal, Clone G168-728, BD Pharmingen) ; (MSH2 : 1/1000, Monoclonal, Clone 3A2B8C, Abcam) ; (Tubuline : 1/2000, Polyclonal, Abcam) est mis en contact avec la membrane toute une nuit à 4°C sous agitation. La β -Tubuline est utilisée comme témoin de charge.

Après lavage de la membrane de nitrocellulose (trois lavages en solution Wash Solution, *Invitrogen*), la membrane est incubée en présence de l'anticorps secondaire marqué à la peroxydase (HRP : *horseradish peroxidase*) (anticorps de chèvre anti-souris, Thermo Scientific, pour *MLH1* et *MSH2* et anticorps de chèvre anti-lapin, Thermo Scientific, pour la tubuline, dilués au 5000^{ème} dans la solution de lavage) pendant une heure sous agitation lente.

La membrane est ensuite mise en contact pendant 6 minutes avec 10 mL de solution contenant du luminol (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, *Thermo Scientific*). Après une exposition aux UV et une analyse du signal par un analyseur de chimioluminescence (LAS 4000, Image Quant), on observe un signal lumineux correspondant à la protéine reconnue par l'anticorps primaire (**Figure 15**).

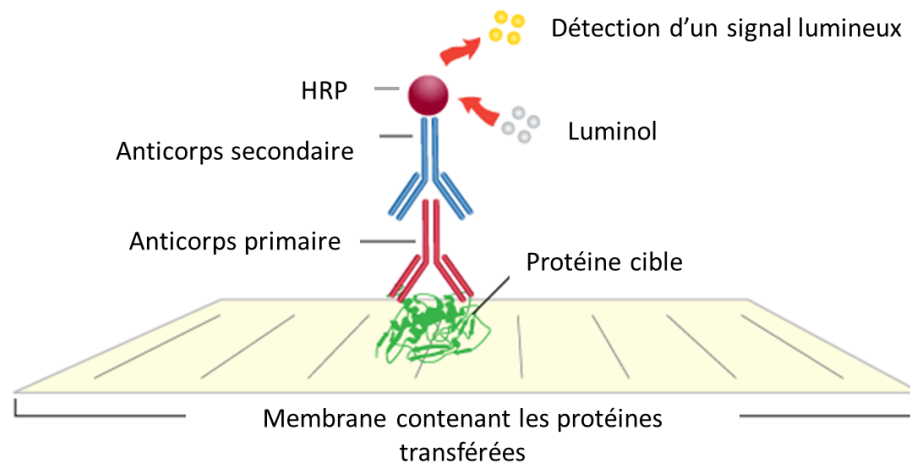


Figure 15 : Principe de détection des protéines en Western Blot

Chaque étude a été répliquée, au moins une fois, sur une transfection indépendante à au moins un temps, sauf le variant MSH2 G692E.

4. Interprétation

L'interprétation est réalisée par comparaison de l'intensité du signal obtenu pour la protéine correspondant au variant à tester, à celui obtenu pour la protéine sauvage préparée dans les mêmes conditions (**Figure 16**). Une expression moindre de la protéine mutée par rapport à la protéine sauvage est évocatrice d'une mutation délétère.

Des protéines ont également été préparées dans les mêmes conditions à partir de cellules déficientes transfectées avec le vecteur vide d'une part et de cellules proficientes pour le gène *MLH1* (cellules LoVo) et *MSH2* (cellules HCT116) d'autre part, servant respectivement de contrôle négatif et positif pour chaque Western blot.

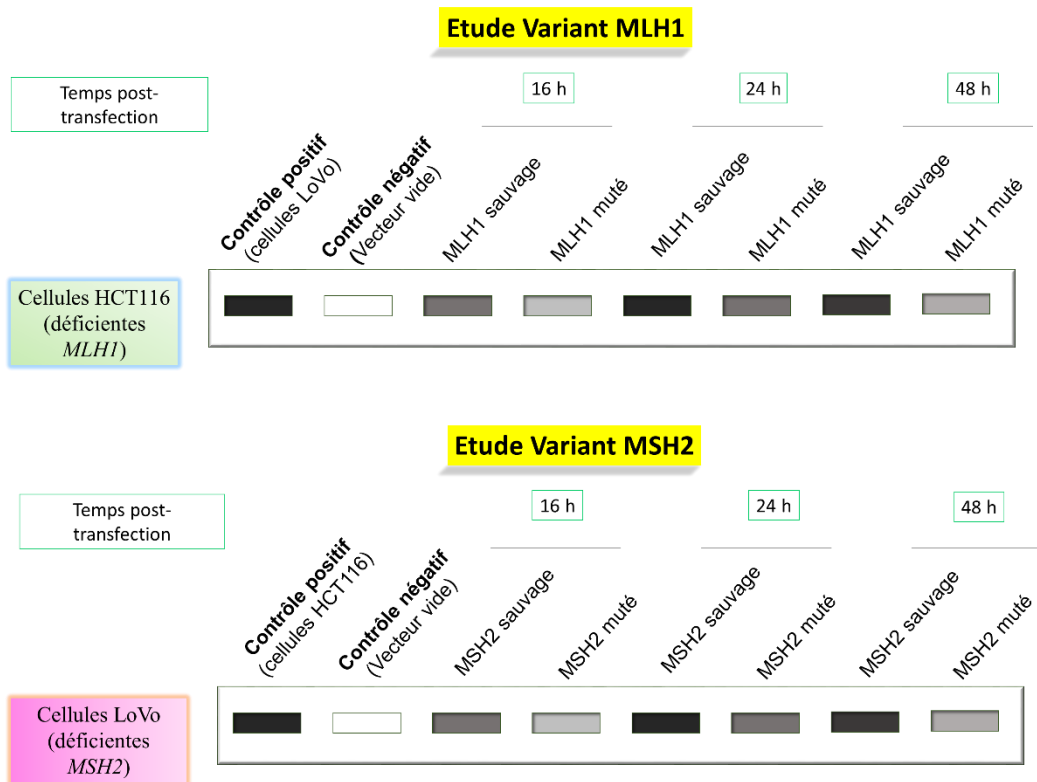


Figure 16 : Interprétation de l'analyse en Western blot.

L'interprétation du niveau d'expression s'effectue par la comparaison entre l'intensité du signal obtenu pour le variant avec celui de la protéine sauvage. Pour chaque Western blot, un contrôle positif et un contrôle négatif sont inclus.

Résultats

Six variants MLH1 identifiés dans notre laboratoire chez des patients suspectés de présenter un syndrome de Lynch ont été sélectionnés pour notre étude : trois étaient classés comme « probablement délétères » par le Réseau National des Laboratoires d'Oncogénétique Digestive, un comme « VSI » et deux comme « probablement neutres ». Douze variants MSH2 ont été analysés, parmi lesquels dix ont été identifiés dans notre laboratoire et deux ont été sélectionnés dans la base de données UMD (G692E et G692V) : cinq variants étaient classés comme « délétères » par le Réseau National des Laboratoires d'Oncogénétique Digestive, quatre comme « probablement délétères », un comme « VSI », un comme « probablement neutre » et un comme « neutre »

Parmi les 18 variants étudiés, cinq ont été rapportés dans la base UMD uniquement par notre laboratoire (MLH1 C77R et MSH2 M152T, L173R, G692W et S723F).

Les caractéristiques des variants MLH1 et MSH2 étudiés, ainsi que les résultats obtenus sont résumés dans les **Tableaux 5 et 6** respectivement.

Famille	Variant		Renseignements cliniques		Impact prédit sur la protéine			Effet sur l'épissage ⁶	Tests fonctionnels ⁷		Résultats du test ⁸	
	Nomenclature nucléotidique ¹	Nomenclature protéique	Classe ²	Histoire familiale ³	Phénotype tumoral	SIFT	Align GVD ⁵		PolyPhen	Levure		Mammifères
A	c.199G>A	p.G67R	Probablement délétère	Am2	MSI, MLH1-PMS2- ⁴	Délétère	C65	Probablement délétère	non	Pathogène (87)	Pathogène (88)(63)	Positif
B	c.229T>C	p.C77R	VSI	Am1	MSI, MLH1-PMS2-	Délétère	C65	Probablement délétère	non	Pathogène (89)	Pathogène (63)(90)	Positif
C	c.1268G>A	p.R423K	Probablement neutre	Beth	MSS (Adénome)	Non délétère	C0	Non délétère	/	/	/	Négatif
D	c.2041G>A	p.A681T	Probablement délétère	Am2	MSI, MLH1-PMS2-	Délétère	C0	Probablement délétère	non	Pathogène (91)(87)	Non Pathogène (63)	Positif
E	c.2059C>T	p.R687W	Probablement neutre	Beth	MSI, IHC ni	Délétère	C0	Probablement délétère	non	Pathogène (87)	Ni (87)	Positif
F	c.2223_2231del	p.Q742_A744del	Probablement délétère	Am1	MSI, MLH1-PMS2-MSH6- ⁴	/	/	/	/	/	/	Positif

Tableau 5 : Caractéristiques des variants MLH1 étudiés

¹ Nomenclature d'après HGVS, Séquence de référence *MLH1* : NM_000249.3

² Classement dans la Base de données nationale UMD (www.umd.be)

³ Histoire familiale : Am1 : Amsterdam 1 ; Am2 : Amsterdam 2 ; Beth : Bethesda

⁴ Phénotype tumoral provenant de tumeurs de patients présentant la même mutation (base UMD)

⁵ Impact fonctionnel : de C0 (peu probable) à C65 (très probable)

⁶ Déterminé par test *ex vivo* et/ou sur ARN du patient

⁷ Les références bibliographiques sont indiquées entre parenthèses

⁸ Positif : niveau d'expression diminué par rapport à la protéine sauvage ; Négatif : niveau d'expression similaire à celui de la protéine sauvage

Ni : non interprétable

Famille	Variant			Renseignements cliniques		Impact prédit sur la protéine			Effet sur l'épissage ⁵	Tests fonctionnels ⁶		Résultat du test ⁷
	Nomenclature nucléotidique ¹	Nomenclature protéique	Classe ²	Histoire familiale ³	Phénotype tumoral	SIFT	Align GVGD ⁴	PolyPhen		Levure	Mammifères	
G	c.455T>C	p.M152T	Probablement neutre	Beth	MSS, MSH2+MSH6+	Non délétère	C0	Non délétère	non	/	/	Négatif
H	c.518T>G	p.L173R ⁸	Probablement délétère	Beth	MSI, MSH2-MSH6+	Délétère	C0	Probablement délétère	non	/	Pathogène (92)	Faiblement positif
H	c.815C>T	p.A272V ⁸	Neutre	Beth	MSI, MSH2-MSH6+	Délétère	C0	Possiblement délétère	Perte mineure exon 5	/	Non Pathogène (92)	Faiblement positif
I	c.1022T C	p.L341P	Délétère	Am2	MSI, MSH2-MSH6-	Délétère	C0	Probablement délétère	non	/	/	Positif
J	c.1409T>A	p.V470E	VSI	Beth	MSI, MSH2+MSH6+	Délétère	C0	Probablement délétère	non	/	/	Négatif
K	c.1786_1788del AAT	p.N596del	Délétère	Am2	MSI, MSH2-MSH6+	/	/	/	non	/	Faiblement pathogène (93)	Faiblement positif
L	c.2006G>T	p.G669V	Probablement délétère	Am1	MSI, MSH2-MSH6-	Délétère	C0	Probablement délétère	Perte mineure exon 13 (30%)	/	/	Faiblement positif
M	c.2074G>T	p.G692W	Probablement délétère	Am2	MSI, MSH2-MSH6-	Délétère	C15	Probablement délétère	non	/	/	Positif
N	c.2075G>A	p.G692E ⁹	Délétère	Am2	MSI, MSH2-MSH6-	Délétère	C0	Probablement délétère	/	/	/	Négatif
O	c.2075G>T	p.G692V ⁹	Délétère	Am1	MSH2-MSH6-	Délétère	C0	Probablement délétère	non	/	/	Faiblement positif
P	c.2168C>T	p.S723F	Délétère	Beth	MSI, IHC ni	Délétère	C15	Probablement délétère	non	Pathogène (94)	Pathogène (93)	Positif
Q	c.2651T>G	p.I884S	Probablement délétère	Beth	MSI, MSH2-MSH6-	Non délétère	C0	Probablement délétère	? ¹⁰	/	/	Positif

Tableau 6 : Caractéristiques des variants MSH2 étudiés

¹ Nomenclature d'après HGVS, Séquence de référence *MSH2* : NM_000251.2

² Classement dans la Base de données nationale UMD (www.umd.be)

³ Histoire familiale : Am1 : Amsterdam 1 ; Am2 : Amsterdam 2 ; Beth : Bethesda

⁴ Impact fonctionnel : de C0 (peu probable) à C65 (très probable)

⁵ Déterminé par test *ex vivo* et/ou sur ARN du patient

⁶ Les références bibliographiques sont indiquées entre parenthèses

⁷ Positif : niveau d'expression diminué par rapport à la protéine sauvage ; Négatif : niveau d'expression similaire à celui de la protéine sauvage

⁸ Variants présents chez le même patient ⁹ Variants sélectionnés dans la base de données UMD

¹⁰ Probable déséquilibre d'expression allélique

I. Caractéristiques cliniques des patients porteurs de VSI et phénotypes tumoraux

Les 18 variants étudiés ont été identifiés chez 17 patients, avec 2 variants identifiés chez un même patient. Parmi les 17 patients étudiés, 10 étaient de familles répondant aux critères d'Amsterdam I ou II. Les tumeurs concernaient principalement le côlon (7 familles), l'endomètre (3 familles) et l'estomac (une famille). La majorité des phénotypes tumoraux montraient une instabilité microsatellitaire associée à une perte d'expression des protéines MLH1 et PMS2 ou une perte d'expression de MSH2 et MSH6.

Dans la famille H, les variants L173R et A272V ont été retrouvés chez le même patient. Le phénotype tumoral a montré une instabilité microsatellitaire avec perte d'expression de MSH2 associée à une conservation de l'expression de MSH6.

La présentation clinique de la famille C associée à un polype en dysplasie de haut grade à 43 ans chez le cas index, un polype vésical chez le père et un CCR à 45 chez la grand-mère paternelle. Le phénotype tumoral n'a pu être réalisé que sur l'adénome colorectal du cas index montrant un profil MSS.

L'histoire clinique de la famille G associée à un endomètre à l'âge de 35 ans chez le cas index et chez la grand-mère à l'âge de 78 ans. Le phénotype tumoral réalisé sur la tumeur du cas index était normal (MSS avec conservation de l'expression des protéines MMR).

Dans la famille J, le cas index a été atteint d'un CCR à l'âge de 40 ans. Sa grand-mère a présenté un cancer de l'endomètre ainsi qu'un CCR à l'âge de 50 ans. De plus, le grand-père de la même branche, a également été atteint d'un CCR à l'âge de 57 ans. Le phénotype tumoral réalisé sur la tumeur du cas index était MSI avec une conservation de l'expression des protéines MSH2 et MSH6.

Dans la famille P, trois cancers du spectre synchrones ont été diagnostiqués chez le même patient âgé de 57 ans (uretère, rectum, ampoule de Vater), ainsi qu'un kératoacanthome

palpébral. Le phénotype réalisé sur la tumeur de l'ampoule de Vater était MSI avec une IHC non interprétable.

II. Données concernant l'impact des variants sur l'épissage

Pour certains variants, des données expérimentales concernant l'impact sur l'épissage ont été obtenues dans le laboratoire sur l'ARN des patients et/ou à l'aide d'un test *ex vivo* développé dans le laboratoire du CHU de Rouen (Pr T. Frébourg). Les variants testés étaient sans effet détectable sur l'épissage, sauf les variants MSH2 A272V et G669V. L'étude du variant A272V par test *ex vivo* a montré une exclusion mineure de l'exon 5. Pour le variant G669V, le test *ex vivo* a montré une exclusion majeure de l'exon 13, alors que l'analyse *in vitro* par RT-PCR sur l'ARN du patient a mis en évidence un effet mineur (environ 30 % d'exclusion).

A noter que pour le variant MSH2 I884S, localisé dans le dernier exon du gène *MSH2*, l'analyse des transcrits a mis en évidence une perte de l'allèle porteur du variant. Cependant, l'origine de ce résultat est à l'heure actuelle non identifiée.

III. Analyse *in silico* de l'effet des variants sur la protéine

Les variants ont été analysés à l'aide de trois logiciels de prédiction bioinformatiques : SIFT, Align GVGD et PolyPhen.

A. Variants MLH1

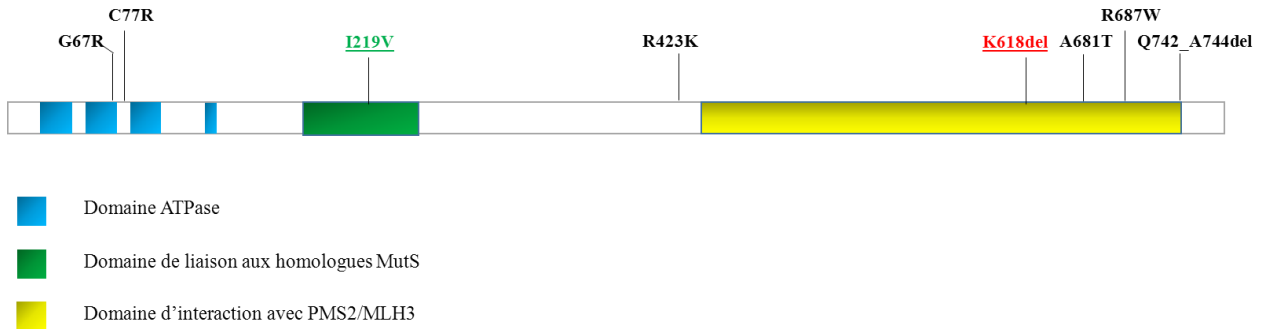


Figure 17 : Représentation schématique de la protéine MLH1 et localisation des variants et des contrôles étudiés.

Souligné : Contrôles positif et négatif.

Les variants C67R et C77R ont été prédits comme délétères par les trois logiciels de prédiction bioinformatiques. Ils touchent en effet des acides aminés très conservés situés dans le domaine ATPase de la protéine (**Figure 17**).

Le variant R423K correspond à un acide aminé faiblement conservé et n'est pas situé dans un domaine fonctionnel important de la protéine. Les trois logiciels le prédisent comme non délétère.

Les variants A681T et R687W touchent respectivement des acides aminés très et moyennement conservés situés dans le domaine d'interaction avec PMS2 et MLH3. Deux logiciels (SIFT et Polyphen) sur trois prédisent un effet délétère.

B. Variants MSH2

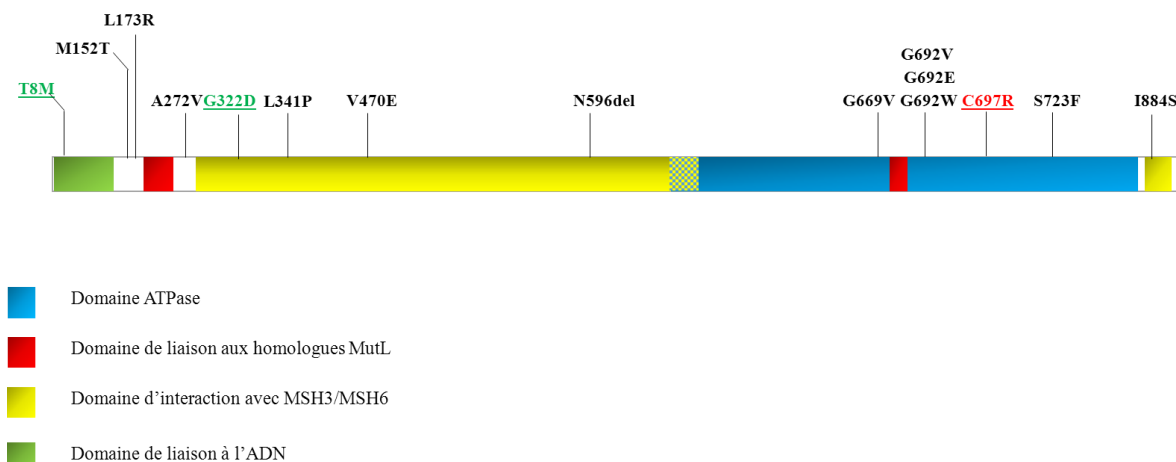


Figure 18 : Représentation schématique de la protéine MSH2 et la localisation des variants et des contrôles étudiés.

Souligné : Contrôles positif et négatifs.

Le variant M152T prédit comme non délétère par les trois logiciels bioinformatiques concerne un acide aminé faiblement conservé, non situé dans un domaine fonctionnel important de la protéine (**Figure 18**).

Pour les autres variants, les logiciels donnent des résultats discordants (cf **Tableau 6**), y compris pour les variants G692W et S723F, correspondant à des acides aminés très conservés du domaine ATPase de la protéine MSH2 et le variant I884S correspondant à un acide aminé très conservé situé dans un domaine d'interaction avec MSH3/MSH6.

IV. Analyse *ex vivo* de l'expression des protéines MMR mutées

Pour étudier l'impact des mutations des gènes MMR sur l'expression des protéines correspondantes, des transfections transitoires ont été réalisées dans des lignées cellulaires cancéreuses coliques humaines déficientes (HCT116, déficiente pour le gène *MLH1* et LoVo, déficiente pour le gène *MSH2*), avec le vecteur d'expression pcDNA3.1 contenant la séquence codante du gène MMR d'intérêt. Au préalable, des mutagenèses dirigées ont été effectuées sur les vecteurs contenant les séquences sauvages, afin d'obtenir les variants.

A. Obtention des constructions

La mutagenèse dirigée a été effectuée afin d'établir, d'une part des constructions correspondant aux variants à tester, et d'autre part des constructions correspondants aux contrôles positifs et négatifs, permettant de vérifier l'intérêt du test. Après mutagenèse dirigée et amplification dans des bactéries, une extraction d'ADN plasmidique a été réalisée sur deux colonies sélectionnées, et les inserts ont été séquencés par séquençage Sanger, afin de vérifier la présence de la mutation attendue, mais aussi l'absence de mutation(s) supplémentaire(s) éventuelle(s). La **Figure 19** présente deux exemples de résultats de séquences obtenues après mutagenèse dirigée.

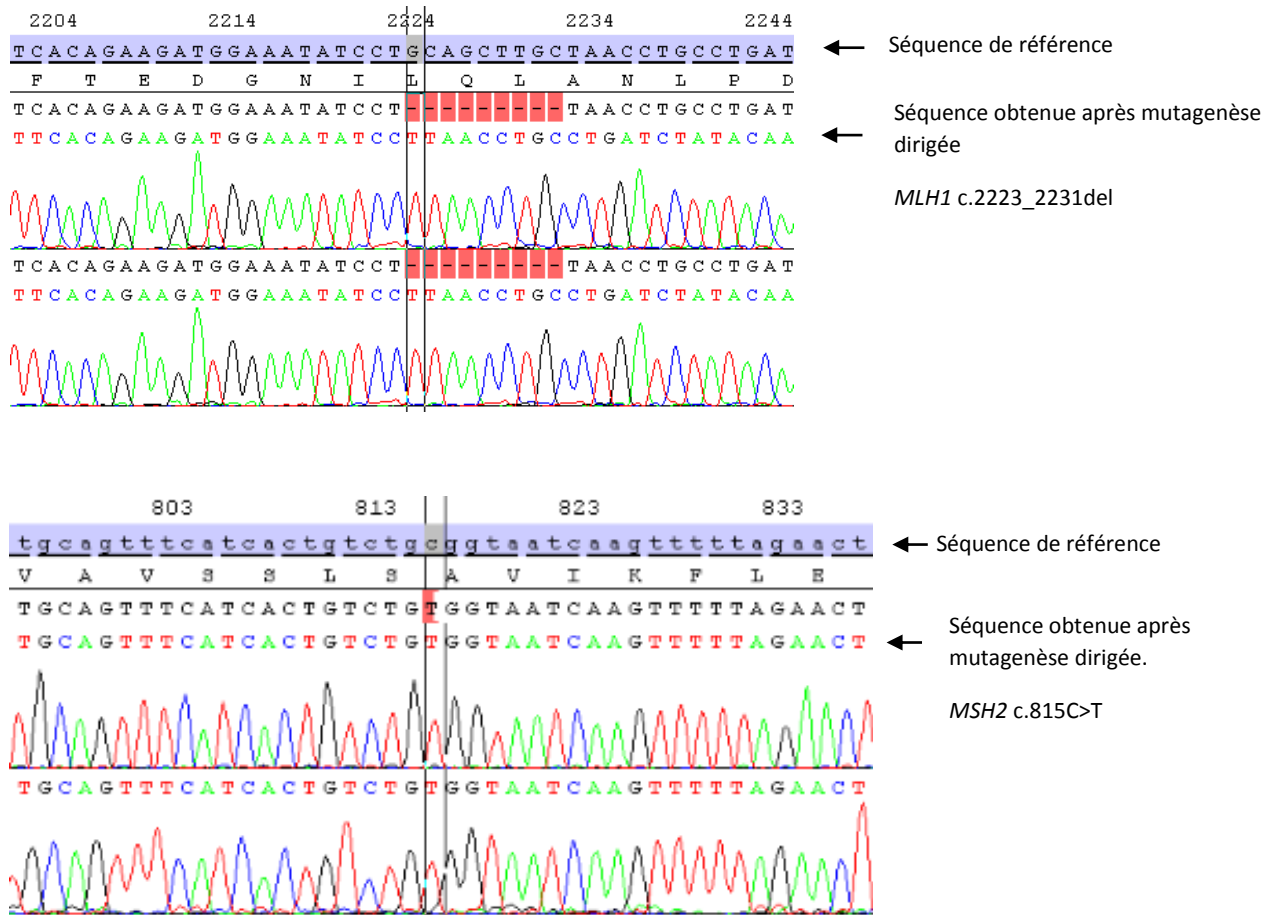


Figure 19 : Exemples représentatifs de séquences obtenues après mutagenèse dirigée
 Exemple de deux variants des gènes *MLH1* c.2223_2231del (Q742_A744del) (séquence du haut) et *MSH2* : c.815C>T (A272V) (séquence du bas). Les séquences des variants montrent la présence d'une délétion de 9 pb (séquence du haut) et la substitution d'une cytosine par une thymine (séquence du bas) par rapport aux séquences de références respectives.

Au total, 21 mutations ont pu être générées avec succès : 8 pour *MLH1* (2 contrôles et 6 variants) et 15 pour *MSH2* (3 contrôles et 12 variants).

B. Etude des contrôles

Des contrôles positifs (*MLH1* K618del et *MSH2* C697R) correspondant à des mutations reconnues délétères affectant des acides aminés très conservés situés dans des domaines fonctionnels importants des protéines correspondantes (domaine d'interaction avec *MLH3/PMS2* et domaine ATPase respectivement) et des contrôles négatifs *MLH1* I219V et *MSH2* T8M et G322D correspondant à des polymorphismes ont été analysés pour réaliser les mises au point techniques.

Les cinétiques d'expression induite des protéines MLH1 et MSH2 sauvages et mutées ont été analysées par WB (**Figure 4**). Concernant la protéine MSH2 sauvage, l'expression était détectable dès 16 h post-transfection, avec un niveau maximal d'expression entre 24 et 48 h et une diminution nette d'expression à partir de 72 h (non montré). Pour la protéine MLH1 sauvage, l'expression devenait détectable entre 16 et 24 h, puis suivait la même cinétique que MSH2.

- Contrôles positifs

Les résultats d'immunomarquage ont révélé une diminution très nette du niveau d'expression de la protéine mutée MLH1 K618del par rapport à la protéine sauvage, quel que soit le temps post-transfection. De façon similaire, les immunomarquages ont révélé une diminution du niveau d'expression de la protéine MSH2 C697R par rapport à la protéine sauvage quel que soit le temps post-transfection (**Figure 20**).

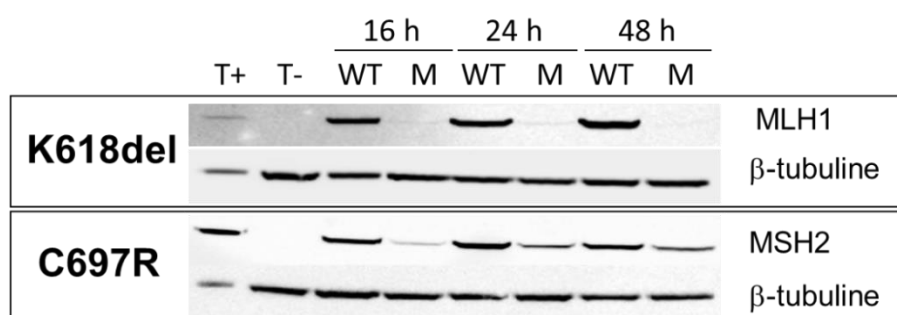


Figure 20 : Analyse cinétique en Western Blot des contrôles positifs
T+ : témoin positif (cellules HCT116 pour MSH2 et cellules LoVo pour MLH1),
T- : témoin négatif (vecteur vide), WT : protéine sauvage M : protéine mutée. La β-tubuline est utilisée comme contrôle de charge.

- Contrôles négatifs

Les résultats d'immunomarquage pour les polymorphismes MLH1 I219V et MSH2 T8M et G322D ont montré des niveaux d'expression similaires à celui des protéines sauvages correspondantes, quel que soit le temps post-transfection (**Figure 21**).

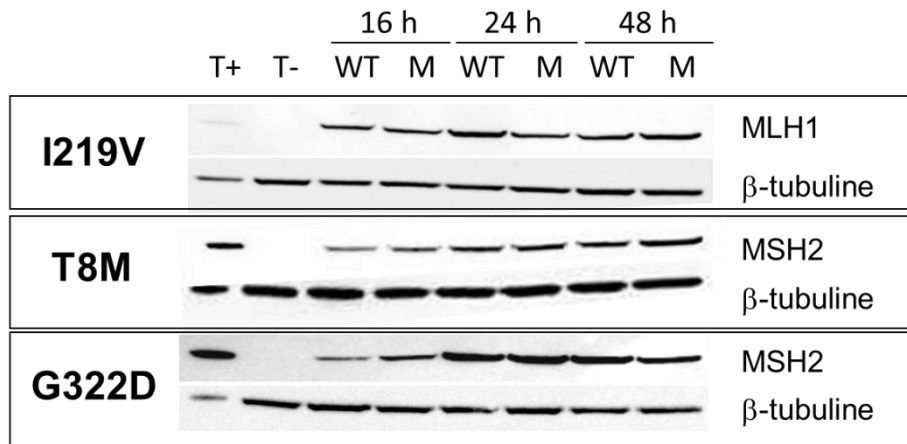


Figure 21 : Analyse cinétique en Western Blot des contrôles négatifs
T+ : témoin positif (cellules HCT116 pour MSH2 et cellules LoVo pour MLH1), T- : témoin négatif (vecteur vide), WT : protéine sauvage, M : protéine mutée.

De plus, aucun immunomarquage n'a été détecté avec le vecteur vide, vérifiant l'absence de protéine endogène et la spécificité du test.

Ces résultats montrent l'intérêt du test pour l'étude des VSI.

C. Etude des variants de signification biologique et clinique inconnue

1. Variants MLH1

Parmi les variants MLH1 étudiés, 5 (G67R, C77R, A681T, R687W et Q742_A744del) ont montré une diminution nette du niveau d'expression par rapport à la protéine sauvage quel que soit le temps post-transfection suggérant un effet délétère. Seul le variant R423K a révélé un niveau d'expression similaire à la protéine sauvage. Quelques résultats représentatifs sont montrés sur la **Figure 22**.

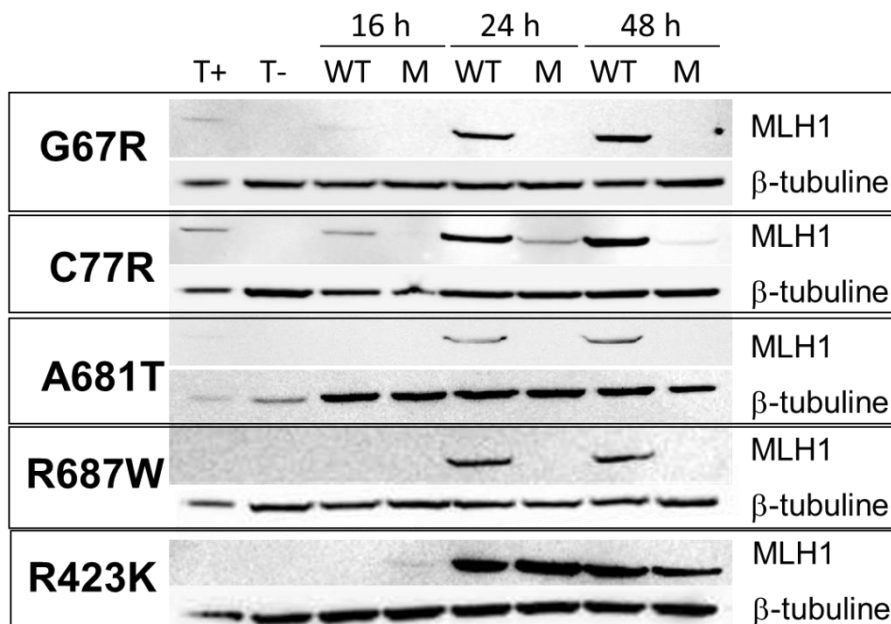


Figure 22 : Analyse cinétique en Western Blot de quelques variants MLH1.

T+ : témoin positif (cellules LoVo), T- : témoin négatif (vecteur vide)

WT : protéine sauvage M : protéine mutée.

2. Variants MSH2

Parmi les variants MSH2 étudiés, quatre ont montré une diminution nette du niveau d'expression par rapport à la protéine sauvage (L341P, S723F, G692W et I884S) dès 16 h après transfection, cinq ont montré une diminution plus faible du niveau d'expression (L173R, A272V, N596del, G692V et G669V) et trois un niveau d'expression similaire à la protéine sauvage (M152T, G692E et V470E).

Quelques résultats représentatifs sont illustrés sur les **Figures 7 et 8**.

Pour les variants A272V et N596del (classés respectivement comme « Neutre » et « délétère »), le niveau d'expression similaire à celui de la protéine sauvage à 16 h après la transfection tandis qu'une diminution du niveau d'expression devenait détectable à partir de 24h après transfection, suggérant un effet délétère (**Figure 23**).

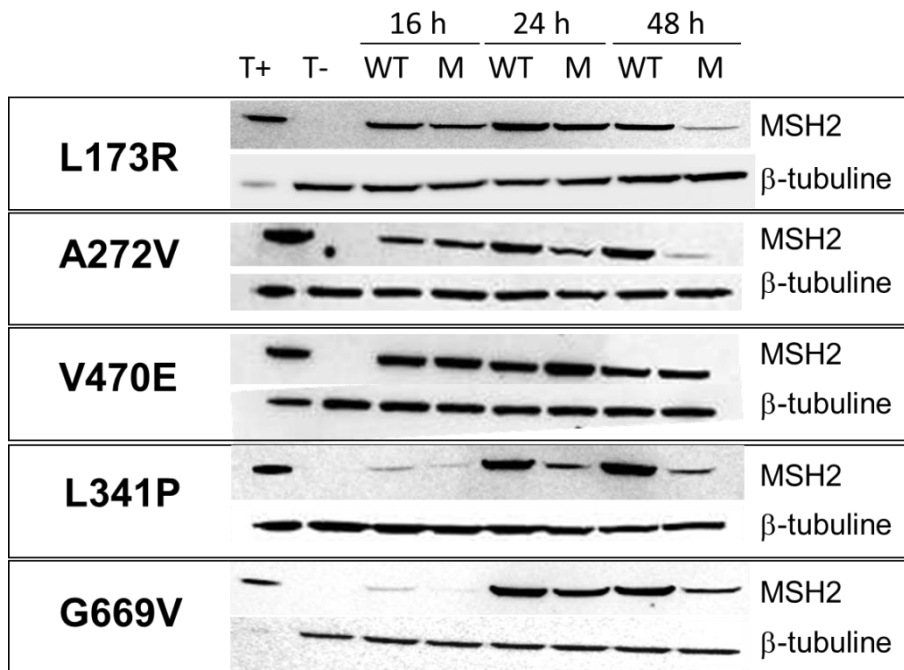


Figure 23 : Analyse cinétique en Western Blot de quelques variants MSH2

T+ : témoin positif (cellules HCT 116), T- : témoin négatif (vecteur vide) WT : protéine sauvage M : protéine mutée.

Nous avons étudié deux variants sélectionnés dans la base de données UMD (G692E et G692V), car touchant le même acide aminé qu'un variant identifié dans notre laboratoire (G692W). Concernant le variant G692W (classé « probablement délétère »), le niveau d'expression était très diminué par rapport à la protéine mutée dès 16 h post-transfection, évoquant un effet délétère (**Figure 24**).

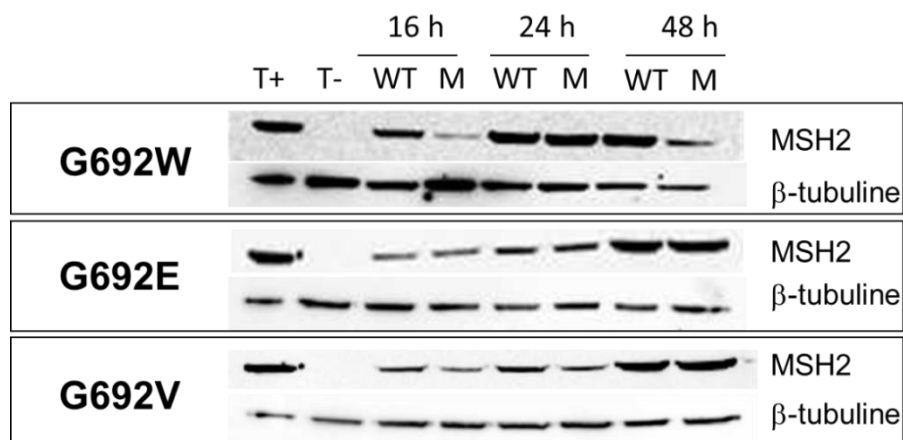


Figure 24: Analyse cinétique en Western Blot des variants du codon 692 de MSH2.

T+ : témoin positif (cellules HCT 116), T- : témoin négatif (vecteur vide) WT : protéine sauvage M : protéine mutée.

En revanche, le niveau d'expression du variant G692E (classé « délétère »), s'est révélé très similaire à celui de la protéine sauvage aux trois temps post-transfection, suggérant un effet neutre. Un résultat intermédiaire a été observé pour le variant G692V (classé « délétère »), avec une légère diminution d'expression par rapport à la protéine sauvage, détectable uniquement à 16 et 24 h post-transfection.

Discussion

Le conseil génétique approprié d'un patient suspect de syndrome de Lynch nécessite un diagnostic précis, basé sur la nature de la mutation génétique identifiée. Le risque de cancer résultant de mutations non tronquantes, en particulier de mutations faux sens, est difficile à prédire et ne peut donc être utilisé pour le conseil génétique, conduisant à la réalisation d'une surveillance chez tous les apparentés à risque. Les résultats de tests fonctionnels basés sur l'étude du système MMR sont considérés comme des critères importants pour leur interprétation (95)(82)(96)(97).

Avant d'évaluer l'impact possible d'un variant sur la fonction protéique, il est nécessaire de s'assurer en premier lieu que celui n'induit pas une altération de l'épissage des ARN correspondants, en créant des sites cryptiques d'épissage ou en altérant des sites de liaison pour des protéines régulatrices de l'épissage. Les études menées sur les ARN des patients ou grâce à des tests *ex vivo* d'épissage ont révélé qu'une proportion non négligeable de variants des gènes MMR ont un effet majeur sur l'épissage, avec pour conséquence la dégradation de l'ARN via le mécanisme de NMD (*Nonsense-Mediated ARNm Decay*) ou la synthèse d'une protéine anormale (83).

Concernant l'impact des variants sur la fonction des protéines MMR, divers tests fonctionnels ont été rapportés dans la littérature (résumés dans (95)(97)(86)(98)).

La grande conservation du système MMR entre les espèces et la relative facilité pour cibler un gène chez la levure afin de créer des souches porteuses d'un variant d'un gène MMR font de la levure *Saccharomyces cerevisiae* un outil très utilisé pour l'étude de la fonction MMR *in vivo*. Dans ces tests, la surexpression d'une protéine MLH1 (ou MSH2) humaine normale dans la souche de levure sauvage entraîne une déficience du système MMR endogène, alors que la surexpression d'une protéine MLH1 (ou MSH2) humaine anormale permet de maintenir l'intégrité de la fonction de réparation de l'ADN chez la levure. Ce phénomène,

appelé effet mutateur dominant, est lié à la compétition exercée par la protéine humaine vis-à-vis de la protéine de levure pour la dimérisation avec la protéine PMS2 (ou MSH6) de levure. Ceci a pour conséquence la formation d'un complexe peu efficace par rapport au complexe endogène (91)(87)(99). Le problème majeur de ce type de test est l'impossibilité d'étudier des variants non conservés entre l'Homme et la levure. De plus, en dépit des similarités dans le mécanisme du système MMR entre la levure et l'Homme, il peut exister des différences majeures qui affectent l'interprétation des tests basés sur la levure, comme des modifications post-traductionnelles, des interactions entre protéines ou d'autres aspects de la régulation du système MMR.

D'autres tests ont été développés, qui utilisent des extraits protéiques de cellules humaines exprimant les variants ou des protéines recombinantes purifiées obtenues dans des cellules d'insecte (*Spodoptera frugiperda* (*Sf9*)) et qui évaluent la capacité à réparer une construction d'ADN comprenant un mésappariement (92)(63)(100). Ils ont l'avantage d'étudier des variants quel que soit le degré de conservation parmi les espèces de l'acide aminé touché. D'autres tests visent à mesurer une conséquence biologique ou biochimique spécifique du variant, comme l'activité ATPasique (101), l'interaction entre les protéines (102) ou la liaison à l'ADN (92). Cependant, en raison de la lourdeur de ces techniques, elles ne sont pas largement applicables en pratique diagnostique et font plutôt l'objet de travaux de recherches focalisés sur un nombre restreint de variants. Récemment, Drost *et al.*, ont développé un test fonctionnel « haut débit » permettant d'évaluer rapidement la capacité de réparation des variants. L'approche utilisée s'affranchit des difficultés techniques du clonage et de la purification protéique et fournit des données quantifiables (88)(93). Cependant, ce test très complexe techniquement et utilisant de la méthionine-S³⁵ pour vérifier les niveaux d'expression reste difficile à mettre en place en laboratoire hospitalier.

Des tests fonctionnels plus simples ont été développés, qui sont basés sur l'induction de l'expression des gènes MMR d'intérêt dans des lignées cellulaires cancéreuses déficientes. Ils

permettent d'étudier l'impact des variants sur l'expression/la stabilité des protéines correspondantes. C'est ce type de test que nous avons mis en point, en nous basant sur les travaux de Brieger *et al.* et Trojan *et al.* (103)(100).

Les premiers tests ont consisté à étudier des variants reconnus comme clairement délétères ou neutres pour vérifier l'intérêt du test.

Nous avons tout d'abord étudié comme contrôles positifs les mutations MLH1 K618del et MSH2 C697R. Ces variants touchent des acides aminés très conservés, situés respectivement dans le domaine d'interaction avec la sous-unité partenaire PMS2 et le domaine ATPase. Divers tests fonctionnels réalisés chez la levure et dans des cellules humaines ont permis d'établir leur caractère pathogène (103)(87)(91)(94). L'étude de ces deux mutations a montré, comme attendu, une expression protéique plus faible par rapport à la protéine sauvage correspondante.

De même, l'étude des polymorphismes fréquents MLH1 G322D et MSH2 I219V et T8M, utilisés comme contrôles négatifs, a permis d'obtenir les résultats attendus, à savoir une expression comparable à celle de la protéine sauvage correspondante (93) (88) (87) (100) (99) (92).

Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus précédemment par Brieger et Trojan et permettent de valider l'intérêt du test pour aider à la classification des VSI (103)(100).

Au total, nous avons étudié 18 variants : 6 variants MLH1 et 12 MSH2, qui ont été classés comme « neutre », « probablement neutre », « VSI », « probablement délétère » ou encore « délétère » sur la base des éléments disponibles. Parmi eux, dix n'ont jamais été étudiés au niveau protéique.

La plupart de nos résultats sont cohérents avec le résultat du phénotype tumoral et les tests fonctionnels décrits dans la littérature, qu'il s'agisse de tests *in vitro* ou réalisés chez la levure ou dans des systèmes homologues.

- Les variants MLH1 G67R et MSH2 S723F, classés comme « probablement délétères » dans la base UMD et le variant MLH1 C77R classé comme « VSI » touchent des acides aminés très conservés. Nos résultats ont mis en évidence pour ces variants une diminution du niveau d'expression de la protéine mutée par rapport à la protéine sauvage. Les tests décrits dans la littérature ont également montré pour le variant G67R une diminution d'expression associée à une forte perturbation dans l'interaction avec PMS2 et dans la réparation des mésappariements (87)(91)(88). De même, nos résultats concernant le variant S723F sont en accord avec ceux obtenus précédemment dans un système hétérologue et dans des cellules humaines (93). Ceci renforce le classement des deux variants en mutation délétère. Enfin, concernant le variant MLH1 C77R, nos résultats confortent les données disponibles (prédictions bioinformatiques et résultats des tests fonctionnels (étude de l'expression dans des cellules rénales déficientes, tests *in vitro* de la fonction MMR, test chez la levure)) en faveur d'un caractère pathogène du variant et apportent donc des arguments supplémentaires pour classer ce variant en mutation délétère (63)(90) (89).
- Les variants MLH1 R423K et MSH2 M152T, classés comme « probablement neutres », touchent des acides aminés faiblement conservés et ne sont pas situés dans des domaines fonctionnels essentiels des protéines correspondantes. Par ailleurs, le variant R423K a été décrit dans une famille avec co-occurrence d'une mutation MLH1 tronquante, ce qui a contribué à le classer en probablement neutre dans la base de données UMD. Ces variants n'ont jamais été étudiés auparavant. Nos résultats n'ont pas montré d'effet de ces variants sur les protéines correspondantes, apportant ainsi un argument supplémentaire pour l'absence de leur implication dans la pathologie.

- De même, aucune donnée fonctionnelle n'est disponible dans la littérature concernant l'impact du variant MLH1 Q742_A744del classé comme « probablement délétère ». De plus, aucune donnée n'était disponible *via* les outils de prédiction bioinformatique, car ces derniers ne sont pas adaptés à l'étude des insertions/délétions. Les seuls arguments en faveur du caractère délétère pour ce variant étaient le phénotype tumoral (MSI avec perte d'expression des protéines MLH1) et l'absence de co-occurrence. Notre test est le premier à notre connaissance qui suggère un effet pathogène pour ce variant en mettant en évidence une diminution nette d'expression de la protéine mutée par rapport à la protéine sauvage correspondante.
- La mutation L341P a été identifiée dans notre laboratoire dans plus de 20 familles. Une étude mutationnelle chez certains membres de ces familles a permis de montrer que la mutation coségrégait avec la maladie (LOD score > 3). Par ailleurs, une analyse des polymorphismes et de microsatellites a permis de montrer qu'il s'agit d'une mutation fondatrice. Les résultats obtenus par notre test permettent de confirmer ceux d'une première étude réalisée dans notre laboratoire, qui avaient mis en évidence une diminution de l'expression de la protéine et amené à classer ce variant en mutation délétère.
- Le variant MSH2 I884S, classé comme « probablement délétère » dans la base UMD, concerne un acide aminé moyennement conservé situé dans un domaine d'interaction avec MSH3/MSH6. Les prédictions bioinformatiques concernant ce variant sont contradictoires. Cependant, l'étude des transcrits réalisée dans notre laboratoire a montré que ce variant, situé dans le dernier exon du gène (exon 16), est associé à un déséquilibre d'expression allélique (absence de transcrits porteurs du variants). La cause de cette anomalie n'a cependant pas pu être identifiée. De façon étonnante, notre test montre que ce variant pourrait aussi avoir un effet majeur sur la stabilité protéique.

Ainsi, pour ces variants, nos résultats cohérents avec les éléments cliniques, le phénotype tumoral et les tests fonctionnels disponibles, apportent des arguments supplémentaires qui devraient permettre d'aider au classement des variants de signification incertaine.

Quatre variants du gène *MSH2* ont montré des effets mineurs sur l'expression protéique, rendant l'interprétation plus délicate.

- Parmi ces variants, deux (*MSH2* A272V et G669V) ont montré un effet mineur sur l'épissage. Le variant *MSH2* A272V touche un acide aminé moyennement conservé non situé dans un domaine fonctionnel de la protéine. Il a été classé « neutre » sur la base de phénotypes tumoraux discordants (une famille rapportée avec tumeur MSI et perte de l'expression de *MSH2* avec conservation de l'expression *MSH6* alors que le phénotype tumoral provenant de deux autres familles était MSS avec conservation de l'expression des protéines MMR), l'association dans une famille d'une mutation « probablement délétère » (L173R) et de tests fonctionnels décrivant une absence d'impact sur l'expression et la fonction MMR (92). Le variant *MSH2* G669V concerne un acide aminé très conservé dans le domaine ATPase. Il a été classé comme « probablement délétère » sur la base de plusieurs phénotypes tumoraux concordants (MSI avec perte d'expression de *MSH2* et *MSH6*) et du résultat d'une analyse de coségrégation (LOD score = 20). Pour ces variants, nous avons observé une diminution faible du niveau de l'expression de la protéine mutée par rapport à la protéine sauvage. Ces résultats suggèrent que, outre leurs impacts sur l'épissage, ces variants pourraient aussi avoir une influence sur l'expression ou la stabilité des protéines *MSH2*.
- Les variants *MSH2* L173R et N596del touchent des acides aminés moyennement conservés non situés dans un domaine fonctionnel de la protéine. Concernant le variant L173R, les prédictions bioinformatiques vis-à-vis de son impact sur la protéine sont

contradictoires. De plus, seule une étude a étudié l'effet du variant sur la protéine, qui a montré une expression conservée, associée à une perte de la fonction de réparation des mésappariements (92). Concernant le variant N569del, une étude a analysé l'impact sur l'interaction MSH3/MSH6 et s'est révélée normale (104). Une autre étude a analysé la fonction MMR dans un système *in vitro* et a montré une diminution de la capacité de réparation non significative (93). Nos résultats pour ces variants ont révélé une diminution faible de leur expression ne permettant pas de conclure concernant leur effet sur la protéine.

Les résultats faiblement positifs obtenus pour ces quatre variants n'est cependant pas à sous-estimer, car des effets cumulatifs d'allèles hypomorphes ont été décrits avec une traduction sur le plan biologique et clinique (105) (106).

Enfin, certains résultats obtenus sont en désaccord avec les informations disponibles et sont donc difficiles à interpréter.

- Le variant MSH2 V470E, classé « VSI » dans la base de données UMD, a été identifié chez un patient de 40 ans atteint d'un CCR, dont le phénotype tumoral a mis en évidence une instabilité microsatellitaire et une conservation de l'expression des protéines MSH2 et MSH6. Les prédictions bioinformatiques concernant ce variant qui touchent un acide aminé très conservé, sont contradictoires. Le résultat de notre test est en parfait accord avec le résultat de l'IHC indiquant une absence d'impact sur la stabilité protéique. Toutefois, il ne permet pas de juger de la fonctionnalité du système MMR, car comme l'IHC, le WB peut montrer une expression protéique normale, alors que la protéine est fonctionnellement inactive (87).
- Concernant le variant MLH1 R687W, notre résultat a montré une absence totale d'expression, ce qui est en contradiction avec son classement actuel en « probablement neutre ». Ce variant a été décrit chez un patient atteint d'un CCR diagnostiqué à l'âge de

25 ans et dont la tumeur était MSI. Le variant a été décrit dans une autre famille et a permis de mettre en évidence l'absence de coségrégation justifiant son classement en « probablement neutre ». Les prédictions bioinformatiques sont contradictoires pour ce variant (en faveur d'un caractère délétère pour SIFT et PolyPhen et bénin pour Align GVGD). Cependant, en accord avec le résultat de notre étude, un test réalisé chez la levure a montré une absence d'effet mutateur dominant en faveur d'un caractère délétère, tandis qu'un effet intermédiaire a été mis en évidence dans un système homologue (87). Ainsi, des études complémentaires sont nécessaires pour ce variant.

- De façon similaire, les résultats obtenus pour le variant MLH1 A681T, classé « probablement causal » par le Réseau, sont difficiles à interpréter. Il concerne un acide aminé très conservé situé dans le domaine d'interaction avec PMS2/MLH3. De nombreux tests fonctionnels ont été réalisés avec des résultats discordants. Deux études se sont intéressées à l'impact de ce variant sur l'interaction avec la protéine PMS2 et les résultats sont contradictoires (63)(104). L'expression protéique du variant a été étudiée dans deux lignées : la lignée HCT116 et la lignée 293T (fibroblastes rénaux issus de tissus embryonnaires humains) qui ont mis en évidence respectivement une conservation et une diminution mineure de l'expression du variant, contrairement à nos résultats qui ont révélé une diminution du niveau d'expression du variant par rapport à la protéine mutée. Notre résultat est cependant en accord avec le phénotype tumoral (MSI avec perte d'expression de MLH1 et PMS2, retrouvé dans plusieurs familles rapportées dans la base UMD)(87)(63). L'étude de la fonction MMR réalisée chez la levure est quant à elle en faveur d'un effet délétère du variant (91)(87). Les résultats conflictuels suggèrent que les VSI peuvent avoir différents effets selon le laboratoire et le système utilisé. Ainsi, les résultats d'une seule étude fonctionnelle doivent être interprétés avec précaution. L'analyse de ce variant par notre technique nécessitera toutefois d'être répliquée.

➤ Le variant MSH2 G692W, classé « probablement délétère » touche un acide aminé très conservé au sein du domaine ATPase. Il n'a jamais été étudié auparavant. Deux autres variants (G692E et G692V) ont été décrits touchant le même acide aminé. Les résultats de plusieurs phénotypes tumoraux (MSI et perte d'expression des protéines MSH2 et MSH6), ainsi que les histoires familiales répondant aux critères d'Amsterdam 1 ou 2 ont entraîné le classement de ces variants en « délétère ». Pour le variant G692W, nos résultats ont montré une diminution nette du niveau d'expression, alors que pour les variants G692V et G692E, le niveau d'expression était légèrement diminué ou similaire à celui de la protéine sauvage, en désaccord avec les résultats des phénotypes tumoraux pour ces derniers. De façon intéressante, le variant G692W est le seul pour lequel toutes les prédictions bioinformatiques sont en faveur d'un caractère délétère, lié probablement à la distance physico-chimique élevée entre résidus de Glycine et de Tryptophane, alors que cette distance n'est pas retrouvée avec les résidus d'Acide Glutamique et de Valine. Les données *in silico* sont en donc en accord avec nos résultats montrant un effet plus important du variant G692W sur la stabilité protéique. Une hypothèse expliquant la discordance avec les phénotypes tumoraux peut être la co-occurrence, dans les familles où les variants G692E et G692V ont été identifiés, d'une mutation délétère du gène MSH2 non repérée. Notre analyse pour ces variants nécessite tout de même d'être répétée et si les résultats se confirment, une révision du classement de ces variants devrait être envisagée.

Ainsi, notre test, relativement simple à mettre en place, a permis d'obtenir des résultats qui, pour la plupart, sont en accord avec ceux obtenus avec des tests fonctionnels plus complexes. La mise en place de ce type de test est d'autant plus importante que la plupart des mutations identifiées dans les gènes MMR sont des mutations dites « privées », peu ou pas rapportées dans la littérature. Ainsi, très peu ont fait l'objet d'analyses poussées. Ce test

pourrait donc se révéler très utile pour aider à la classification des variants identifiés dans le laboratoire, ainsi que dans les autres laboratoires du Réseau National d'Oncogénétique Digestive.

Cependant, certaines limites de notre test sont à relever.

En effet, notre test n'évalue qu'un seul aspect du système MMR : l'expression protéique. Or, une altération de la fonction MMR peut s'observer malgré une expression protéique conservée. Dans notre étude, le variant MSH2 V470E s'est révélé associé à une conservation de l'expression protéique de façon similaire à ce qui a été observé dans la tumeur du patient. De même, pour le variant MLH1 T82A, une altération de la fonction MMR a été observée dans des analyses sur la levure et les cellules humaines, alors que l'expression protéique était conservée dans un test comparable au nôtre (87). Plusieurs variants ont ainsi été décrits présentant des discordances entre la fonction de réparation MMR et l'expression des protéines MMR (92)(87)(107)(88). C'est pourquoi, la fonction de réparation MMR nécessiterait d'être explorée avant de conclure à l'absence de pathogénicité pour un variant, notamment lorsque le résultat de l'IHC et de la recherche de l'instabilité microsatellitaire sont discordants. Par ailleurs, un variant peut perturber l'interaction avec la protéine partenaire et entraîner sa délocalisation dans le cytoplasme, empêchant la formation d'un hétérodimère fonctionnel, alors qu'une conservation de l'expression protéique sera mise en évidence (63) (108).

De plus, le rôle du système MMR dans la carcinogenèse *via* son rôle dans la signalisation des dommages de l'ADN et le déclenchement de l'apoptose n'est pas à négliger. Une étude a montré, de manière intéressante, qu'une faible concentration de protéine MLH1, permettait un maintien de la fonction de réparation de l'ADN, alors que l'activation du contrôle du cycle cellulaire et le déclenchement de l'apoptose, particulièrement dans les cellules épithéliales à prolifération rapide exposées au stress et aux carcinogènes, nécessite un

niveau d'expression élevé (109). Ceci expliquerait que des cellules mutées pour le gène *MLH1* acquièrent des mutations accélérant leur prolifération, au lieu de déclencher l'apoptose, et par ce mécanisme conduisent à la tumorigenèse. Ainsi, des études visent à évaluer l'impact des variants sur ces phénomènes de régulation du cycle cellulaire pouvant être influencé par le niveau d'expression protéique MMR (110).

Un autre inconvénient de notre test fonctionnel est le fait qu'il est actuellement difficile de valider sa sensibilité et sa spécificité, posant des problèmes d'interprétation, lorsque la diminution d'expression n'est pas importante. L'analyse d'un plus large panel de variants bien étudiés devrait permettre d'évaluer sa sensibilité et sa spécificité. Un autre problème concerne la robustesse du test, dépendante de plusieurs facteurs tels que les conditions de culture, la qualité et la stabilité des anticorps utilisés ou encore l'efficacité de la transfection. Pour pallier à ce dernier problème, l'intégration d'un témoin interne d'efficacité de transfection est à envisager.

Enfin, un désavantage de l'utilisation de système d'expression, tel que le nôtre est l'expression ectopique et donc non régulée du variant pouvant induire des artefacts. Des études récentes sur le système MMR ont permis l'introduction de VSI dans le gène *Msh2* endogène de cellules souches murines en réalisant un ciblage génique à l'aide d'oligonucléotides dirigés. Par cette technique, le VSI est exprimé à partir du promoteur endogène, permettant une régulation normale de l'expression du gène. De plus, les éventuels artefacts liés à l'utilisation de cellules transformées sont évités (111). Enfin, les cellules souches embryonnaires murines peuvent être utilisées pour évaluer directement l'effet du VSI sur la tumorigenèse. Néanmoins, le problème reste la difficulté technique et l'utilisation de gènes MMR murins.

En raison des limites décrites ci-dessus, le résultat de notre test fonctionnel ne peut à lui seul permettre d'interpréter l'impact d'un variant sur la protéine. Ainsi, il est important de corréler l'ensemble des données fonctionnelles obtenues par des méthodes variées, notamment lorsque les résultats ne sont pas en faveur d'un caractère délétère.

Un arbre décisionnel hiérarchisé en trois étapes a été proposé afin de stratifier les résultats issus de divers tests fonctionnels (96)(98). Il consiste tout d'abord à réaliser l'analyse génétique du patient suspect d'être atteint du syndrome de Lynch. Lorsqu'un VSI est mis en évidence, des tests basés sur la connaissance de la biologie du système MMR, comme l'évaluation des variants *in silico* et l'analyse de l'activité du VSI à l'aide de tests fonctionnels *in vitro* évaluant la fonction MMR sont réalisés. Si les résultats issus de ces deux premières étapes ne sont pas concluants, les variants restant non classés nécessitent la réalisation de tests supplémentaires basés sur l'étude de stabilité protéique, de la localisation subcellulaire ou encore des interactions protéiques. L'utilisation de cette stratégie a été évaluée et s'est révélée efficace pour classer les VSI (96)

Toutefois, au terme de ces différents essais, certains résultats peuvent toujours se révéler non contributifs. Il est important d'inclure les données cliniques car les altérations biochimiques sévères peuvent se refléter sur les caractéristiques phénotypiques comme l'âge de découverte et la présence d'instabilité microsatellitaire, alors que les variants avec peu ou pas d'altération dans la fonctionnalité sont associés à un phénotype clinique variable (63). De plus, la combinaison de données indirectes, telles que la co-occurrence d'autres mutations, la coségrégation de la mutation avec la maladie, l'histoire familiale, les caractéristiques tumorales ainsi que l'absence du variant dans la population générale, combinés à des preuves directes, comme les résultats d'analyses *in silico* et les différents tests fonctionnels sont des critères importants à prendre en compte pour évaluer la probabilité de l'impact d'un variant sur la maladie, notamment lorsque les résultats de tests fonctionnels sont difficiles à interpréter, comme les résultats intermédiaires (112) (98).

En conclusion, l'approche combinée reste la meilleure stratégie pour évaluer la responsabilité d'un variant dans la maladie (98). Seule une intégration fine de l'ensemble des données cliniques, génétiques, pathologiques, *in silico*, *in vitro* ou *ex vivo* et possiblement *in vivo* fourniront une évaluation fiable de l'impact des variants dans la prédisposition au cancer.

Conclusion

Nous avons mis en place un test permettant d'évaluer de manière directe l'impact des variants des gènes MMR sur l'expression et la stabilité des protéines correspondantes, en induisant l'expression du variant dans des cellules coliques humaines déficientes et en comparant son niveau d'expression à celui de la protéine sauvage. Notre test reproduit ce qui peut être observé en immunohistochimie dans les tumeurs de patients atteints de syndrome de Lynch, à savoir une perte d'expression de la protéine MMR défectueuse. Les conditions techniques, relativement simples par rapport aux autres tests fonctionnels décrits dans la littérature, permettent d'envisager l'implantation de ce test dans un laboratoire diagnostique. Associé à d'autres arguments, le résultat devrait aider à l'interprétation de certains VSI en attente d'arguments pour leur classification et ainsi permettre leur utilisation pour le conseil génétique. Toutefois des contrôles supplémentaires, ainsi que l'optimisation de nos conditions techniques sont nécessaires avant de pouvoir employer ce test.

Références bibliographiques

1. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med*. 13 juill 2000;343(2):78-85.
2. Esteban-Jurado C, Garre P, Vila M, Lozano JJ, Pristoupilova A, Beltrán S, et al. New genes emerging for colorectal cancer predisposition. *World J Gastroenterol WJG*. 28 févr 2014;20(8):1961-1971.
3. Abulí A, Bessa X, González JR, Ruiz-Ponte C, Cáceres A, Muñoz J, et al. Susceptibility genetic variants associated with colorectal cancer risk correlate with cancer phenotype. *Gastroenterology*. sept 2010;139(3):788-796, 796.e1-6.
4. Hosking FJ, Dobbins SE, Houlston RS. Genome-wide association studies for detecting cancer susceptibility. *Br Med Bull*. 2011;97:27-46.
5. De la Chapelle A. The incidence of Lynch syndrome. *Fam Cancer*. 2005;4(3):233-237.
6. Lynch HT, Chapelle A de la. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet*. 11 janv 1999;36(11):801-818.
7. Vasen HFA, Watson P, Mecklin J, 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):1453-1456.
8. Zhang X, Li J. Era of universal testing of microsatellite instability in colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol*. 15 févr 2013;5(2):12-19.
9. Lahue RS, Au KG, Modrich P. DNA mismatch correction in a defined system. *Science*. 14 juill 1989;245(4914):160-164.
10. Hsieh P, Yamane K. DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mech Ageing Dev*. août 2008;129(7-8):391-407.
11. Jacob S, Praz F. DNA mismatch repair defects: role in colorectal carcinogenesis. *Biochimie*. janv 2002;84(1):27-47.
12. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*. juin 2010;138(6):2073-2087.e3.
13. Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol*. mai 2006;7(5):335-346.
14. Umar A, Risinger JJ, Hawk ET, Barrett JC. Testing guidelines for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*. févr 2004;4(2):153-158.
15. Boland CR, Koi M, Chang DK, Carethers JM. The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch syndrome: from bench to bedside. *Fam Cancer*. 2008;7(1):41-52.

16. Bonadona V, Bonaiti 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 J Am Med Assoc.* 8 juin 2011;305(22):2304-2310.
17. Kohlmann W, Gruber SB. Lynch Syndrome. In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, Dolan CR, Fong C-T, Stephens K, éditeurs. *GeneReviews™* Seattle (WA): University of Washington, Seattle; Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1211/>
18. Vasen HFA, Blanco I, Aktan-Collan K, Gopie JP, Alonso A, Aretz S, et al. Revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): recommendations by a group of European experts. *Gut.* 6 janv 2013;62(6):812-823.
19. Barrow E, Hill J, Evans DG. Cancer risk in Lynch Syndrome. *Fam Cancer.* juin 2013;12(2):229-240.
20. 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):419-428.
21. Barnetson RA, Tenesa A, Farrington SM, Nicholl ID, Cetnarskyj R, Porteous ME, et al. Identification and survival of carriers of mutations in DNA mismatch-repair genes in colon cancer. *N Engl J Med.* 29 juin 2006;354(26):2751-2763.
22. Goel A, Nagasaka T, Spiegel J, Meyer R, Lichliter WE, Boland CR. Low frequency of Lynch syndrome among young patients with non-familial colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc.* nov 2010;8(11):966-971.
23. Davies RJ, Miller R, Coleman N. Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. *Nat Rev Cancer.* mars 2005;5(3):199-209.
24. Klarskov L, Holck S, Bernstein I, Okkels H, Rambech E, Baldetorp B, et al. Challenges in the identification of MSH6-associated colorectal cancer: rectal location, less typical histology, and a subset with retained mismatch repair function. *Am J Surg Pathol.* sept 2011;35(9):1391-1399.
25. Jass JR. Adenomas and a family history of colorectal cancer. *Gut.* 1995;37(2):297-8.
26. De Jong AE, Morreau H, Van Puijenbroek M, Eilers PH c, Wijnen J, Nagengast FM, et al. The role of mismatch repair gene defects in the development of adenomas in patients with HNPCC. *Gastroenterology.* janv 2004;126(1):42-48.
27. Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology.* oct 2008;135(4):1079-1099.
28. 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.
29. Lu KH, Dinh M, Kohlmann W, Watson P, Green J, Syngal S, et al. Gynecologic cancer as a « sentinel cancer » for women with hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. *Obstet Gynecol.* mars 2005;105(3):569-574.

30. Hampel H, Frankel W, Panescu J, Lockman J, Sotamaa K, Fix D, et al. Screening for Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) among endometrial cancer patients. *Cancer Res.* 1 août 2006;66(15):7810-7817.
31. Shia J, Holck S, Depetris G, Greenson JK, Klimstra DS. Lynch syndrome-associated neoplasms: a discussion on histopathology and immunohistochemistry. *Fam Cancer.* juin 2013;12(2):241-260.
32. Watson P, Butzow R, Lynch HT, Mecklin JP, Jarvinen HJ, Vasen HFA, et al. The clinical features of ovarian cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gynecol Oncol.* août 2001;82(2):223-228.
33. Niskakoski A, Kaur S, Renkonen-Sinisalo L, Lassus H, Järvinen HJ, Mecklin J-P, et al. Distinct molecular profiles in Lynch syndrome-associated and sporadic ovarian carcinomas. *Int J Cancer J Int Cancer.* 1 déc 2013;133(11):2596-2608.
34. Van der Post RS, Kiemeny LA, Ligtenberg MJL, Witjes JA, Hulsbergen-van de Kaa CA, Bodmer D, et al. Risk of urothelial bladder cancer in Lynch syndrome is increased, in particular among MSH2 mutation carriers. *J Med Genet.* 30 juin 2010;47(7):464-470.
35. Barrow PJ, Ingham S, O'Hara C, Green K, McIntyre I, Lalloo F, et al. The spectrum of urological malignancy in Lynch syndrome. *Fam Cancer.* mars 2013;12(1):57-63.
36. Engel C, Loeffler M, Steinke V, Rahner N, Holinski-Feder E, Dietmaier W, et al. Risks of less common cancers in proven mutation carriers with lynch syndrome. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 10 déc 2012;30(35):4409-4415.
37. Win AK, Lindor NM, Young JP, Macrae FA, Young GP, Williamson E, et al. Risks of primary extracolonic cancers following colorectal cancer in lynch syndrome. *J Natl Cancer Inst.* 19 sept 2012;104(18):1363-1372.
38. Win AK, Lindor NM, Jenkins MA. Risk of breast cancer in Lynch syndrome: a systematic review. *Breast Cancer Res BCR.* 19 mars 2013;15(2):R27.
39. Grover S, Syngal S. Hereditary pancreatic cancer. *Gastroenterology.* oct 2010;139(4):1076-1080, 1080.e1-2.
40. Grandval P, Barouk-Simonet E, Bronner M, Buisine M-P, Moretta J, Tinat J, et al. Is the controversy on breast cancer as part of the Lynch-related tumor spectrum still open? *Fam Cancer.* déc 2012;11(4):681-683.
41. Plocharczyk EF, Frankel WL, Hampel H, Peters SB. Mismatch repair protein deficiency is common in sebaceous neoplasms and suggests the importance of screening for Lynch syndrome. *Am J Dermatopathol.* avr 2013;35(2):191-195.
42. Dipro S, Al-Otaibi F, Alzahrani A, Ulhaq A, Al Shail E. Turcot syndrome: a synchronous clinical presentation of glioblastoma multiforme and adenocarcinoma of the colon. *Case Rep Oncol Med.* 2012;2012:720273.
43. Vasen HFA, Ghorbanoghli Z, Bourdeaut F, Cabaret O, Caron O, Duval A, et al. Guidelines for surveillance of individuals with constitutional mismatch repair-deficiency proposed by the European Consortium « Care for CMMR-D » (C4CMMR-D). *J Med Genet.* 20 févr 2014;

44. Olschwang S, Bonaïti 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 (Paris)*. avr 2004;91(4):303-315.
45. Lynch HT, Lynch JF, Attard TA. Diagnosis and management of hereditary colorectal cancer syndromes: Lynch syndrome as a model. *CMAJ Can Med Assoc J J Assoc Medicale Can*. 1 sept 2009;181(5):273-280.
46. 1042-chirurgie-prophylactique-des-cancers-avec-predisposition-genetique-cancer-de-lovaire.pdf
Disponible sur: http://www.e-cancer.fr/component/docman/doc_download/1042-chirurgie-prophylactique-des-cancers-avec-predisposition-genetique-cancer-de-lovaire
47. Vasen HFA, Möslin G, Alonso A, Bernstein I, Bertario L, Blanco I, et al. Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer). *J Med Genet*. juin 2007;44(6):353-362.
48. 1051-principales-recommandations-de-prise-en-charge-des-patients-porteurs-dune-mutation-dun-gene-mmr.pdf
Disponible sur: http://www.e-cancer.fr/component/docman/doc_download/1051-principales-recommandations-de-prise-en-charge-des-patients-porteurs-dune-mutation-dun-gene-mmr
49. Chan AT, Arber N, Burn J, Chia WK, Elwood P, Hull MA, et al. Aspirin in the chemoprevention of colorectal neoplasia: an overview. *Cancer Prev Res Phila Pa*. févr 2012;5(2):164-178.
50. Burn J, Gerdes A-M, Macrae F, Mecklin J-P, Moeslein G, Olschwang S, et al. Long-term effect of aspirin on cancer risk in carriers of hereditary colorectal cancer: an analysis from the CAPP2 randomised controlled trial. *Lancet*. 17 déc 2011;378(9809):2081-2087.
51. Järvinen HJ, Aarnio M, Mustonen H, Aktan-Collan K, Aaltonen LA, Peltomäki P, et al. Controlled 15-year trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology*. mai 2000;118(5):829-834.
52. Järvinen HJ, Renkonen-Sinisalo L, Aktán-Collán K, Peltomäki P, Aaltonen LA, Mecklin J-P. Ten years after mutation testing for Lynch syndrome: cancer incidence and outcome in mutation-positive and mutation-negative family members. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 oct 2009;27(28):4793-4797.
53. 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):261-268.
54. Goel A, Nagasaka T, Hamelin R, Boland CR. An optimized pentaplex PCR for detecting DNA mismatch repair-deficient colorectal cancers. *PloS One*. 2010;5(2):e9393.
55. Pagin A, Zerimech F, Leclerc J, Wacrenier A, Lejeune S, Descarpentries C, et al. Evaluation of a new panel of six mononucleotide repeat markers for the detection of DNA mismatch repair-deficient tumours. *Br J Cancer*. 28 mai 2013;108(10):2079-2087.

56. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med*. 17 juill 2003;349(3):247-257.
57. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, et al. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med*. 5 mai 2005;352(18):1851-1860.
58. Funkhouser WK Jr, Lubin IM, Monzon FA, Zehnbauser BA, Evans JP, Ogino S, et al. Relevance, pathogenesis, and testing algorithm for mismatch repair-defective colorectal carcinomas: a report of the association for molecular pathology. *J Mol Diagn JMD*. avr 2012;14(2):91-103.
59. Engel C, Forberg J, Holinski-Feder E, Pagenstecher C, Plaschke J, Kloor M, et al. Novel strategy for optimal sequential application of clinical criteria, immunohistochemistry and microsatellite analysis in the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Int J Cancer*. 1 janv 2006;118(1):115-122.
60. Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, Ma AH, Lutterbaugh JD, Periyasamy S, et al. Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 21 juill 1998;95(15):8698-8702.
61. Wang L, Cunningham JM, Winters JL, Guenther JC, French AJ, Boardman LA, et al. BRAF mutations in colon cancer are not likely attributable to defective DNA mismatch repair. *Cancer Res*. 1 sept 2003;63(17):5209-5212.
62. Crépin M, Dieu M-C, Lejeune S, Escande F, Boidin D, Porchet N, et al. Evidence of constitutional MLH1 epimutation associated to transgenerational inheritance of cancer susceptibility. *Hum Mutat*. 1 janv 2012;33(1):180-188.
63. Rævaara 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):537-549.
64. Martín-López JV, Fishel R. The mechanism of mismatch repair and the functional analysis of mismatch repair defects in Lynch syndrome. *Fam Cancer*. juin 2013;12(2):159-168.
65. Peltomäki P, Aaltonen LA, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, Järvinen H, et al. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science*. 7 mai 1993;260(5109):810-812.
66. Obmolova G, Ban C, Hsieh P, Yang W. Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA. *Nature*. 12 oct 2000;407(6805):703-710.
67. De Vos M, Hayward BE, Picton S, Sheridan E, Bonthron DT. Novel PMS2 pseudogenes can conceal recessive mutations causing a distinctive childhood cancer syndrome. *Am J Hum Genet*. mai 2004;74(5):954-964.
68. Niessen RC, Kleibeuker JH, Jager POJ, Sijmons RH, Hofstra RMW. Getting rid of the PMS2 pseudogenes: mission impossible? *Hum Mutat*. avr 2007;28(4):414; author reply 415.

69. Cancero_dig_2010_2_104_110.pdf. Disponible sur: http://documents.irevues.inist.fr/bitstream/handle/2042/32416/Cancero_dig_2010_2_104_110.pdf
70. Peltomäki P, Vasen H. Mutations associated with HNPCC predisposition -- Update of ICG-HNPCC/INSiGHT mutation database. *Dis Markers*. 2004;20(4-5):269-276.
71. Di Fiore F, 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*. janv 2004;41(1):18-20.
72. Li L, McVety S, Younan R, Liang P, Du Sart D, Gordon PH, et al. Distinct patterns of germ-line deletions in MLH1 and MSH2: the implication of Alu repetitive element in the genetic etiology of Lynch syndrome (HNPCC). *Hum Mutat*. avr 2006;27(4):388.
73. 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):1178-1183.
74. 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):112-117.
75. Kempers MJE, Kuiper RP, Ockeloen CW, Chappuis PO, Hutter P, Rahner N, et al. Risk of colorectal and endometrial cancers in EPCAM deletion-positive Lynch syndrome: a cohort study. *Lancet Oncol*. janv 2011;12(1):49-55.
76. Hitchins MP, Lynch HT. Dawning of the epigenetic era in hereditary cancer. *Clin Genet*. 3 mars 2014;
77. Hitchins MP, Wong JJL, Suthers G, Suter CM, Martin DIK, Hawkins NJ, et al. Inheritance of a cancer-associated MLH1 germ-line epimutation. *N Engl J Med*. 15 févr 2007;356(7):697-705.
78. Hitchins MP. The role of epigenetics in Lynch syndrome. *Fam Cancer*. juin 2013;12(2):189-205.
79. De la Chapelle A. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*. oct 2004;4(10):769-780.
80. Lindor NM, Rabe K, Petersen GM, Haile R, Casey G, Baron J, et al. Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. *JAMA J Am Med Assoc*. 27 avr 2005;293(16):1979-1985.
81. Morak M, Heidenreich B, Keller G, Hampel H, Laner A, de la Chapelle A, et al. Biallelic MUTYH mutations can mimic Lynch syndrome. *Eur J Hum Genet EJHG*. 12 févr 2014;
82. Plon SE, Eccles DM, Easton D, Foulkes WD, Genuardi M, Greenblatt MS, et al. Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. *Hum Mutat*. nov 2008;29(11):1282-1291.

83. Tournier I, Vezain M, Martins A, Charbonnier F, Baert-Desurmont S, Olschwang S, et al. A large fraction of unclassified variants of the mismatch repair genes MLH1 and MSH2 is associated with splicing defects. *Hum Mutat.* déc 2008;29(12):1412-1424.
84. Grandval P, Fabre AJ, Gaildrat P, Baert-Desurmont S, Buisine M-P, Ferrari A, et al. UMD-MLH1/MSH2/MSH6 databases: description and analysis of genetic variations in French Lynch syndrome families. *Database J Biol Databases Curation.* 2013;2013:bat036.
85. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med.* 6 mars 2003;348(10):919-932.
86. Ou J, Niessen RC, Lützen A, Sijmons RH, Kleibeuker JH, de Wind N, et al. Functional analysis helps to clarify the clinical importance of unclassified variants in DNA mismatch repair genes. *Hum Mutat.* nov 2007;28(11):1047-1054.
87. Takahashi M, Shimodaira H, Andreutti-Zaugg C, Iggo R, Kolodner RD, Ishioka C. Functional analysis of human MLH1 variants using yeast and in vitro mismatch repair assays. *Cancer Res.* 15 mai 2007;67(10):4595-4604.
88. Drost M, Zonneveld J e BM, van Dijk L, Morreau H, Tops CM, Vasen HFA, et al. A cell-free assay for the functional analysis of variants of the mismatch repair protein MLH1. *Hum Mutat.* mars 2010;31(3):247-253.
89. Wanat JJ, Singh N, Alani E. The effect of genetic background on the function of *Saccharomyces cerevisiae* mlh1 alleles that correspond to HNPCC missense mutations. *Hum Mol Genet.* 15 févr 2007;16(4):445-452.
90. Nyström-Lahti M, Perrera C, Räschle M, Panyushkina-Seiler E, Marra G, Curci A, et al. Functional analysis of MLH1 mutations linked to hereditary nonpolyposis colon cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* févr 2002;33(2):160-167.
91. Shimodaira H, Filosi N, Shibata H, Suzuki T, Radice P, Kanamaru R, et al. Functional analysis of human MLH1 mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Genet.* août 1998;19(4):384-389.
92. Ollila S, Sarantaus L, Kariola R, Chan P, Hampel H, Holinski-Feder E, et al. Pathogenicity of MSH2 missense mutations is typically associated with impaired repair capability of the mutated protein. *Gastroenterology.* nov 2006;131(5):1408-1417.
93. Drost M, Zonneveld JBM, van Hees S, Rasmussen LJ, Hofstra RMW, de Wind N. A rapid and cell-free assay to test the activity of lynch syndrome-associated MSH2 and MSH6 missense variants. *Hum Mutat.* mars 2012;33(3):488-494.
94. Gammie AE, Erdeniz N, Beaver J, Devlin B, Nanji A, Rose MD. Functional characterization of pathogenic human MSH2 missense mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* oct 2007;177(2):707-721.
95. Couch FJ, Rasmussen LJ, Hofstra R, Monteiro ANA, Greenblatt MS, de Wind N, et al. Assessment of functional effects of unclassified genetic variants. *Hum Mutat.* nov 2008;29(11):1314-1326.

96. Kansikas M, Kariola R, Nyström M. Verification of the three-step model in assessing the pathogenicity of mismatch repair gene variants. *Hum Mutat.* 1 janv 2011;32(1):107-115.
97. Heinen CD, Juel Rasmussen L. Determining the functional significance of mismatch repair gene missense variants using biochemical and cellular assays. *Hered Cancer Clin Pract.* 2012;10(1):9.
98. Rasmussen LJ, Heinen CD, Royer-Pokora B, Drost M, Tavtigian S, Hofstra RMW, et al. Pathological assessment of mismatch repair gene variants in Lynch syndrome: past, present, and future. *Hum Mutat.* déc 2012;33(12):1617-1625.
99. Drotschmann K, Clark AB, Tran HT, Resnick MA, Gordenin DA, Kunkel TA. Mutator phenotypes of yeast strains heterozygous for mutations in the MSH2 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 16 mars 1999;96(6):2970-2975.
100. Trojan J, Zeuzem S, Randolph A, Hemmerle C, Brieger A, Raedle J, et al. Functional analysis of hMLH1 variants and HNPCC-related mutations using a human expression system. *Gastroenterology.* janv 2002;122(1):211-219.
101. Heinen CD, Wilson T, Mazurek A, Berardini M, Butz C, Fishel R. HNPCC mutations in hMSH2 result in reduced hMSH2-hMSH6 molecular switch functions. *Cancer Cell.* juin 2002;1(5):469-478.
102. Plotz G, Welsch C, Giron-Monzon L, Friedhoff P, Albrecht M, Piiper A, et al. Mutations in the MutSalpha interaction interface of MLH1 can abolish DNA mismatch repair. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(22):6574-6586.
103. Brieger A, Trojan J, Raedle J, Plotz G, Zeuzem S. Transient mismatch repair gene transfection for functional analysis of genetic hMLH1 and hMSH2 variants. *Gut.* nov 2002;51(5):677-684.
104. Guerrette S, Acharya S, Fishel R. The interaction of the human MutL homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *J Biol Chem.* 5 mars 1999;274(10):6336-6341.
105. Martinez SL, Kolodner RD. Functional analysis of human mismatch repair gene mutations identifies weak alleles and polymorphisms capable of polygenic interactions. *Proc Natl Acad Sci.* 16 mars 2010;107(11):5070-5075.
106. Duraturo F, Liccardo R, Cavallo A, De Rosa M, Grosso M, Izzo P. Association of low-risk MSH3 and MSH2 variant alleles with Lynch syndrome: probability of synergistic effects. *Int J Cancer J Int Cancer.* 1 oct 2011;129(7):1643-1650.
107. Brieger A, Plotz G, Hinrichsen I, Passmann S, Adam R, Zeuzem S. C-terminal fluorescent labeling impairs functionality of DNA mismatch repair proteins. *PloS One.* 2012;7(2):e31863.
108. Borràs E, Pineda M, Brieger A, Hinrichsen I, Gómez C, Navarro M, et al. Comprehensive functional assessment of MLH1 variants of unknown significance. *Hum Mutat.* nov 2012;33(11):1576-1588.
109. Cejka P, Stojic L, Mojas N, Russell AM, Heinemann K, Cannavó E, et al. Methylation-induced G(2)/M arrest requires a full complement of the mismatch repair protein hMLH1. *EMBO J.* 1 mai 2003;22(9):2245-2254.

110. Blasi MF, Ventura I, Aquilina G, Degan P, Bertario L, Bassi C, et al. A Human Cell-Based Assay to Evaluate the Effects of Alterations in the MLH1 Mismatch Repair Gene. *Cancer Res.* 15 sept 2006;66(18):9036-9044.
111. Wielders EAL, Dekker RJ, Holt I, Morris GE, te Riele H. Characterization of MSH2 variants by endogenous gene modification in mouse embryonic stem cells. *Hum Mutat.* avr 2011;32(4):389-396.
112. Barnetson RA, Cartwright N, van Vliet A, Haq N, Drew K, Farrington S, et al. Classification of ambiguous mutations in DNA mismatch repair genes identified in a population-based study of colorectal cancer. *Hum Mutat.* 1 mars 2008;29(3):367-374.

Auteur : KAZMIERCZAK-VERMAUT

Catherine

Date de Soutenance : Vendredi 20 juin 2014

Titre de la Thèse :

Mise en place d'un test fonctionnel protéique pour évaluer les variants de signification inconnue des gènes *MLH1* et *MSH2* responsables du syndrome de Lynch.

Thèse - Médecine - Lille 2014

Cadre de classement : *Oncogénétique*

DES + spécialité : *Biologie Médicale*

Mots-clés : Syndrome de Lynch, MMR, test fonctionnel

Résumé

Introduction. Le syndrome de Lynch est la principale cause de cancer héréditaire du côlon et de l'endomètre. Le diagnostic de certitude repose sur l'identification d'une mutation constitutionnelle sur un des quatre gènes MMR (*MisMatch Repair*). Un des défis majeurs actuels est l'interprétation biologique des variants de signification biologique et clinique inconnue (VSI), qui représentent 20 à 30 % des variations de séquence identifiées dans les gènes *MMR*.

Matériel et Méthodes. L'objectif de notre étude a été de développer un test fonctionnel simple visant à évaluer l'impact des variants des gènes MMR sur l'expression des protéines correspondantes, mimant ce qui peut être observé par immunohistochimie dans les tumeurs des patients. Le test consiste à transfecter des lignées de cellules cancéreuses coliques humaines déficientes en un gène MMR (HCT116 *MLH1*^{-/-} ou LoVo *MSH2*^{-/-}) avec un vecteur d'expression contenant la séquence codante normale ou mutée, puis à comparer en Western blot les niveaux d'expression des deux protéines.

Résultats. Des mutations reconnues délétères et des polymorphismes fréquents ont tout d'abord été analysés. Une diminution nette du niveau d'expression a été observée pour les mutations délétères par rapport aux protéines sauvages correspondantes, tandis que l'expression était conservée pour les polymorphismes, montrant l'intérêt du test. Dix-huit variants de signification inconnue ou incertaine (n = 6 pour le gène *MLH1* et n = 12 pour le gène *MSH2*), identifiés dans notre laboratoire chez des patients suspects d'être atteints du syndrome de Lynch ont ensuite été analysés. Au moins neuf variants ont révélé un résultat évocateur d'un caractère délétère, avec une diminution nette d'expression de la protéine mutée par rapport à la protéine sauvage et quatre variants ont montré une expression comparable à celle de la protéine sauvage. La plupart de nos résultats étaient en accord avec les données disponibles (phénotype tumoral, tests fonctionnels décrits dans la littérature).

Conclusion. Ce test fonctionnel relativement simple et donc facilement implantable dans une structure hospitalière devrait permettre de fournir un argument supplémentaire pour aider à l'interprétation des VSI. L'impact clinique est direct en permettant leur utilisation pour le conseil génétique et l'adaptation de la prise en charge des patients et de leur famille.

Composition du Jury

Président : Madame le Professeur Sylvie Manouvrier

Assesseurs : Madame le Professeur Nicole Porchet
Madame le Docteur Marie-Pierre Buisine
Madame le Docteur Sophie Lejeune
Monsieur le Docteur Stéphane Cattan

Directeur de thèse : Madame le Docteur Marie-Pierre Buisine