



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah  
Faculté des Sciences et Techniques  
[www.fst-usmba.ac.ma](http://www.fst-usmba.ac.ma)



Master Sciences et Techniques (MST)

# Biotechnologie Microbienne

**Aspect moléculaire du syndrome de Lynch :  
La mise en évidence des mutations germinales  
des gènes MLH1 et MSH2**

Présenté par :

El AGY Fatima

Encadré par :

Pr. IRAQUI Houssaini Mohammed (FST-Fès)

Pr. OULDIM Abdelkarim (CHU-Fès)

Soutenu le 23 Juin 2015 devant le jury composé de :

Pr. IRAQUI Houssaini Mohammed (FST-Fès)

Pr. OULDIM Abdelkarim (CHU-Fès)

Pr. Guissi Sanae (FST-Fès)

Pr. Bennis Sanae (CHU-Fès)

Année universitaire 2014-2015

## **Introduction générale**

Chaque année dans le monde, près d'un million de personnes développent un cancer colorectal et environ 655 000 personnes décèdent des suites de ce cancer. Ces données en font la seconde cause de décès due au cancer et le troisième en termes de fréquence dans le monde, après celui de la prostate et du sein.

Le cancer colorectal, est présent surtout dans les pays industrialisés. Ceci est peut être dû à une disposition de meilleurs techniques de détection, par rapport aux pays en voie de développement, mais surtout à une alimentation plus riche en viande, d'origine animale.

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 qui représente 2-3% des CCR.

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 Non polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC) énonce les critères d'Amsterdam, définissant ce syndrome sur le plan clinique.

Les tumeurs qui se développent dans le cadre d'une prédisposition de type HNPCC, sont le plus souvent la conséquence d'une altération constitutionnelle d'un des gènes de réparation des mésappariements, survenant au cours de la réplication de l'ADN.

L'inactivation d'un de ces gènes de réparation résulte d'une instabilité observée au niveau des loci de type microsatellites (séquences répétitives d'ADN) dans l'ADN tumoral.

Il s'agit principalement des gènes MLH1 et MSH2, plus rarement du gène MSH6, et exceptionnellement du gène PMS2 (< 5 % des cas).

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.

A ce jour, plus de 200 différentes mutations ont été décrites, avec 5-10% de délétions et 6211 variants sont actuellement rapportés dans la base de données INSIGHT, dont 78.8% de substitutions et 13.9% de courtes délétions ou insertions nucléotidiques, au sein du gène MLH1.

Pour le gène MSH2, plus de 170 mutations ont été identifiées, dont au moins 20% sont de grandes délétions et 4561 variants sont rapportés dans la base de données INSIGHT, dont 70.5% de substitutions et 23.5% de délétions ou insertions.

**A l'heure actuelle, aucune étude moléculaire des gènes MLH1 et MSH2 n'a été réalisée sur une population marocaine**, d'où l'intérêt de ce travail, qui a pour objectif, la mise en évidence d'éventuelles mutations, qui peuvent affecter les gènes MLH1 et MSH2 qui représentent jusqu'à 90% des gènes de réparation des mésappariements dans le syndrome de Lynch, et d'établir l'impact de ces mutations sur l'expression et le fonctionnement du facteur de transcription correspondant.

Cette étude moléculaire concerne plus précisément, les exons : 2,4 et 5 du gène MLH1, ainsi 2,3 et 10 pour le gène MSH2. Ces exons seront amplifiés par PCR, puis séquencés chez plusieurs patients. L'analyse de séquences obtenues permettrait la détection des mutations qui peuvent affecter ces exons.

# I. Généralités sur le cancer du colon

## 1. Définition et épidémiologie

Le cancer du côlon (« gros intestin ») est le cancer le plus fréquent du tube digestif. Il résulte de l'accumulation de mutations dans différents gènes au sein des cellules constitutives de la couche la plus interne de la paroi colique appelée « muqueuse ».

Ces mutations sont responsables de la prolifération excessive et anarchique de ces cellules qui aboutit à la formation de petites tumeurs initialement bénignes appelées « adénomes » ou « polypes adénomateux ». Ces polypes peuvent se transformer secondairement en tumeurs malignes cancéreuses (également appelées « adénocarcinomes ») qui ont la capacité d'infiltrer progressivement l'épaisseur de la paroi colique puis de diffuser à distance du côlon pour donner naissance à des métastases (tumeurs « filles », localisées à distance du côlon, par exemple dans le foie ou les poumons) par envahissement des vaisseaux sanguins et/ou lymphatiques. Plusieurs années d'évolution sont nécessaires pour qu'un petit adénome se transforme éventuellement en un cancer invasif [1].

Le cancer colorectal est le quatrième cancer le plus diagnostiqué chez les hommes et le troisième chez les femmes. En 2008, il y avait environ 609 000 décès par CCR chez les deux sexes à tous les âges. Il est également indiqué que les hommes développent cette maladie plus que les femmes, peut être en raison de différences dans les facteurs de risque (alcool et tabagisme) [2].

Les pays d'Europe, les États-Unis, le Japon, l'Australie et la Nouvelle-Zélande, présentent une zone de forte incidence de cancers colorectaux. Les taux d'incidence standardisés sur la structure de la population mondiale sont évalués à 36,3/100 000 **personnes/année** (PA) chez les hommes et à 24,7/100 000 PA chez les femmes, ce qui place les cancers colorectaux au troisième rang d'incidence après les cancers de la prostate et les cancers du poumon chez les hommes et au second rang d'incidence chez les femmes après les cancers du sein [3]. En revanche, le CRC est rare en Tunisie, avec une incidence annuelle de 7/100 000 habitants [4].

Au Maroc, l'incidence est inconnue vu l'absence d'un registre national, mais selon l'institut National d'oncologie de RABAT (INO), il occupe la première place parmi les cancers digestifs (40,3%).

Et comme le CRC est l'un des cancers les plus fréquents dans le monde, son identification précoce est nécessaire pour réduire la mortalité. La réussite de cette stratégie peut être estimée par le taux de mortalité le plus faible dans les pays développés où la détection précoce et le traitement sont disponibles [5,6].

## **2. Facteurs de risque**

Il existe plusieurs facteurs qui interviennent dans l'apparition et le développement d'un cancer du côlon. Les plus importants sont :

### L'âge

L'âge supérieur à 50 ans est le principal facteur de risque de cancer colorectal. 90 % des cancers colorectaux sont diagnostiqués à partir de 50 ans. Le risque d'avoir ce cancer dans la population âgée de 50 à 74 ans sans autre facteur de risque que l'âge a été estimé à 3,5 %.

### Prédisposition génétique

Le syndrome de Lynch et la polypose adénomateuse familiale, sont deux principaux facteurs génétiques responsables de la maladie [7].

### Maladie inflammatoire du côlon

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) regroupent deux maladies qui se caractérisent par une inflammation de la paroi d'une partie du tube digestif évoluant par poussées : la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique [7].

### Mode de vie

La consommation de l'alcool, le tabagisme, le surpoids et l'obésité et la consommation de viande et de charcuterie.

## **3. Les différentes voies d'oncogénèse des cancers colorectaux**

Le CCR représente un modèle classique de cancérogenèse multi-étape, caractérisé par l'apparition d'altérations génétiques successives qui sont responsables de la transformation d'une cellule épithéliale colique normale en cellule cancéreuse, selon la séquence adénome avec dysplasie, carcinome in situ, puis carcinome infiltrant. Les cancers sporadiques se développent à la suite de mutations somatiques acquises de manière aléatoire sur plusieurs

gènes également affectés dans les cancers héréditaires. Toutefois, le taux d'événements mutationnels aléatoires ne peut pas suffire pour expliquer la totalité des altérations génétiques observées dans la plupart des cancers humains. C'est pour cette raison que la déstabilisation du génome est probablement un événement précoce dans la carcinogenèse du cancer [8].

À ce jour, trois principaux groupes de CCR sont définis suivant le type d'instabilité qui leur est associé :

- ✓ les cancers LOH (loss of heterozygosity) ou CIN (chromosome instability), qui présentent une instabilité chromosomique conduisant à des pertes d'hétérozygotie ;
- ✓ Les cancers MSI (microsatellite instability) qui présentent une instabilité génétique conduisant à une instabilité au niveau des microsatellites, séquences répétées en tandem.
- ✓ Les cancers CIMP, récemment décrits, groupe non exclusif des deux groupes précédents [9].

Les différentes instabilités génétiques sont résumées dans la figure 1.

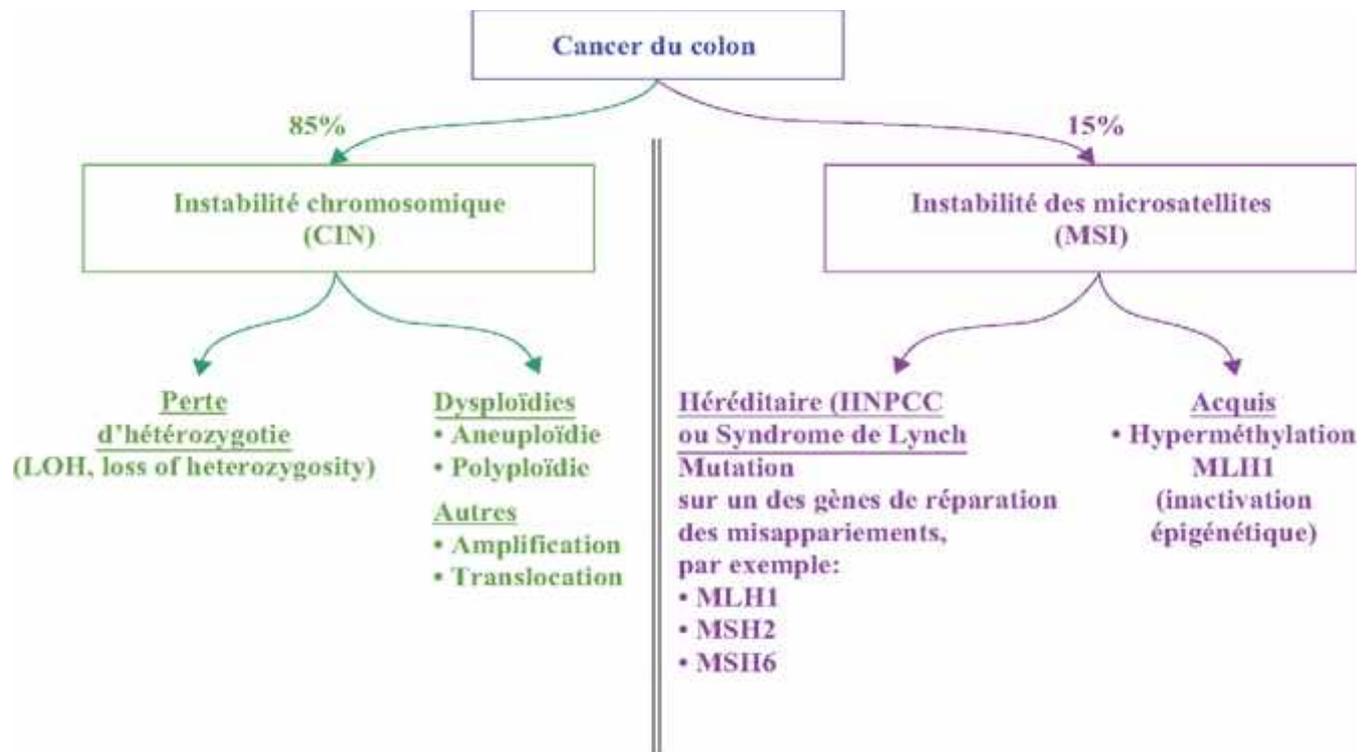


Figure 1 : Instabilités génétiques dans les cancers du côlon [10].

## II. Cancer colorectal héréditaire

Dans le monde entier, environ 70% à 80% des patients atteints de CCR semblent avoir une maladie sporadique avec aucune preuve d'une anomalie héréditaire, cependant pour 20% à 30% restants le facteur héréditaire peut être causal [11].

Les syndromes héréditaires de cancer sont souvent le résultat de mutations affectant la lignée germinale [12]. Ces mutations sont généralement non viables alors que le phénotype résultant est trop sévère. Cependant, les cancers impliquant des mutations héréditaires dans les gènes de stabilité sont plus fréquents [13].

Les formes héréditaires de cancers colorectaux peuvent être regroupées en deux grandes entités et qui sont illustrées dans le tableau suivant (1) : les formes polyposiques et les formes «non polyposiques », dominées par le syndrome de Lynch, également appelé syndrome HNPCC (acronyme pour Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer) [14].

**Tableau 1: Formes héréditaires de cancers colorectaux [15].**

Syndromes	Fréquence	Risque cumulé de CCR*	Signes cliniques	Gènes responsables
Polypose adénomateuse familiale (PAF)	1/8 000-1/14 000 naissances (1 % des CCR)	100 %	Plusieurs centaines de polypes adénomateux disséminés sur le côlon et le rectum	<i>APC</i> (5q21)
Syndrome HNPCC	1/5 000 naissances (2 à 3 % des CCR)	≥ 80 %	Tumeurs colorectales et extra-digestives	<i>hMLH1</i> (3p21), <i>hMSH2</i> (2p16) <i>hMSH6</i> (2p16), <i>hPMS1</i> (2q32) <i>hPMS2</i> (7q22), <i>hMLH3</i> (14q24.3)
Polypose juvénile	1/16 000-1/100 000 naissances	~30-40 %	Polypes hamartomateux colorectaux (98 %), gastriques et duodénaux (14 %)	<i>SMAD4/DPC4</i> (18q21.1) <i>BMPR1A/ALK3</i> (10q22-23)
Syndrome de Peutz-Jeghers	1/8 300-1/29 000 naissances	2-13 %	Polypes hamartomateux de l'intestin grêle et pigmentation périorificielle	<i>STK11/LKB1</i> (19p13.3)
Polypose héréditaire mixte	Non connue. Seules quelques familles ashkénases	?	Polypes juvéniles atypiques avec foyers adénomateux colorectaux	<i>HMPS/CRAC1</i> (15q13-q14)
MAP (« MYH associated polyposis »)	< 1 % des CCR	?	Phénotype de PAF atténuée	<i>MYH</i> (1p32-34)

La polypose adénomateuse associée aux mutations constitutionnelles du gène APC, appelée « Polypose Adénomateuse Familiale ou FAP », représente 1% à 2% des cancers colorectaux et en raison du nombre élevé des polypes, le risque que l'un d'entre eux devienne cancéreux s'accroît [16].

FAP est causée par des mutations de lignée germinale dans les gènes suppresseurs de tumeurs comme le gène APC qui contient 5 exons. Elle est héritée d'une manière autosomique dominante, ce qui rend compte de l'atteinte fréquente d'apparentés issus de différentes générations successives [17]. En outre, des mutations somatiques du gène APC peuvent être impliquées dans le cancer colorectal sporadique [18].

### **III. Le syndrome de lynch.**

#### **1. Définition**

Le syndrome de lynche est la cause la plus fréquente de cancer colorectale hérité, ce qui représente environ 3% des cas nouvellement diagnostiqués de ce type de cancer [19]. L'éponyme « syndrome de lynch » est attribué au nom de Dr Henry T.Lynch, le premier auteur de l'édition originale publiée en 1966 qui décrit en détail cette condition [20].

Au début des années 1990, les mutations des gènes de réparation des mésappariements de l'ADN ont été connues comme cause de lynch, et la présence des mutations maintenant chez un patient définissent le syndrome [21,22].

Ce syndrome, est une affection autosomique dominante, résulte de mutations constitutionnelles portant sur un des gènes du système de réparation des mésappariements de l'ADN (DNA mismatch repair – MMR). Les quatre principaux gènes impliqués sont MutL homologue 1 (MLH1), MutS homologue 2 (MSH2), MutS homologue 6 (MSH6) et PMS 2 (Post meiotic segregation 2), ils empêchent la propagation d'irrégularités de la séquence nucléotidique qui peut survenir durant la réplication de l'ADN, et assurent ainsi le maintien de l'intégrité du génome [23]. Les mutations des gènes MLH1 et MSH2 regroupent, à elles seules, 90% des prédispositions génétiques identifiées à ce jour [17].

Certains cancers sporadiques résultent d'un dysfonctionnement de l'un de ces gènes, en particulier de MLH1, secondaire à une hyperméthylation de son promoteur [24].

## **2. Épidémiologie et risque**

En France, l'incidence annuelle du cancer colorectal est de 37 000 cas qui entraînent 15000 décès chaque année. C'est le troisième cancer le plus fréquent dans ce pays après le cancer du sein et de la prostate, il représente la deuxième cause de mortalités. Et pour le syndrome de Lynch la pénétrance est de 1/350 à 1/1500 de la population [25].

En Suisse, le cancer colorectal est le troisième cancer par ordre d'incidence, il concerne 4000 nouveaux patients par an. Si 75% de ces cancers sont sporadiques, plus de 20% s'inscrivent dans un contexte familial et 5% sont secondaires à des prédispositions monogéniques au cancer. Parmi ces maladies génétiques, le syndrome de Lynch, ou cancer colorectal héréditaire sans polypose (Syndrome HNPCC), est de loin le plus fréquent (2- 4%). La prévalence de ce syndrome est de 1/800- 1/1000 dans la population générale[26,27].

En Finlande, les mutations de gène MLH1 ont été trouvées dans 83% des familles avec syndrome de Lynch, et seulement 3% de ces familles pour les mutations attaquant le gène MSH2 [28].

Une étude, réalisée en Tunisie, montre que les mutations germinales de gènes de système MMR sont responsables d'au moins de 35,5% des CRC développés chez les patients ayant des antécédents personnels ou familiaux évocateurs de syndrome de Lynch. Ainsi, parmi 134 cancers observés dans 131 familles, le type le plus fréquent est le cancer colorectal avec 69% suivi de cancer de l'utérus (7,5%) [29].

La pénétrance de ce syndrome est élevée avec 70 % à 80 % de risque de cancer colorectal cumulé sur la vie pour les hommes, et 40 à 60 % pour les femmes versus 6 % pour le cancer sporadique dans la population générale. Comme dans les autres formes héréditaires de cancer, les sujets atteints ont un risque élevé de développer plusieurs tumeurs primitives synchrones ou métachrones.

Le risque de développer un second cancer colorectal chez les patients déjà atteints par ce type de cancer et opéré d'une colectomie segmentaire a été estimé à 15 % à 15 ans, et 55 % à 20 ans alors qu'il est de 1,3 % à 5,3 % dans les cas de cancers colorectaux sporadiques. Une autre étude révèle un risque de 40 % de développer un second cancer en moyenne 7 ans après le premier [30].

Les risques cumulatifs de développer un cancer dans le cadre du syndrome de Lynch sont montrés dans le tableau suivant [2]:

**Tableau 2 : Risques cumulés (pénétrance) avant 75 ans [31].**

Risques cumulatifs avant 75 ans	Syndrome de Lynch	Population générale
Cancer colorectal	♀ : 24-52% ♂ : 28-75%	♀ : 3,5% ♂ : 4,6%
Cancer de l'endomètre	27-71%	1,5%
Cancer de l'estomac	2-13%	< 1%
Cancer de l'ovaire	3-13%	1,3%
Cancer des voies urinaires	1-12%	< 1%
Cancer de l'intestin grêle	4-7%	< 1%

### **3. Caractéristiques de syndrome de Lynch**

Le cancer colorectal héréditaire non polyposique (HNPCC) reçoit son nom de la rareté de polypes observés chez les patients, contrairement aux autres formes héréditaires tels que FAP où les centaines de milliers sont observés dans le côlon. Par conséquent les polypes qui se développent chez les patients atteints de HNPCC sont plus susceptibles de se développer en carcinomes [32].

Les cancers du côlon et du rectum rencontrés dans le syndrome HNPCC surviennent à un âge jeune, en moyenne 44 ans, alors que 94 % des cancers colorectaux sporadiques surviennent après 50 ans avec un âge moyen de 73 ans [33].

Les porteurs de mutations dans les gènes MMR ont un risque plus élevé de développer des tumeurs coliques ou extra-coliques que la population générale [33]. En plus le risque cumulé de développer un cancer colorectal ou de l'endomètre à l'âge de 80 ans s'élève respectivement à 20% et 40% [34].

Il est également connu que la progression à partir d'un adénome à un carcinome chez les patients HNPCC est accélérée, ce processus se déroule dans 2 années de développement alors qu'il prend habituellement environ huit ans dans les formes sporadiques de CRC, cette caractéristique rend l'identification et le dépistage très important [33].

Sur le plan histologique, dans la moitié des cas, ces tumeurs colorectales sont peu différenciées et présentent un fort stroma lymphoïde, une fréquence plus élevée de lymphocytes intra tumoraux et une richesse en mucus [33, 35,36].

Le phénotype MSI indique que les gènes du système MMR sont non fonctionnels; c'est une option qui peut être utilisée dans le dépistage. Ce phénotype résulte lorsque les enzymes MMR sont incapables de corriger les erreurs de réplication dans les microsatellites. Etant donné que les erreurs ne sont pas corrigées, les mutations s'accumulent dans la cellule et on estime qu'environ 12% à 17% de tous les CRC résultent d'une déficience des protéines du système MMR [5,36].

En résumé et selon lynch, les principales caractéristiques phénotypiques sont :

- ✓ Mode de transmission est autosomique dominante
- ✓ Le jeune âge d'apparition (<50) de la tumeur par rapport à l'âge de la population générale ( > 65).
- ✓ Entre 70% et 85% des tumeurs se développent dans le côlon proximal.
- ✓ Risque élevé de tumeurs synchrones et métachrones.
- ✓ Augmentation du risque de malignité à des endroits coliques supplémentaires et spécifiques.
- ✓ La pathologie de la tumeur est mal différenciée

#### **4. Physiopathologie de syndrome de Lynch**

##### **4.1. 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 [37]. Les erreurs de réplication ayant échappé à ce système de relecture sont alors corrigées par un système très efficace de réparation des mésappariements : le système MMR.

Ce système, cible les mésappariements de nucléotides, mais également les petites boucles d'insertions/délétions (Insertion Deletion Loops ou IDL) qui résultent d'une insertion ou délétion d'une ou plusieurs séquences répétées, lors du recopiage des microsatellites [36].

Le système MMR a été très étudié chez la bactérie *Escherichia coli*, la conservation de ce système a grandement contribué à définir le système MMR eucaryote (tableau3).

Tableau 3: Principaux acteurs impliqués dans la voie de réparation MMR chez l'Homme [38].

Protéine	fonction
hsMutS (MSH2*MSH6)	Reconnaissance des mésappariements et des IDLs = 2
hsMutS (MSH2*MSH3)	Reconnaissance des IDLs > 2
hsMutL	Coordinateur moléculaire; activité endonucléase. Participe à la recombinaison méiotique
EXO1	Exonucléase 5' → 3' agissant de préférence sur l'ADN double brin
Replication protein A: RPA	Protéine fixant l'ADN simple brin et assurant leur protection, le temps de l'étape d'excision et de resynthèse.
Replication Factor C : RFC	Facteur de chargement recrutant l'anneau PCNA (eucaryotes) sur l'ADN
Proliferating Cell Nuclear Antigen: PCNA	Facteur de processivité améliorant l'efficacité de la polymérase; interagit avec un grand nombre de protéines impliquées dans la réparation et/ou la recombinaison de l'ADN.
ADN pol	Synthèse de l'ADN
ADN ligase I	Ligation après la synthèse de l'ADN

La reconnaissance des mésappariements des bases et des insertions/délétions de l'un ou plusieurs nucléotides fait intervenir le complexe MutS constitué des sous unités MSH2 et MSH6. Les mésappariements qui ne touchent qu'une seule base sont plutôt réparés par ce complexe [39]. Afin de réparer les insertions/délétions de plus grande taille (de 2 à 8 bases), il y a l'intervention d'un autre complexe c'est MutS<sub>2</sub>, qui est constitué des sous-unités MSH2 et MSH3 [36,39].

Les trois sous-unités homologues de MutL, MLH3, PMS1 et PMS2, interagissent avec la même région de la protéine MLH1. Les fonctions des complexes MutL ne sont pas bien comprises comme celles de MutS :

- ✚ Le complexe MutL est le composant majeur du système MMR, formé par MLH1 et PMS2, il est capable d'interagir avec les deux complexes constitués par MSH2, MutS et MutS .
- ✚ Le complexe MutL formé par l'assemblage de la protéine MLH1 avec PMS1, a été capable de supprimer la mutagenèse chez *Saccharomyces cerevisiae*, mais la fonction de ce complexe n'a pas été pleinement élucidée chez l'homme [36].
- ✚ L'hétérodimère MLH1/MLH3 formant le complexe MutL pourrait être impliqué dans la réparation de certaines boucles insertions/délétions chez la levure, mais cette fonction est encore inexploitée pour l'homme [36].

La réparation des mésappariements dépend de la présence d'une incision en 5' ou 3' sur l'un des brins. Des essais développés au sein du laboratoire de P. Modrich ont montré qu'en l'absence d'incision en 5' ou 3', la réparation du mésappariement n'est pas observée. Or, après le passage de la fourche de réplication, le brin néosynthétisé, portant donc le mésappariement, contient plusieurs incisions, que cela soit au niveau des extrémités 3' ou des extrémités 5' des fragments d'Okazaki. Ces terminaisons 5' ou 3' ont été proposées comme servant de signal principal pour la discrimination des deux brins. Ceci semble confirmer que le mécanisme MMR a une "relation particulière avec le complexe de réplication [40].

Dans le cas d'une réparation dirigée en 5' du mésappariement, la réparation a lieu en présence d'un mésappariement, d'une incision, de MutS , Exo1, RPA et d'ATP. Dans le cas d'une réparation dirigée en 3' du mésappariement, la réparation nécessite la présence de MutL , de PCNA et de RFC en plus des facteurs précités [41].

Lors d'une excision 5' 3', la protéine hsMutS reconnaît le mésappariement et favorise largement l'activité d'EXO1, en recrutant ce dernier au niveau de l'incision et en augmentant sa capacité d'excision. 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 [42].

Le complexe MutL n'est pas essentiel pour l'excision 5' 3', mais sa présence augmente la sélectivité du système MMR pour les hétéroduplexes d'ADN (contenant un mésappariement) par rapport aux homoduplexes [43]. De même, PCNA et RFC ne sont pas essentiels mais permettent d'augmenter l'efficacité de réparation d'environ 25% [44].

Lors d'une excision 3' 5', MutL devient essentiel puisqu'il incise le brin d'ADN néosynthétisé en 5' du mésappariement et permette alors à l'Exo1 de dégrader dans le sens 5' 3', le brin néosynthétisé depuis l'incision faite par MutL jusqu'après le mésappariement. Les protéines PCNA et RFC sont essentiels pour une excision 3' 5', car, elle stimule l'activité endonucléase de MutL [45].

Les protéines Msh interagissent avec la protéine PCNA, au niveau d'un motif d'interaction, appelé PIP (PCNA Interacting Protein box). Ce motif est situé en région N-terminale des protéines Msh3 et Msh6.

A la suite de l'excision du brin néosynthétisé au-delà du mésappariement, la protéine RAP se fixe au niveau de l'excision afin de stabiliser l'ADN simple brin. L'ADN polymérase Pol synthétise une seconde fois la partie qui manque du brin néosynthétisé. La jonction entre le brin réparé et le reste du brin néosynthétisé est jointe par la ligase I.

Ce processus de réparation de mésappariement est illustré dans la figure suivante :

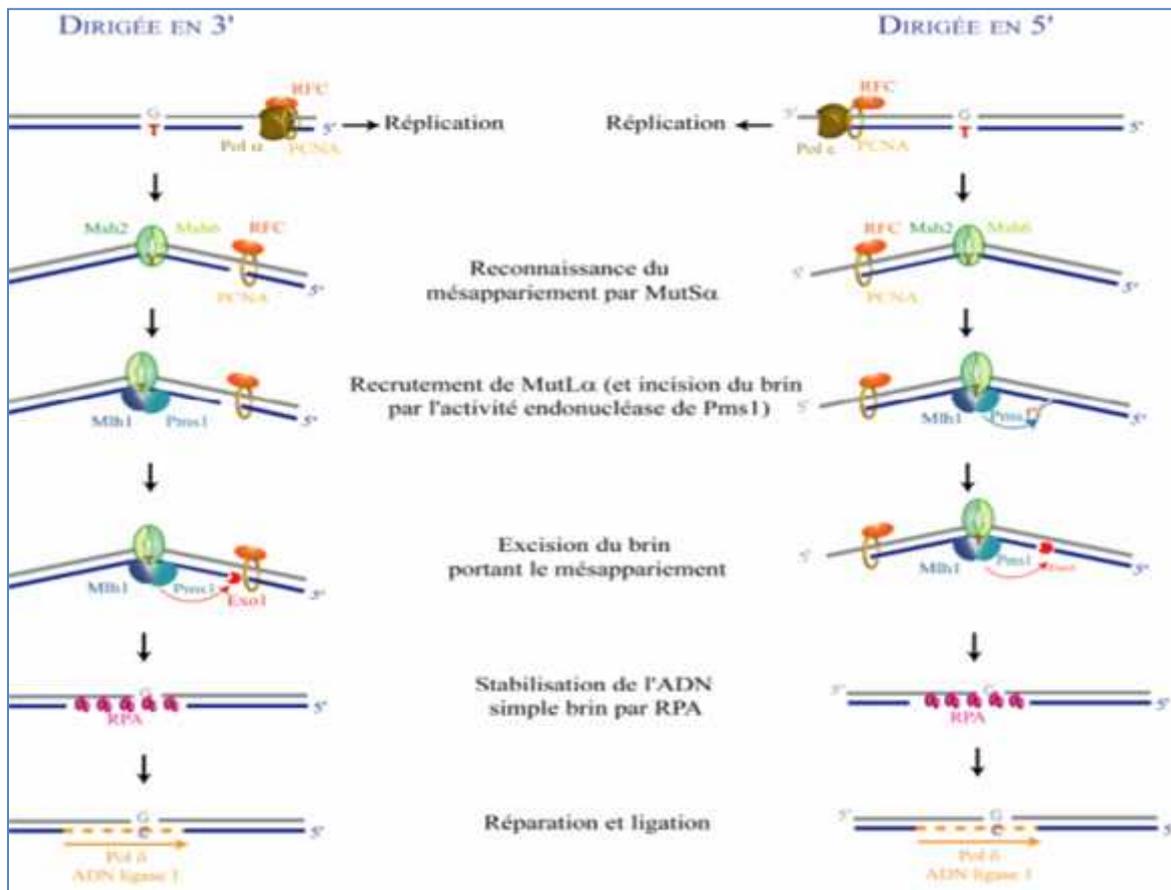


Figure 2: Représentation schématique du système de correction des mésappariements post-réplicatifs dans des cellules humaines dans le cas où une incision se trouve en 3' du mésappariement (à gauche) ou en 5' du mésappariement (à droite) [45].

#### 4.2. Altérations génétiques dans HNPCC

L'inactivation du système MMR contribue à la transformation maligne en empêchant la correction des erreurs de réplication de l'ADN au moment de la division cellulaire, ce qui est à l'origine d'un phénotype mutateur, celui-ci favorisant la survenue d'événements oncogénétiques ultérieurs. Ces erreurs, survenant préférentiellement au niveau de séquences répétées dont la réplication est naturellement plus difficile, sont facilement détectables au niveau des microsatellites.

##### a) L'instabilité des microsatellites(MSI)

Les microsatellites sont des segments d'ADN avec une séquence répétitive de nucléotides (par exemple, CCCC ou CGACCACGA), leur caractère répétitif est à l'origine d'erreurs de réplication, secondaire au «glissement» de l'ADN polymérase lorsqu'un gène de réparation des mésappariements d'ADN (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) est altérée. Ces erreurs, s'accumulent chez les patients présentant une dysfonction de ce système en engendrant un décalage dans le cadre de lecture et l'expression d'une protéine tronquée [46].

Le phénotype est appelé instabilité des microsatellites (figure 3).

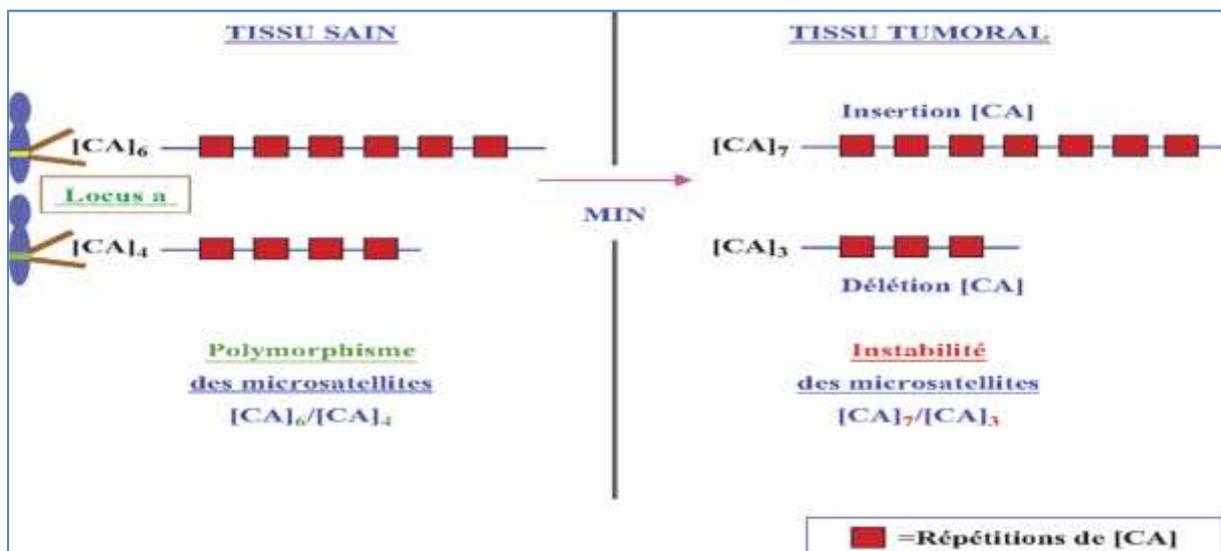


Figure 3 : Principe de l'instabilité des microsatellites. MIN : microsatellite instability ou MSI [10].

Il est estimé qu'environ 20 % des gènes humains possèdent des microsatellites dans leur région codante et sont potentiellement sujets à des mutations [47]. Parmi eux, certains sont impliqués dans la régulation de la croissance cellulaire (le gène TGF R2 : transforming growth factor), 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.

Il existe une excellente corrélation entre le statu MSI d'une tumeur et la présence d'une altération des gènes MMR. Ce phénotype MSI est observé dans plus de 90% des cancers colorectaux diagnostiqués chez les patients avec le syndrome de Lynch (due à une mutation du gène MMR lignée germinale) et dans près de 10% des cancers sporadiques alors secondaires à une hyperméthylation du promoteur de la protéine MLH1 [48].

**b) Le phénotype MSI et la carcinogenèse.**

L'existence de nombreux défauts dans le système MMR chez les patients présentant une forte incidence tumorale par rapport aux autres dont le système est non perturbé, indique le rôle de l'instabilité génomique dans le développement tumorale.

Comme il est indiqué sur la figure 4, la tumorigenèse colique suit un processus avec plusieurs étapes, et l'instabilité des microsatellites et l'une des voies de la carcinogenèse qui peut mener à ces étapes. Le résultat final c'est le cancer en altérant différents gènes impliqués dans le contrôle de l'apoptose (TFG et BAX) [49].

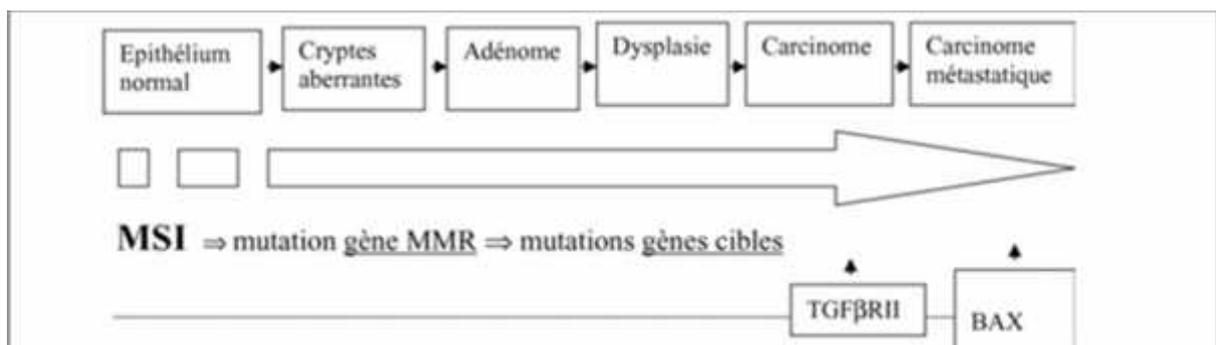


Figure 4 : Carcinogenèse colorectale. L'accumulation de mutations au sein de gènes associés à la cancérogenèse colorectale contribue à l'accélération du processus néoplasique au cours du syndrome de Lynch [49].

La carcinogénèse dans le syndrome de Lynch se déroule dans deux phases, la première étape c'est l'acquisition de l'instabilité génétique qui induit, soit la mort cellulaire soit la transformation maligne qui offre à la cellule la seule possibilité de survie, et sachant qu'au-delà de l'initiation, la poursuite de la carcinogénèse nécessite l'accumulation de nombreuses mutations pour atteindre le stade de cancer, les fonctions d'apoptose et de sénescence doivent nécessairement être altérées avant que la sélection naturelle n'élimine le clone mutateur, et donc après l'accumulation des mutations, la deuxième étape se manifeste par l'initiation d'un processus de cancérogenèse et en accélérer l'évolution [50].

## **5. Diagnostic de syndrome de Lynch**

### **5.1 Critères cliniques**

Sachant que l'expression clinique pathognomonique est absente pour le HNPCC et le diagnostic ne s'affirme que sur des anomalies génotypiques constitutionnelles, il est possible d'identifier la maladie et de la différencier des autres cancers tels que les cancers sporadiques et d'autres syndromes héréditaires, pour cela différents critères ont été développés afin d'aboutir à ce but.

#### ***a) Critères d'Amsterdam I***

Les critères d'Amsterdam I ont été publiés en 1991, définissant le syndrome sur le plan clinique, et ils ont joués un rôle dans l'établissement de la relation entre le HNPCC et les défauts des gènes MMR, il existe quatre critères [51,52] :

-  Au moins 3 apparentés atteints de cancer colorectal (histologiquement prouvé), 1 des apparentés devant être lié au premier degré par rapport aux autres.
-  Au moins 2 générations successives atteintes.
-  Un ou plusieurs cas de cancers diagnostiqué avant l'âge de 50 ans.
-  Exclusion de la polypose rectocolique familiale.

Ces critères ont été revus et élargis car ils ont été conçus pour la spécificité et pas pour la sensibilité de fait qu'ils ne tiennent pas compte des cancers extra-coliques [51,52].

#### ***b). Critères d'Amsterdam II***

Les critères d'Amsterdam ont été élargis pour intégrer les cancers extracoliques et ils sont devenus les critères d'Amsterdam II [51,52].

- 👤 Au moins trois membres de la famille atteints de cancer du spectre, dont un apparenté au premier degré par rapport aux autres.
- 👤 Au moins deux générations successives sont atteintes.
- 👤 Au moins un des cas a été diagnostiqué avant l'âge de 50 ans.
- 👤 Une polypose adénomateuse familiale a été exclue.
- 👤 Une confirmation histopathologique des cas est disponible.

Avec la mise en œuvre des critères d'Amsterdam II, il est devenu possible d'identifier et de caractériser beaucoup plus de familles avec HNPCC.

La limitation aux critères d'Amsterdam pour le diagnostic de syndrome de lynch peut présenter un risque d'ignorer les autres cas qui ne **répondent** pas ces critères. Ainsi, à titre d'exemple, 15 % des malades atteints de cancers colorectaux avant l'âge de 40 ans voire de 50 ans, sans autres caractéristiques, sont porteurs d'un syndrome HNPCC prouvé par l'existence d'une mutation constitutionnelle des gènes MLH1 ou MSH2 [53].

La sensibilité des critères Amsterdam I varie de 54 à 91 % et celle des critères d'Amsterdam II est de 78 %. La spécificité est respectivement de 62–84 % pour Amsterdam-I et 46 à 68 % pour Amsterdam II. Ces critères sous-estiment donc le diagnostic de syndrome de Lynch [10]. 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 2002.

### **c) Recommandations de Bethesda**

Pour améliorer la sensibilité de détection des patients porteurs d'une mutation délétère sur un gène MMR parmi la population atteinte de cancer, d'autres paramètres cliniques (critères de Bethesda 1), puis biologiques (critères de Bethesda 2) avec recherche d'une instabilité génomique au sein des tumeurs (phénotype MSI pour microsatellite instabilité) ont depuis été proposés [52] :

- 👤 Cancer colorectal diagnostiqué avant 50 ans.
- 👤 Cancer colorectal synchrone, métachrone ou associé à un autre cancer appartenant au spectre de syndrome de Lynch.
- 👤 Cancer colorectal avec une histologie de type MSI-high, diagnostiqué avant 60 ans.

- ✚ Cancer colorectale avec au moins un parent du premier degré avec un cancer appartenant au spectre de syndrome de Lynch, une des tumeurs est diagnostiquée avant l'âge de 50 ans.
- ✚ Cancer colorectal avec au moins deux parents du premier ou second degré avec un cancer appartenant au spectre du syndrome de Lynch.

Les recommandations de Bethesda permettent de repérer certaines formes cliniques atypiques qui ne répondent pas aux critères d'Amsterdam 2 (actuellement 10 à 15 % des cas de syndrome de Lynch) [54].

## 5.2. Critères histologiques

Lorsqu'il est secondaire à un dysfonctionnement des gènes du DNA MMR, qu'il soit constitutionnel ou non, le cancer colorectal peut présenter des aspects morphologiques caractéristiques qui doivent faire évoquer le diagnostic. En effet, les tumeurs mucineuses ou peu différenciées, en particulier le carcinome médullaire, sont étroitement liées au syndrome de Lynch (figure 5). La réaction stromale, quant à elle, se caractérise par un infiltrat inflammatoire majeur, pouvant prendre un aspect «Crohn-like», mais surtout par l'infiltration de l'épithélium tumoral par des lymphocytes T. En combinant ces différents aspects morphologiques et, en particulier, la composante mucineuse et/ou l'infiltrat inflammatoire intraépithélial, la sensibilité et la spécificité de l'histologie atteignent 74 et 83% respectivement [55].

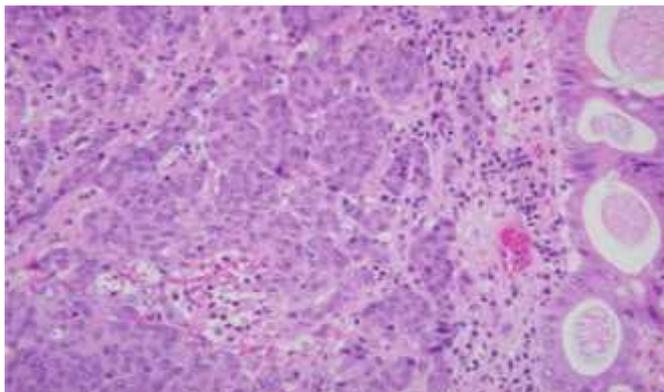


Figure 5 : Infiltration de la muqueuse colique par un adénocarcinome de type médullaire [55].

## **6. Etude de phénotype tumorale dans le syndrome de Lynch**

Le syndrome de Lynch demeure sous diagnostiqué, en effet les critères d'Amsterdam ne sont pas suffisamment sensibles même s'ils sont très spécifiques [56]. Ainsi les recommandations de Bethesda demeurent difficilement généralisables [56,57].

Cependant, l'immunohistochimie et la recherche d'une instabilité des séquences microsatellites sont deux techniques complémentaires et fiables pour sélectionner les patients qui doivent subir un dépistage génétique des anomalies des gènes MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2 devra être réalisé.

### **6.1. Recherche d'une instabilité des séquences microsatellites**

Le test MSI permet de déterminer si un microsatellite a été modifié. La technique d'analyse du statut des microsatellites est basée sur l'amplification de 5 marqueurs microsatellites, il s'agit de 2 marqueurs mono-nucléotidiques et trois marqueurs di-nucléotidiques [36]. L'analyse se fait en parallèle à partir de l'ADN extrait de tissu sain (tissu adjacent à la tumeur) ou des lymphocytes du sang périphérique afin de vérifier si les microsatellites montrent des expansions ou des délétions.

L'existence d'une instabilité des microsatellites (phénotype MSI) au niveau d'une tumeur est définie par l'existence d'un profil instable pour au moins 3 marqueurs (sur les 5 amplifiés) en l'absence d'analyse comparative possible avec du tissu sain et pour au moins 2 marqueurs en cas d'analyse comparative avec le profil d'amplification obtenu à partir de l'ADN extrait du tissu sain [36].

- 🚩 Si un marqueur montre un changement de taille, le phénotype est appelé MSI-L (pour MicroSatellite Instability Low).
- 🚩 Si deux ou plusieurs marqueurs sont instables, le phénotype est appelé MSI-H (pour MicroSatellite Instability High)

Le phénotype MSI-L n'est d'ailleurs pas observé dans les tumeurs des patients porteurs d'une mutation délétère constitutionnelle d'un gène MMR.

Ce test peut être très utile pour des familles qui ont une forte probabilité d'avoir le syndrome, même lorsque l'expression des protéines de réparation semble normale ou chez les personnes qui répondent aux critères de Bethesda [31].

La mise en évidence d'un phénotype MSI renforce la présomption clinique de syndrome de Lynch et constitue une indication de consultation de génétique oncologique en vue de la recherche d'une mutation constitutionnelle des gènes du système MMR avant le séquençage de ces gènes.

## **6.2. Les tests immunohistochimie(IHC)**

L'étude immunohistochimique consiste à évaluer et apprécier l'expression tissulaire des enzymes de réparation de l'ADN. Cette analyse est fondée sur la mise en évidence d'une perte d'expression d'une ou plusieurs de ces enzymes au sein des cellules tumorales par comparaison à un témoin interne positif au sein de la muqueuse colique normale [53,58].

L'expression des principales protéines du système MMR peut être étudiée à l'aide d'anticorps mono-clonaux qui sont : MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2 [31]. La perte d'expression des protéines MLH1 et MSH2 est exclusive, elle ne concerne qu'une seule des deux protéines. En revanche, en cas de perte d'expression de la protéine MLH1, on observe une perte d'expression conjointe de la protéine PMS2.

De la même manière, l'extinction de la protéine hMSH2 s'accompagne d'une extinction de la protéine hMSH6, probablement du fait d'interactions avec d'autres homologues de MutL, tels que hPMS1 ou hMLH3 [35,39].

Une perte d'expression des protéines Pms2 ou Msh6 peut être isolée, en raison de la redondance du système MMR.

Cette méthode est réalisable en routine dans tous les laboratoires de pathologie, elle est rapide et peu coûteuse. Sa sensibilité varie entre 92 et 100% [48,59].

## **7. Génétique moléculaire**

### **7.1. Analyse constitutionnelle**

L'identification d'une mutation constitutionnelle délétère chez l'individu suspecté de syndrome de Lynch est indispensable afin de préciser le conseil génétique.

L'analyse constitutionnelle est réalisée sur l'ADN leucocytaire obtenu à partir d'une prise de sang, si la tumeur du patient présente un phénotype MSI et/ou une extinction en immunohistochimie (à l'exclusion des méthylations MLH1 liées à l'âge),

Cependant en l'absence de données immunohistochimiques, la plupart des laboratoires débutent par l'analyse des gènes MSH2 et MLH1 (impliqués dans 90 % des cas) en criblant l'intégralité des gènes MSH2 et MLH1, le plus souvent par séquençage direct puis par recherche de grands réarrangements.

## 7.2. Les gènes MMR

Les mutations dans les gènes MLH1 et MSH2 représentent respectivement 40% et 50% des mutations responsables du syndrome de Lynch, MSH6 représente 7-10% et PMS2 représente à moins de 5% de ces altérations. En plus des études récentes ont montrées que la délétion du codon terminale de gène EPCAM situé juste en amont de gène MSH2 peut entrainer l'inhibition du gène MSH2 conduisant à un phénotype LS (1-3%) comme il est illustré dans la figure suivante [60].

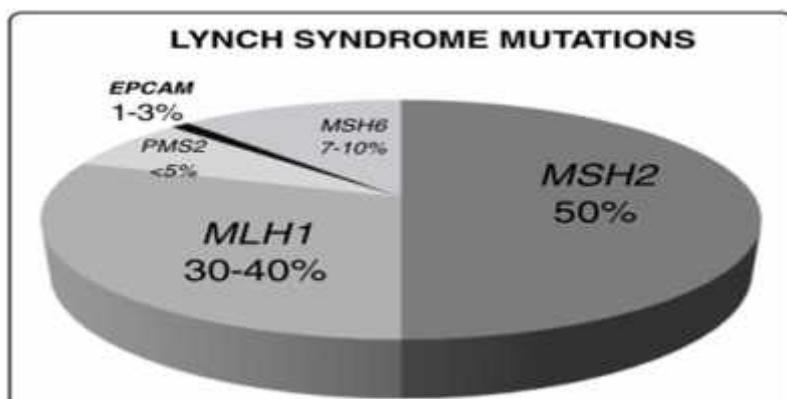
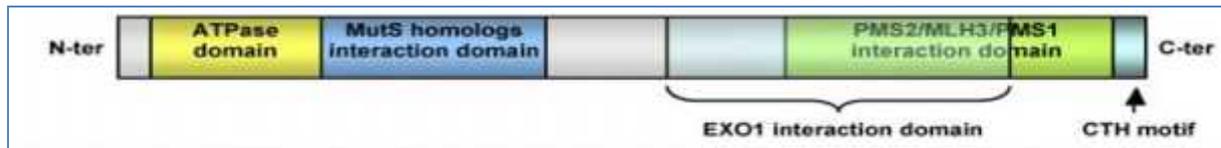


Figure 6 : Fréquence des mutations de gènes de réparation des mésappariements dans le syndrome de Lynch [61].

### a) Le gène MLH1

Le gène MLH1 est situé sur le chromosome 3p21 contenant 19 exons qui s'étendent sur plus de 58 kb, il code pour une protéine de 84 kDa constituée de 756 acides aminés.

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) (figure 7) [62].



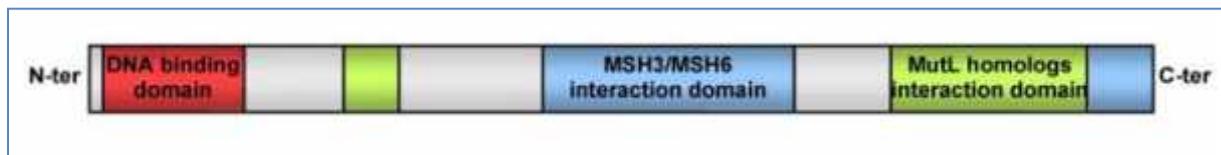
**Figure 7 : Principaux domaines fonctionnels de la protéine MLh1 [62].**

Les familles avec des mutations dans le gène MLH1 ont tendance à être affectées par le cancer de colon avec une incidence plus élevée que les familles avec d'autres mutations [39,63, 64].

La perte d'expression de la Mlh1 peut aussi être liée à une inactivation somatique au cours d'un cancer colorectal sporadique due à une hyperméthylation du promoteur de ce gène, Cette méthylation est liée à l'âge et conduit à l'inactivation somatique des 2 allèles du gène avec extinction de la protéine Mlh1 dans la tumeur [65].

**b) le gène MSH2**

Ce gène est localisé dans le chromosome 2p16, il contient 16 exons de 73 kb, la protéine est constituée de 934 acides aminés [66]. 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 (figure 8).



**Figure 8 : Principaux domaines fonctionnels de la protéine Msh2 [67].**

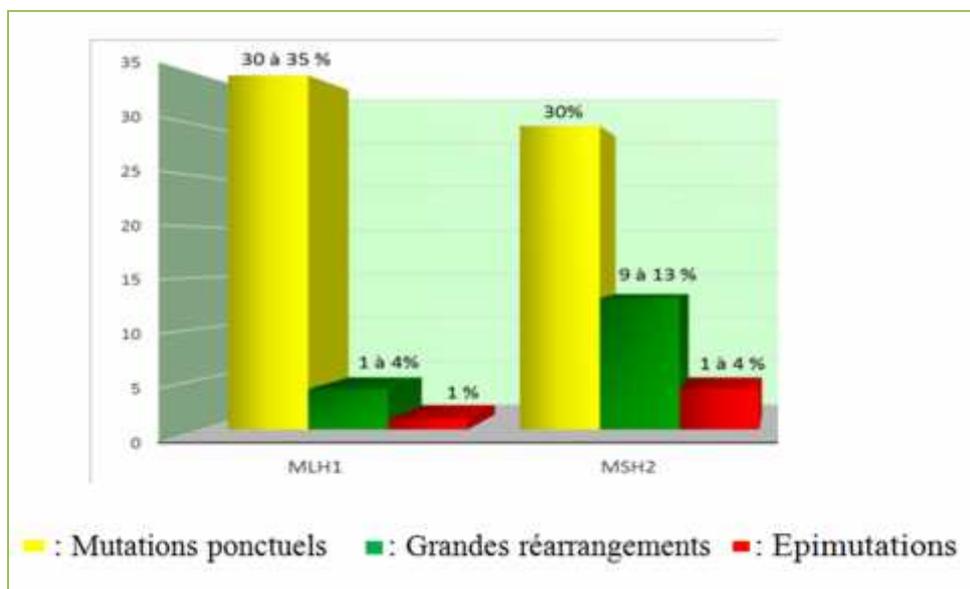
Les mutations de lignée germinale dans ce gène ont tendance à conduire à l'abolition de la protéine, ces mutations comprennent les codons stop prématurés, et des sites d'épissage modifiés [35].

La perte d'expression de Msh2 ou Msh6 est souvent le reflet d'une mutation germinale et donc d'un syndrome HNPCC, car l'inactivation de Msh2 et Msh6 est rare au cours des cancers sporadiques.

Les gènes MLH1 et MSH2 sont les plus étudiés pour comprendre l'étiologie de syndrome de lynch, pour cela certains laboratoires effectuent le séquençage direct afin de révéler les mutations ponctuelles, des microdélétions ou microinsertions responsables de cette maladie [68].

### 7.3. 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 9.



**Figure 9 : Répartition des mutations des gènes MLH1 et MSH2 du système MMR dans le syndrome de Lynch [69].**

## **I-Matériel biologique**

Il s'agit d'une étude prospective, portant sur une série de 9 patients présentant un cancer colorectal. Ces patients ont été colligés au sein du laboratoire d'oncogénétique du Centre Hospitalier universitaire Hassan II de Fès, et suivis pour un cancer du colon héréditaire. Lors de diagnostic, pour ceux qui ont un âge inférieur à 50 ans, l'histologie d'adénocarcinome colorectal a été confirmée. Cependant, ceux qui étaient âgés de plus de 50 ans ils ont présentés des antécédents familiaux au premier degré de cancer colorectal ou du spectre de syndrome de Lynch.

Les patients doivent signer une fiche de consentement (Annexe 5) dans laquelle ils expriment leur accord d'utiliser leur prélèvement dans l'étude.

## **II. méthodes**

Une extraction d'ADN est d'abord réalisée, suivie de sa quantification par dosage spectrophotométrique. Une réaction PCR des échantillons d'ADN a été réalisée par la suite pour amplifier les régions cibles. Le contrôle d'ADN amplifié se fait par une électrophorèse sur gel d'agarose. Pour la mise en évidence des mutations affectant les gènes MLH1 et MSH2 un séquençage des produits PCR est finalement réalisé.

### **1. Prélèvement sanguin et conservation**

Pour chaque patient de la série d'étude, un prélèvement du sang veineux a été réalisé (3 à 5 ml) dans un tube EDTA (Ethylène Diamine Tétra-acétique acide) puis stocké à -20°C.

### **2. Extraction d'ADN par sel sur sang**

#### **2.1. Principe**

L'extraction de l'ADN, est la première étape pour l'analyse et la recherche moléculaire des cancers. Elle consiste en l'isolement de l'ADN à partir du sang en quantité suffisante pour permettre son analyse.

La technique utilisée pour l'extraction est une technique classique de salting-Out. Un lavage est d'abord effectué pour éliminer les globules rouges. Les globules blancs restants sont traités par une solution de lyse pour déstabiliser la membrane de la cellule, et par la

protéine K pour la digestion des protéines cellulaire. Après la lyse cellulaire, l'ADN est précipité et récupéré sous forme d'une « méduse ».

## 2.2. Réactifs utilisés

Pour réussir l'extraction, 7 réactifs sont mis en jeu dont chacun joue un rôle précis (Annexe 1) :

- Tris-EDTA 20 mM / 5 mM
- Tris-EDTA 10 mM / 1 mM
- Solution de lyse (SLB) à +42°C
- Protéinase K 10 mg/ml
- Na Cl 5 M
- Ethanol 75% à +4°C
- Eau Distillé stérile

## 2.3. Protocole expérimentale :

L'extraction se déroule selon une succession d'étapes. Avant de procéder, le sang est d'abord décongelé.

### Lyse des globules rouges :

Une fois décongelé, le sang est versé dans un tube de 15 ml. Puis, deux volumes de tampon de l'extraction TE 20/5 sont ajoutés. Les tubes sont incubés dans la glace pendant 20min. Une centrifugation à 2500 tr/mn pendant 5 mn est réalisée, le surnageant est ensuite enlevé en gardant le culot intact.

Ces étapes sont répétées jusqu'à l'apparition d'un culot blanc contenant seulement les globules blancs.

### Lyse des globules blancs

Pour cette étape, une solution de lyse SLB (3ml) et la protéine K (100 µl) sont ajoutées sur le culot récupéré. Les tubes sont incubés pendant une nuit à 42°C ou bien une heure à 65°C.

### Dénaturation et précipitation des protéines

L'isolement de l'ADN des débris protéiques et cellulaires, se fait par l'ajout de 4 ml de l'eau distillé et 4 ml de NaCl. Une centrifugation pendant 30 minutes à 3000 rpm est nécessaire pour la précipitation, le surnageant est ensuite récupéré dans des tubes de 50ml.

#### Précipitation de l'ADN extrait.

Afin de précipiter l'ADN isolé, deux volumes de l'éthanol absolu froid (conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$ ) sont ajoutés pour induire l'apparition de la "la méduse" après homogénéisation. "La méduse" est récupérée dans un tube eppendorf à l'aide d'une pipette pasteur. Une évaporation à  $37^{\circ}\text{C}$  est nécessaire pour éliminer toute trace d'éthanol.

L'ADN précipité doit être élué dans 200  $\mu\text{l}$  de TE (Tris-EDTA). Puis, stocké à  $+4^{\circ}\text{C}$  pour toute utilisation ultérieure.

Une meilleure conservation de l'ADN est recommandée à  $-20^{\circ}\text{C}$ , pour une durée prolongée.

### **3. Dosage de l'ADN**

La quantité des acides nucléiques extraite peut être appréciée selon une technique qui fait appel à l'absorbance des acides nucléiques dans l'ultraviolet.

Les acides nucléiques extraits sont dosés par mesure de la densité optique à 260 nm à l'aide d'un « NANODROP». La mesure de la densité optique à 280 nm permet d'estimer la quantité de protéines résiduelles. Le rapport  $\text{DO}_{260}/280\text{nm}$  permet d'évaluer la pureté de l'ADN. Un rapport proche de 2 reflète une pureté satisfaisante. Une unité de densité optique correspond à 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  d'ADN double brin.



Figure 1 : Spectrophotomètre NANODROP

Afin de passer à la phase d'amplification d'un gène recherché par PCR, il est nécessaire que les solutions d'ADN extraits aient la même concentration (100 ng/ml). Il faut donc estimer la concentration d'ADN pour chaque solution afin de réaliser la bonne dilution.

#### **4. Amplification en chaine par polymérisation**

Pour la recherche des mutations affectant les gènes MLH1 et MSH2, une réaction de polymérisation en chaine est réalisée pour les exons 2,4 et 5 du MLH1, et les exons 2, 3 et 10 du MSH2.

##### **4.1. Choix des amorces**

Les séquences d'amorces utilisées pour la PCR et le séquençage, sont déterminées à partir d'un article scientifique traitant les mutations qui affectent les gènes MMR [70]. La vérification des séquences est réalisable grâce au programme BLAST prime. Ces amorces sont hybridées avec une partie de la région intronique de chaque exon (Annexe 2).

Le choix des amorces est sans doute le paramètre le plus important pour le succès de la PCR. Pour la sélection des amorces, Plusieurs variables doivent être prises en considération :

- La longueur de l'amorce,
- Les amorces R/F doivent s'hybrider à l'ADN matrice dans les mêmes conditions de température ;
- La spécificité,
- Les séquences des deux amorces ne doivent pas être complémentaires ;
- La teneur en G/C.

Les séquences des couples d'amorces choisis, sont motionnées dans le tableau suivant (1).

**Tableau 1: séquences et températures d'hybridation des couples d'amorces utilisés pour l'amplification par PCR des deux gènes [70].**

	Exons	Séquence d'amorce 5' - 3'	Tm du fabricant
<b>MLH1</b>	2	5' TGTATGAGCCTGTAAGACAAAG 3' 5' CCTTTCTCTGTTCTGGAAACTA3'	58°C
	4	5' CTCATCGTTGCCACATATTA3' 5' TTTTGGCAGAGATCTTGAGTAC3'	58°C
	5	5' TCCCCTTGGGATTAGTATCTAT3' 5' ATGACTATTGGCTTTTGTGG3'	58°C
<b>MSH2</b>	2	5' ATGGAACTATAAGTCCAGTAAGC3' 5' AAAAAGTTGCAGTTTGGCTG 3'	56°C
	3	5' AGAATCGATTGAACCCTTGA3' 5' GGAAAGGCTCTTTAATTGAC3'	62°C
	10	5' CAGCTTTCAGTCAGAAACT 3' 5' CAGGTAAGTGCAAGTTTCTT3'	54°C

## 4.2. La réaction de la PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une réaction qui permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'ADN délimitées par des amorces. Pendant chaque cycle, l'amplification se fait par une suite de réplication de la matrice ADN double brin. Les amorces choisies sont spécifiques de la zone d'intérêt.

La PCR consiste en une succession de trois étapes :

- Dénaturation d'ADN à une température élevée afin d'obtenir des brins monocaténaires.
- Hybridation de deux oligonucléotides (amorces) à l'ADN cible.
- Elongation de la chaîne d'ADN par l'ajout des différents nucléotides, à l'aide de la Taq polymérase.

Ces étapes sont illustrées dans la figure suivante (2) :

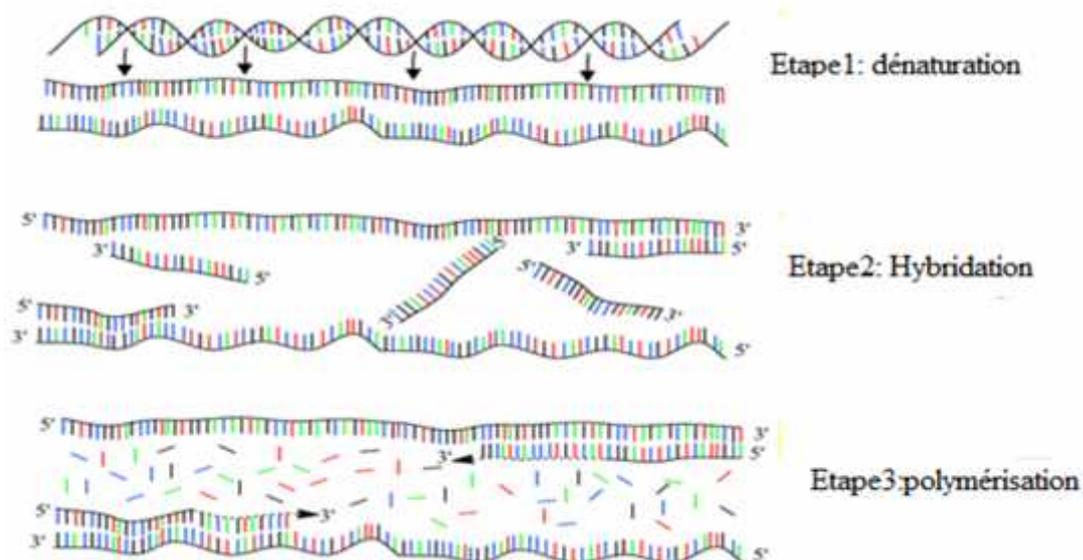


Figure 2: différents étapes d'une PCR [71].

### a) Réactifs nécessaires

Chaque réactif ajouté, joue un rôle primordial dans la réaction PCR :

- L'eau distillée stérile : dilution des réactifs et le maintien d'un volume final de 20  $\mu$ l.
- Tampon : le maintien du pH du milieu réactionnel.

- ✚ MgCl<sub>2</sub> : c'est un cofacteur de la Taq polymérase.
- ✚ dNTP constitué de dATP, dTTP, dCTP, dGTP (10 mM pour chacune), ils sont nécessaires pour la synthèse d'ADN.
- ✚ Amorces F/R : elles sont fournies à l'état lyophilisé, donc elles ont été diluées avec le tampon pour obtenir une solution de 10µM.
- ✚ La Taq polymérase : catalyseur de la réaction. Une unité de Taq correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour transformer 10 nmoles de dNTP en matériel acide insoluble.
- ✚ L'ADN : la PCR peut être effectuée si au moins une copie intacte du gène cible est présente.

### ***b) Protocole et programme de la PCR***

Pour chaque exon, les différents réactifs sont mélangés dans un tub eppendrof. La réaction se poursuit d'une manière automatique. Les tubes contenant le mélange réactionnel sont soumis à des cycles de température répétés dans un thermocycleur Applied Biosystem 2700 (appareil qui comporte une enceinte où l'on dépose les tubes des échantillons et dans laquelle la température peut varier, très rapidement et précisément, de 0 à 100°C).

L'amplification s'effectue en 35 cycles. Chaque cycle comprend trois périodes de quelques dizaines de secondes. Cependant, avant de commencer les cycles PCR, une étape de dénaturation qui dure 5 min à 95°C est réalisée. Cette étape permet de déshybrider les ADN double brin, casser les structures secondaires, et dénaturer d'autres enzymes qui pourraient être dans la solution. Après l'amplification, une élongation finale à 72°C est nécessaire, permettant à la Taq polymérase de terminer la synthèse des brins qu'elle n'a pas eu le temps de finir pendant les cycles précédents.



Figure 3 : Thermocycleur Applied Biosystem 2700

Les volumes, les concentrations des réactifs, sont mentionnés dans les tableaux suivants.

**Tableau 2: Composition du mélange réactionnel pour l'étude de différents exons du gène MLH1 et MSH2.**

Réactifs	Concentrations	volume
<b>Eau distillé stérile</b>	-	11,8ul
<b>Tampon</b>	5X	2ul
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	25 mM	1ul
<b>dNTP</b>	10 mM	2ul
<b>Amorces R et F</b>	10 µM	2 ul
<b>Taq</b>	5 µ/µl	0,2 ul
<b>ADN</b>	100 ng/µl	1 ul

**Tableau 3 : programme PCR**

Etape		T (°C)	Temps	Cycles
Dénaturation initiale		95 °C	5 min	1
Dénaturation		95 °C	30 s	35
Hybridation	MLH1	Exon 2	58	
		Exon 4	58	
		Exon 5	58	
	MSH2	Exon 2	50	
		Exon 3	62	
		Exon 10	53	
Elongation		72°C	30 s	
Elongation finale		72°C	5min	1

#### 4.3. Détection et analyse des produits PCR

##### a) Principe

L'électrophorèse sur gel d'agarose est la technique utilisée pour l'analyse et la détection des produits PCR. Cette technique est basée sur le déplacement de particules chargées en

solution, sous l'influence d'un champ électrique généré par un courant continu. Les molécules d'ADN chargées négativement à pH neutre, migrent vers l'anode (+).

La visualisation des fragments d'ADN est possible grâce à l'utilisation d'une molécule fluorescente sous l'UV. C'est le bromure d'éthidium, agent intercalant qui se fixe entre les bases nucléiques à l'intérieur de la double hélice. Par ailleurs, le front de migration est détecté, à l'aide de bleu de bromophénol (Annexe 1).

#### **b) Réactifs nécessaires**

-  poudre d'agarose
-  TBE 1X
-  TAE
-  BET
-  Bleu de bromophénol

#### **c) Protocol expérimental**

Afin de préparer un de gel de 1%, 0,5g de la poudre est mélangé avec 50ml de TBE 1X dans un récipient. La solution est portée à l'ébullition pendant 1 min, puis 2 µl de BET (10 mg /l) sont ajoutés. Le gel est coulé dans un moule, on y installe deux peignes qui seront éliminés après refroidissement du gel, ce qui permet de créer des puits où sera déposé l'ADN. Le gel est installé par la suite dans une cuve remplie de tampon de migration TBE.

Pour le dépôt, 5 µl de produit PCR sont mélangées avec 2 µl de la solution de charge (bleu de bromophénol). Le mélange est déposé dans chaque puits (le nombre des puits dépend de nombre des exons étudiés et aussi des patients). La migration est réalisée à 100V et après 30 min les bandes sont visualisées sous l'UV.

Des produits de très petite taille sont souvent visibles très près du front de migration sous forme de bandes plus ou moins diffuses. Ils correspondent à des dimères d'amorces et parfois aux amorces elles-mêmes. Selon les conditions réactionnelles, il arrive que des fragments non spécifiques d'ADN soient amplifiés en quantité plus ou moins abondante, formant des bandes nettes ou des « traînées » (smear).

A la fin de la migration, le gel est photographié avec un appareil d'analyse d'images sous lumière UV afin de conserver et d'analyser les résultats.

## **5. Séquençage des produits PCR**

Les échantillons pour lesquels l'amplification par PCR a réussie, sont ensuite purifiés afin d'éliminer les sels, les amorces, les enzymes et les dNTP non incorporés, pour ne pas s'interférer avec la séquence d'intérêt.

### **5.1. Purification par ExoSAP®.**

#### ***a) principe***

Ce kit est conçu pour une purification rapide et efficace des produits PCR. Il comporte deux enzymes hydrolytiques, l'exonucléase S1 (ExoI) qui dégrade les brins monocaténares donc les amorces, et la phosphatase alcaline qui hydrolyse les dNTP's en excès sans interférence avec les applications en aval. L'enzyme est active à 37°C et inactive à 80°C. Les fragments simples brins inférieurs à 100 pb sont ainsi dégradés.

#### ***b) protocole expérimental.***

Dans un tube eppendorf, 1.5 µl de l'enzyme ExoSAP sont ajoutés à 3 µl de produit PCR. Le tube est ensuite placé au niveau du thermocycleur selon le programme motionné dans le tableau suivant :

**Tableau 4: cycles de température pour la purification par Exo SAP.**

Stades	Températures	Temps
1	37 °C	15 min
2	80°C	30 min
	10°C	+

### **5.2. Réaction de séquence par BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing.**

La réaction de séquence utilisée au laboratoire repose sur la méthode de SANGER ou méthode des interrupteurs de chaîne, adaptée à la fluorescence.

#### ***a) Principe de la méthode de SANGER***

La réaction de Sanger, repose sur l'incorporation aléatoire par l'ADN polymérase (BigDye®), de didéoxynucléotides interrupteurs de chaîne (ddNTP).

Ces ddNTP sont présents dans le milieu réactionnel et chacun est marqué par un fluorophore spécifique dont le spectre d'émission est spécifique. Une analyse spectrale permet de différencier les différents fluorochromes associés à la base correspondante et donc de définir la séquence nucléotidique du brin d'ADN initial. Les fragments d'ADN synthétisés portent ce fluorophore terminal. On les appelle des terminateurs d'élongation ou bien « *Dye-labeled terminator* ».

**Ainsi, la réaction de séquence va être composée de : l'ADN matrice + dNTPs + ddCTP fluorescent en bleu + ddATP fluorescent en vert + ddGTP fluorescent en noir + ddTTP fluorescent en rouge.**

La technologie Big Dye Terminator (BDT) utilise un système de transfert d'énergie par résonance (FRET) entre deux fluorochromes fixés sur le même ddNTP et reliés entre eux par un linker. Le premier est une fluorescéine (6 carboxyfluorescéine) appelé fluorochrome donneur, commun aux quatre ddNTP. Le second est une dichlororhodamine (dRhodamine) qui joue le rôle de fluorochrome accepteur.

Le fluorochrome donneur est excité par un rayon laser à argon émettant à 488nm et 514,5nm. Son énergie de fluorescence émise (515-520nm) est captée intégralement par le fluorochrome accepteur qui est excité à son tour. Le spectre de la fluorescence remise sera ainsi spécifique de chaque type de ddNTP. Le transfert du signal de la fluorescéine vers la dRhodamine permet une amplification du signal et, par conséquent, une augmentation de la sensibilité de la technique (figure 4).

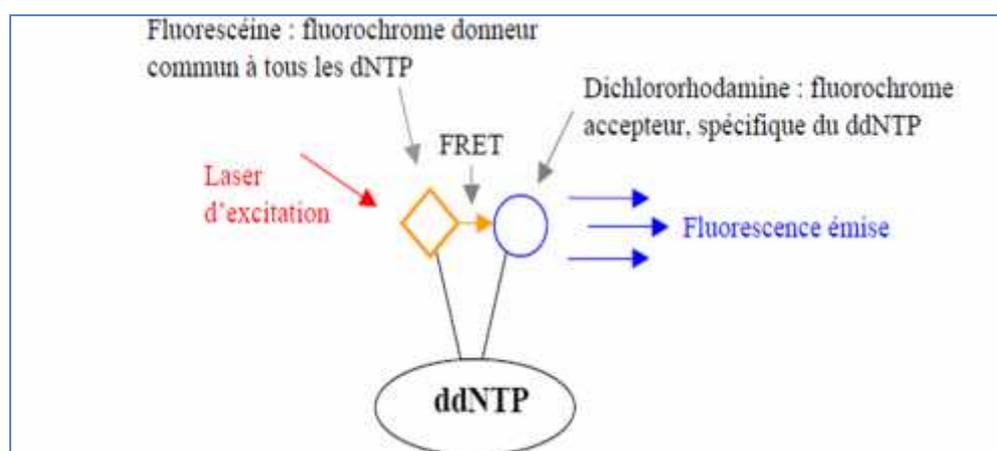


Figure 4: Mécanisme de la fluorescence par la technique du transfert d'énergie par résonance [72]. FRET : transfert d'énergie par résonance entre deux fluorochromes.

**b) réactifs nécessaires**

 Kit de la réaction de séquence ABI®BigDye® Terminator V1.3 cycle sequencing Kits  
qui contient principalement:

- Taq polymérase
- dNTP
- ddNTP marqués
- tampon
- MgCL2

 Produit PCR purifié

 Amorces spécifiques (F)

 Eau stérile

**c) Protocole expérimental**

Les volumes des réactifs ajoutés pour chaque exon sont les mêmes, comme le montre le tableau suivant.

**Tableau 5 : Composition du mélange de réaction de séquence :**

Tube	F(Forwad)
Amorce	1 µl
Produit PCR	4 µl
Eau distillée stérile	1 µl
Bigdye	2 µl
Tampon	2 µl
Volume final	10 µl

Le tube est incubé dans le Thermocycleur et le programme suivant est utilisé (tableau 6).

**Tableau 6: Programme de la réaction de séquence.**

étapes	Température	temps
1	96 °C	1min
2	96°C	10s
	50°C	5s
	60°C	4min
3	10°C	

### 5.3. Purification du produit de la réaction de séquence avec le Kit BigDye-XTerminator.

#### a) Principe

Le kit BigDye® Xterminator™ permet la purification des produits de réaction de séquence en capturant les dyes non incorporés dans la réaction, les sels et autres molécules chargées qui pourraient interférer lors de la détection des bases par électrophorèse capillaire.

Le kit contient : -un flacon “SAM Solution” (stockage à T° ambiante).

- un flacon: « XTerminator Solution (stockage à 4°C, ne pas congeler).

#### b) Protocole expérimental

En premier temps, 10 µl de produits de réaction de séquence sont déposés dans la plaque Applied. Un mix contenant 45 µl de solution SAM par puits, et 10 µl de XTerminator Solution par puits est préparé dans des cônes spécifiques. Ensuite, Le mélange est vortéxé et 55µl du mix préparé est ajouté dans chaque puits. La plaque est scellée correctement avec un film adhésif. Une agitation légère pendant 30 min est réalisée, suivie par une centrifugation à 1000 g pendant 2min. Le surnageant est récupéré dans les puits de la plaque de séquenceur. Le run est lancé sur le séquenceur.

Les plaques peuvent être conservées 7 jours à 4°C avant d’être analysées avec le séquenceur.

### **c) chargement de l'appareil et détermination de la séquence**

La plaque est placée dans le séquenceur (figure 5) qui est un automate d'électrophorèse capillaire. Les fragments d'ADN migrent selon leur charge sous un champ électrique à travers un capillaire, ce qui entraîne la migration des fragments d'ADN. Au fur et à mesure que la migration s'effectue, les différents fragments d'ADN vont se séparer selon leur taille (les plus petits migreront plus loin). Une fois arrivés au site de détection, les quatre fluorochromes des ddNTP terminaux seront excités. Suite à cette excitation, chaque fluorochrome émettra une lumière à une longueur d'onde différente qui sera détectée puis convertie en séquence par le logiciel d'analyse des séquences.

La figure ci-dessous représente un exemple d'enregistrement obtenu à partir du séquenceur automatique.

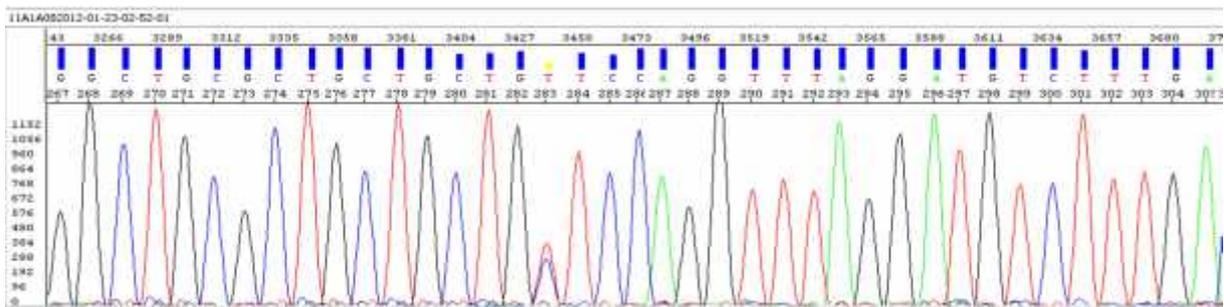


Figure 5: Exemple d'enregistrement obtenu à partir d'un séquenceur automatique.

## **6. Les outils de bioinformatiques.**

### **6.1. Logiciel BLAST primer**

BLAST Primer est un logiciel accessible en ligne, et permet de mettre au point les amorces qui vont être utilisés pour la PCR [73].

### **6.2. Logiciel BLAST**

BLAST (acronyme de basic local alignment search tool) est un algorithme utilisé en bioinformatique permettant de trouver les régions similaires entre deux ou plusieurs séquences de nucléotides ou d'acides aminés. Ce programme permet de calculer significativement les pourcentages de similitude (parfois abusivement qualifiés de "pourcentages d'homologie") entre les séquences en les comparant avec des banques de données. Il existe différents types d'analyse du programme BLAST ; dans notre étude, on a

utilisé l'outil Blastn pour comparer les séquences obtenues après séquençage avec les séquences répertoriées dans la banque de données [74].

### **7. LOVD InSiGHT Database ([www.insight-group.org](http://www.insight-group.org)).**

La base de données LOVD est un outil librement disponible et flexible pour la collecte des données concernant les variantes génétiques [75].

La base de données de LOVD-Insight est une base de données modifiée et optimisée pour afficher les données du gène MLH1, MSH2 et de huit autres gènes, couramment impliqués dans le CRC héréditaire.

INSIGHT (International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours) fournit une séquence de référence de codage qui a permis une numérotation internationale normalisée de nucléotides, permettant le positionnement correct d'une variante. La numérotation de variante se rapporte à la séquence nucléotidique par rapport au site de départ ATG, où «A» est la première base de la séquence de codage [76].

### **8. Universal Mutations Database : UMD**

UMD est une base de données, des mutations des gènes MMR identifiés dans les laboratoires français (base de données UMD : [www.umd.be](http://www.umd.be)). Elle est fondée par le Réseau National des Laboratoires d'Oncogénétique Digestive (coordonné par le Dr S. Olschwang), afin de classer les variants répertoriés, sur la base des critères familiaux (critères d'Amsterdam,), tumoraux (étude du phénotype tumoral) et de prédictions bioinformatiques. Ainsi, pour 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 [77].

## **Résultats**

## I. Les critères cliniques et pathologiques

La présente étude est portée sur 9 patients marocains, suspects syndrome de Lynch. Les données concernant ces patients, sont regroupées dans le tableau 1.

**Tableau 1 : critères cliniques des patients.**

patient	Sexe	Age	Antécédent Familial	Localisation de la tumeur	Type histologique	Critères d'inclusions		
						Cancer associé	Bethesda	Amsterdam
P1	M	45	Oui	Coecum ascendant	Adénocarcinome	0	+	-
P2	M	45	Non	Coecum ascendant	Adénocarcinome	0	+	-
P3	M	39	Non	Bas rectum	Adénocarcinome	0	+	-
P4	M	38	Non	coecum ascendant	Adénocarcinome	0	+	-
P5	M	41	Non	Charnière recto-sigmoïdienne	Adénocarcinome	0	+	-
P6	F	50	Oui	coecum ascendant	Adénocarcinome	0	+	-
P7	F	68	Oui	Coecum ascendant	Adénocarcinome	0	+	-
P8	F	50	Non	Charnière recto-sigmoïdienne	Adénocarcinome	0	+	-
P9	M	31	Oui	Bas rectum+ colon descendant	Adénocarcinome	1	+	-

Le tableau 1 montre qu'il s'agit de trois femmes et six hommes. L'âge lors diagnostic, est compris entre 31 et 68 ans. Aucun patient de la série d'étude n'a rempli les critères d'Amsterdam I et II. Cependant l'ensemble des patients ont répondu aux recommandations de Bethesda.

Les tumeurs primaires, ont été localisées au niveau de coecum ascendant pour 5 patients ; au niveau de la charnière recto-sigmoïdienne pour 2 patients; au niveau du bas rectum pour un patient ; et au niveau de bas rectum et colon descendant pour un patient. Parmi les neufs patients, il y a un seul patient qui présente un cancer associé au syndrome de Lynch (colon+rectum).

Concernant l'histoire familiale, quatre patients ont présenté des antécédents familiaux, avec la présence d'autres types de cancer.

La figure suivante représente l'arbre généalogique des patients 6 et 9 :

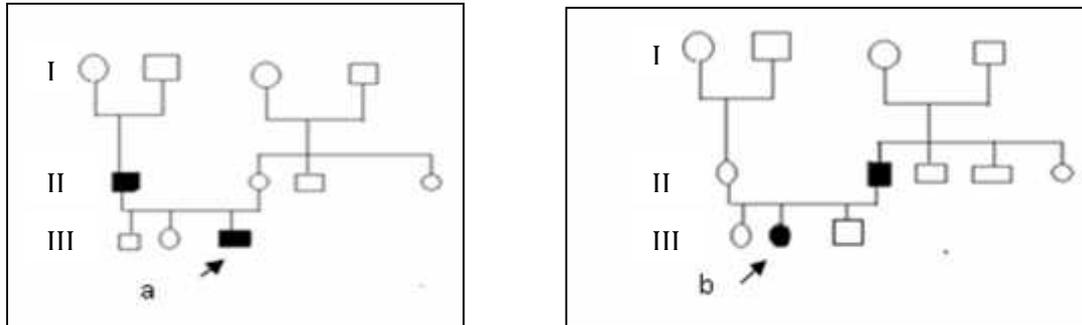


Figure 1 : Arbres généalogiques des patients 6 et 9. a : p9 ; b : p6.

○ : Femme

II : deuxième génération

□ : Homme

III : troisième génération

I : première génération

A partir des résultats obtenus (tableau 1), les adénocarcinomes représentent 100% des cancers colorectaux.

## **II. Etude moléculaire**

Une série de 9 patients, a fait l'objet d'une analyse moléculaire, visant à amplifier les exons 2,4 et 5 du gène MLH1, et les exons 2,3 et 10 du gène MSH2. Ces exons sont ensuite séquencés pour la recherche de mutations.

### **1. Analyse qualitative et quantitative de l'ADN extrait**

La quantité et la qualité d'ADN jouent un rôle primordial dans la réussite des techniques de la biologie moléculaire (PCR et séquençage). L'extraction d'ADN est réalisée par la méthode classique de « Salting- Out » à partir du sang total des patients étudiés.

Le rapport de l'absorbance DO 260 /DO 280 est compris entre 1.7 et 1.9, donc ces extraits ne sont contaminés ni par l'ARN ni par les protéines (Annexe 3).

Le tableau 2 illustre les concentrations d'ADN extrait à partir des différents patients.

**Tableau 2 : concentrations des différents ADN extraits par la technique de salting-out.**

N°	Concentrations d'ADN (ng/μl)
P1	204
P2	75
P3	282
P4	505
P5	671
P6	89
P7	87
P8	1282
P9	1068

## **2. Amplification par PCR.**

La PCR est une technique très sensible, capable d'amplifier in vitro une région spécifique d'un acide nucléique afin d'en obtenir une quantité suffisante pour pouvoir le détecter et l'étudier.

La mise au point des amorces utilisées, est une étape clef pour la réussite de cette réaction.

### **2.1. Vérification des couples d'Amorces utilisés sur le logiciel BLAST Primer**

Les couples d'amorces choisies à partir de l'article scientifique [70], sont vérifiés par le logiciel Blast primer. Les séquences de chaque exon étudié et les amorces utilisées, sont copiées dans le logiciel. Par la suite, ce dernier affiche les différentes caractéristiques des amorces (Tm, la taille de l'amplicon, le pourcentage en GC....).

Les figures suivantes (2,3) illustrent les résultats de la recherche sur le logiciel Blast primer:

**A****Primer pair 1**

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TGTATGAGCCTGTAAGACAAAG	22	55.84	40.91	3.00	0.00
Reverse primer	CCTTTCTCTGTTCTGGAACTA	22	55.41	40.91	4.00	2.00

**B****Primer pair 1**

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CTCATCGTTGCCACATATTA	20	53.20	40.00	4.00	3.00
Reverse primer	TTTTGGCAGAGATCTTGAGTAC	22	56.10	40.91	6.00	4.00

**C****Primer pair 1**

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TCCCCTTGGGATTAGTATCTAT	22	54.87	40.91	5.00	2.00
Reverse primer	ATGACTATTGGCTTTTGTGGG	21	56.48	42.86	2.00	0.00

Figure 2 : Caractéristiques des deux couples d'amorces des exons du gène MLH1 déterminés par BLAST primer. A : exon 2 ; B : exon 4 ; C : exon 5.

**D****Primer pair 1**

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ATGGAActATAAGTCCAGTAAGC	23	55.56	39.13	8.00	2.00
Reverse primer	AAAAAGTTGCAGTTTGGCTG	20	55.85	40.00	4.00	1.00

Detailed primer reports						
Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AGAATCGATTGAACCCTTGA	20	54.36	40.00	8.00	1.00
Reverse primer	GGAAAGGCTCTTAATTGAC	20	52.13	40.00	6.00	2.00

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CAGCTTTCAAGTCAGAACT	20	53.76	40.00	4.00	3.00
Reverse primer	CAGGTAAGTGCAAGTTCTT	21	53.69	38.10	3.00	3.00

Figure 3 : Caractéristiques des amorces des exons du gène MSH2. D : exon 2 ; E : exon 3 ; F : exon 10.

Les résultats obtenus par le logiciel BLAST primer, montrent que les différents couples d'amorces testés, répondent aux conditions d'utilisation. En effet, pour toutes les amorces la longueur est comprise entre 20 et 23 Pb, et les différences des températures d'hybridation entre chaque couple d'amorce n'excèdent pas 3°C.

## 2.2. Résultats de PCR des deux gènes étudiés

### a) Résultats d'amplification du gène MLH1

Malgré sa simplicité, la PCR reste une technique parfois délicate à réaliser. Certaines conditions expérimentales ne permettent pas le bon déroulement de la technique. On peut noter par exemple, les risques de contamination lors des manipulations au laboratoire, ainsi que la possibilité de dégradation des acides nucléiques.

Pour les trois exons (2,4 et 5) du gène MLH1, l'utilisation de protocole expérimental détaillé dans la partie matériel et méthode et en se basant sur les températures d'hybridations commercialisées avec les amorces commandées nous a permis d'obtenir les résultats mentionnés dans la figure 3. Notons que l'ADN utilisé est extrait à partir du sang de patient 1.

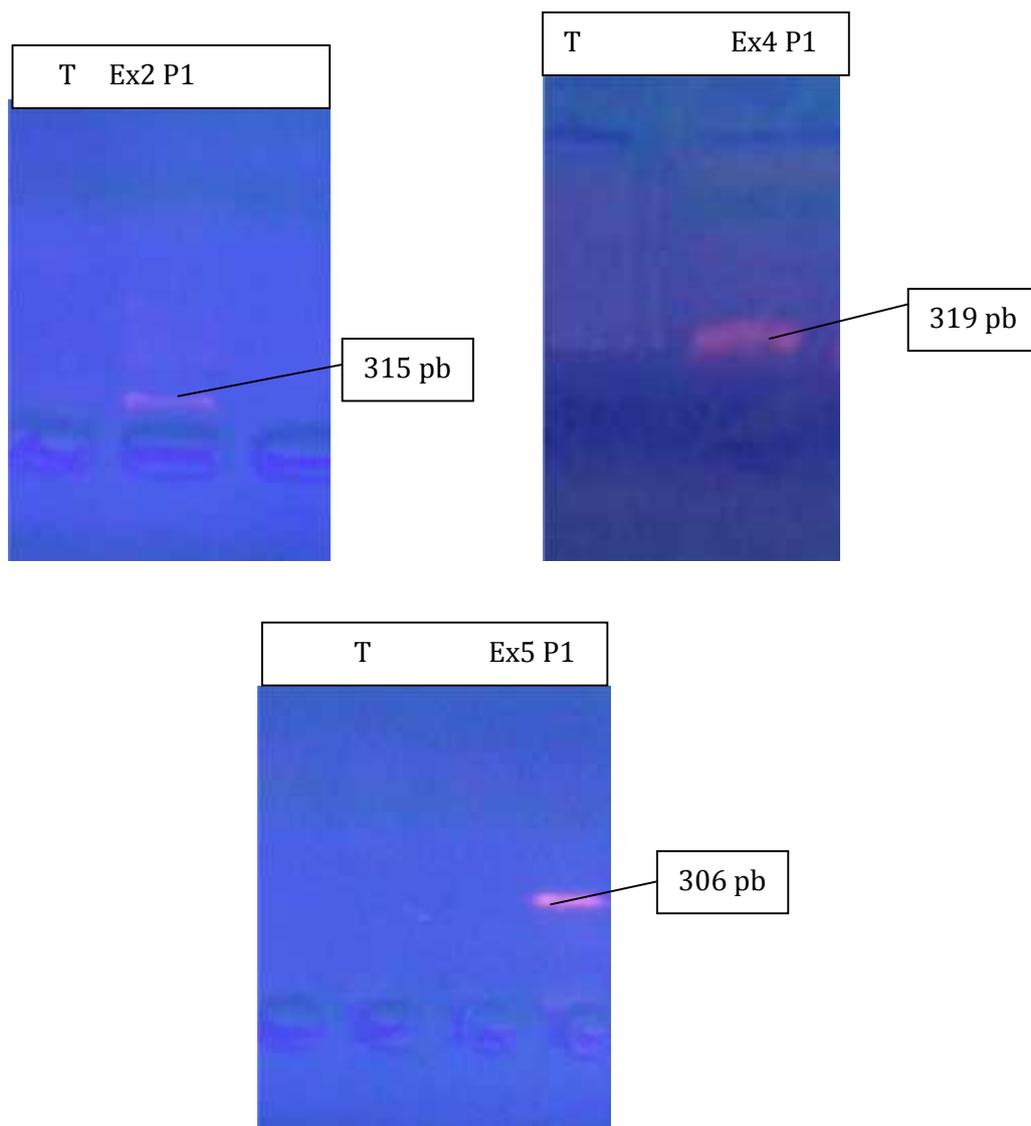


Figure 4 : profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des produits PCR des exons du gène MLH1. T : témoin négatif ; Ex : exon ; P1 : patient1

Les résultats obtenus (figure 5) montrent l'absence complète des bandes parasites pour les trois exons, ce qui reflète l'absence de contamination lors de la préparation de la solution réaction de PCR.

Ces résultats confirment, que les volumes et les concentrations des réactifs ainsi que les températures d'hybridation du fabricant, ont permis d'avoir des bandes cibles. Ce qui montre que le protocole utilisé ne nécessite pas des mises au point. Ainsi, l'amplification des trois exons, peut être entamée directement, pour les 9 patients inclus dans cette étude.

Les profils électrophorétiques des produits d'amplification du gène MLH1 des différents patients sont présentés dans les figures ci-dessous (5, 6,7) :

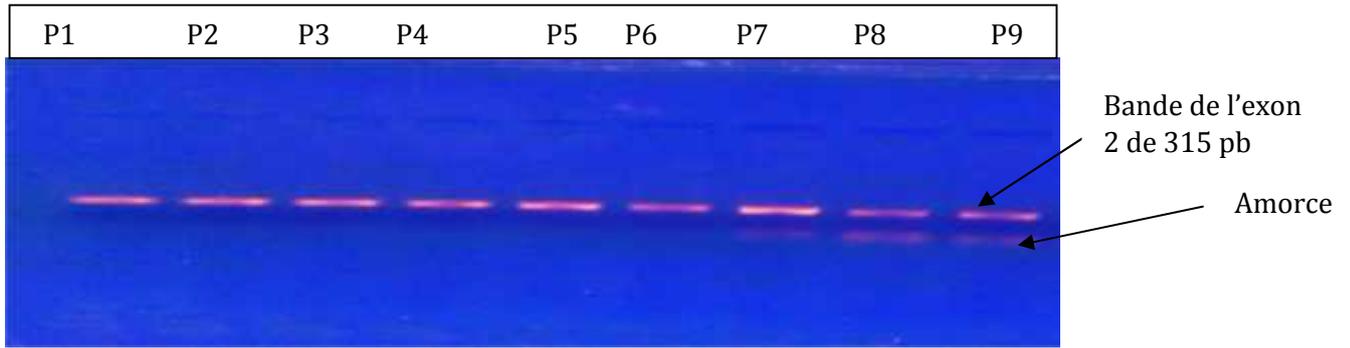


Figure 5: profils d'électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR de l'exon 2 du gène MLH1 pour les 9 patients.

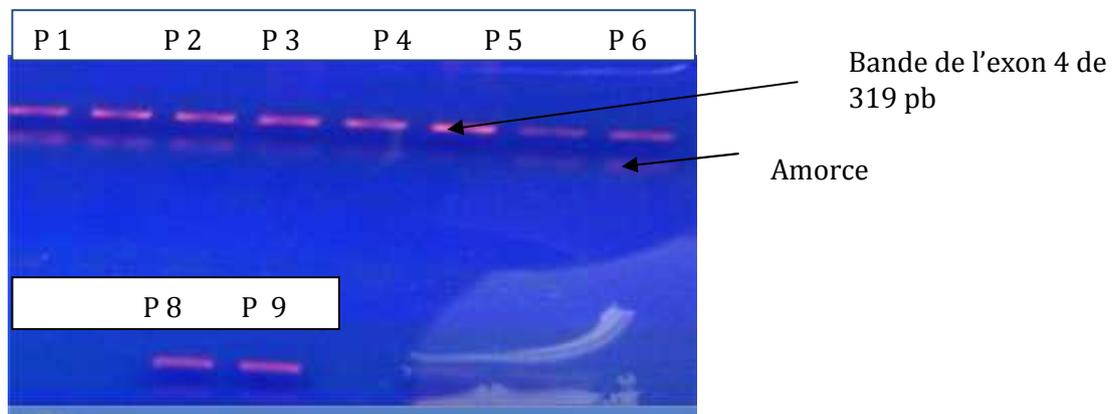


Figure 6 : profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR de l'exon 4 du gène MLH1 pour les 9 patients.

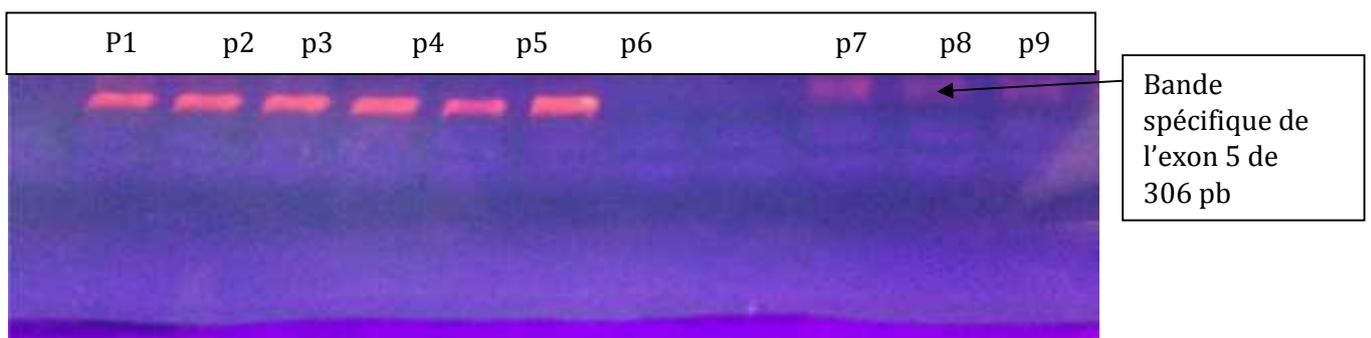


Figure 7 : profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR de l'exon 5 du gène MLH1 pour les 9 patients.

Pour les trois exons, les résultats d'amplification par PCR, illustrés dans les figures précédentes, montrent que les produits amplifiés ne contiennent pas des contaminants pour tous les patients.

Le résultat d'amplification par PCR du gène MLH1 exon (2,4 et 5), montre pour tous les patients, la présence d'une bande correspondant à la taille recherchée.

**b) Résultats de PCR du gène MSH2 exon 2, 3 et 10.**

Après avoir choisi les couples d'amorces spécifiques de trois exons du gène MSH2, le premier essai de la réaction PCR, est réalisé en utilisant le protocole décrit dans la partie matériel et méthode et en utilisant les températures d'hybridations fournies par le logiciel BLAST primer. Notons que l'ADN utilisé pour ce premier essai est du patient 1.

La figure suivante représente les résultats obtenus :

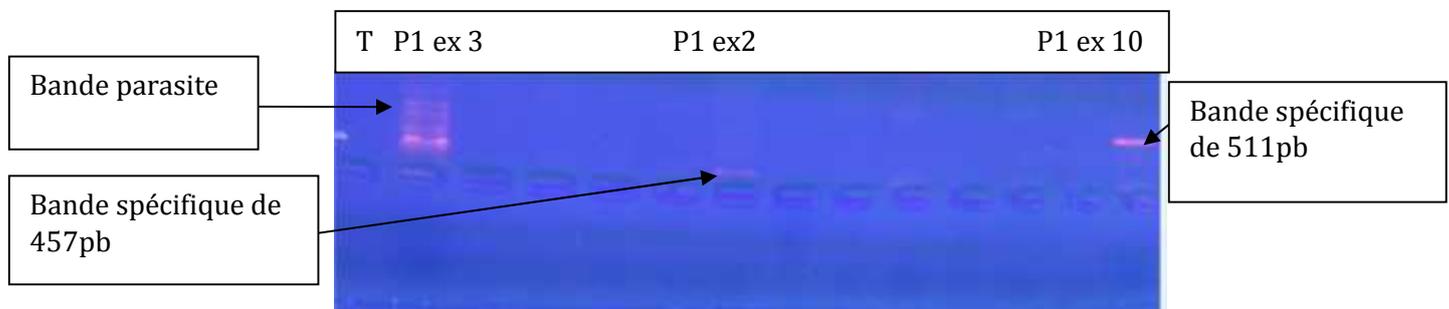


Figure 8 : Profils d'électrophorèse sur gel d'agarose du produit PCR des exons du gène MSH2, en utilisant les températures d'hybridations fournies par BLAST primer.

T : témoin négatif ; ex3 : exon 3 ; ex 2 : exon2 ; ex10 : exon 10 ; P1 : patient 1

Les conditions expérimentales utilisées, ont permis la réussite de la PCR, pour les exons 2 et 10.

Par contre l'amplification a été non spécifique pour l'exon 3, dont le résultat a montré la présence des bandes multiples et non spécifiques. Cela peut être expliqué par:

- ❖ Une température d'hybridation non appropriée.
- ❖ Une concentration inadéquate de l'ADN.
- ❖ Des concentrations d'amorces trop élevées.

Dans le but de résoudre ce problème, la température d'hybridation de couple d'amorces a été augmentée à 62°C. La figure suivante représente le résultat obtenu :

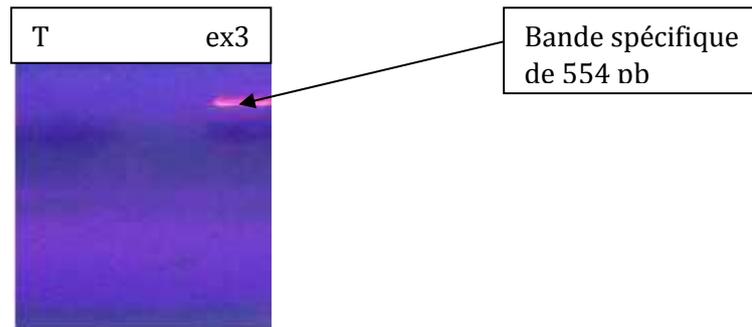


Figure 9 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose du produit PCR de l'exon 3 du gène MSH2, après modification de la température d'hybridation.

T : témoin ; ex : exon 3.

Les résultats obtenus montrent une disparition complète des bandes non spécifiques, ce qui montre que l'augmentation de la température d'hybridation permet de favoriser les hybridations spécifiques.

Après la mise au point de la PCR des 3 exons du gène MSH2, l'amplification est réalisée pour les 9 échantillons d'ADN étudiés.

Les produits d'amplification par PCR du gène MSH2 ont été visualisés sous UV après électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%.

Les profils électrophorétiques des produits d'amplification du gène MSH2 des différents patients sont présentés dans les figures ci-dessous (10, 11 et 12):

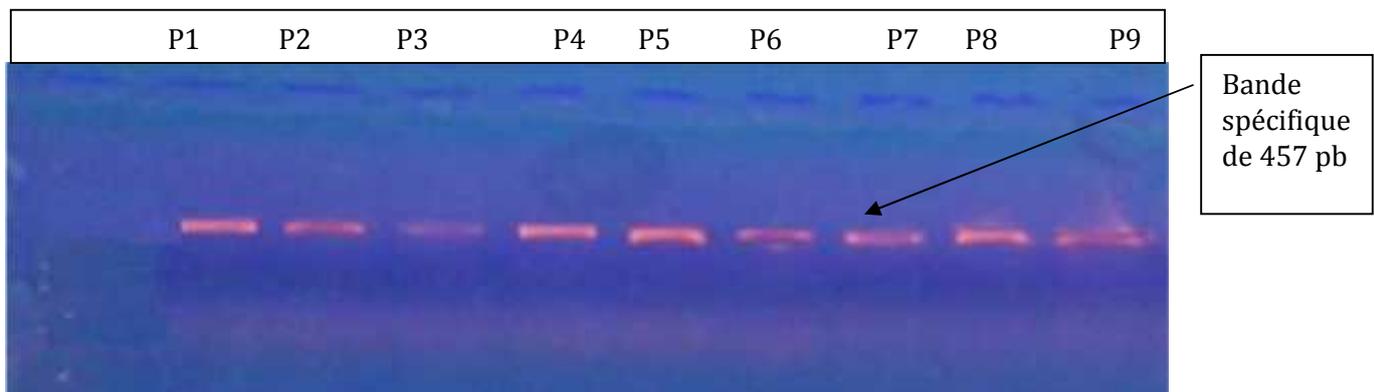


Figure 10 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose du produit PCR de l'exon 2 du gène MSH2, après modification de la température d'hybridation.

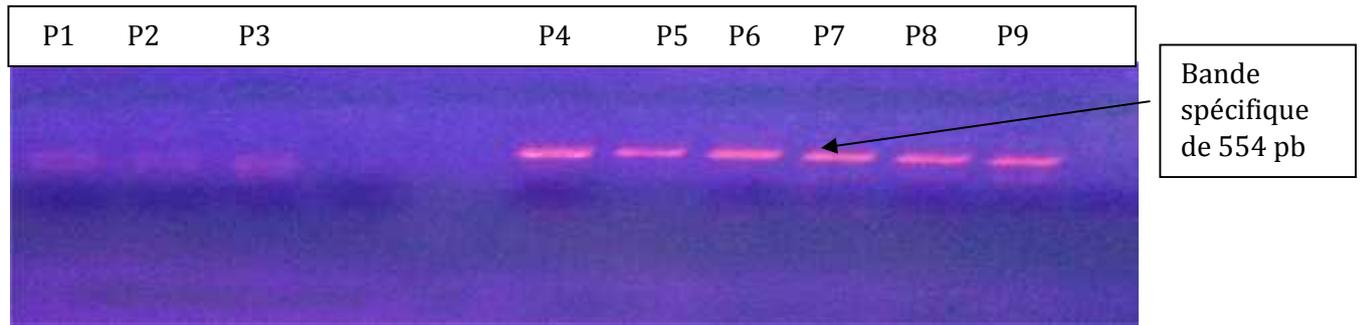


Figure 11 : profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR de l'exon 3 du gène MSH2 pour les 9 patients.

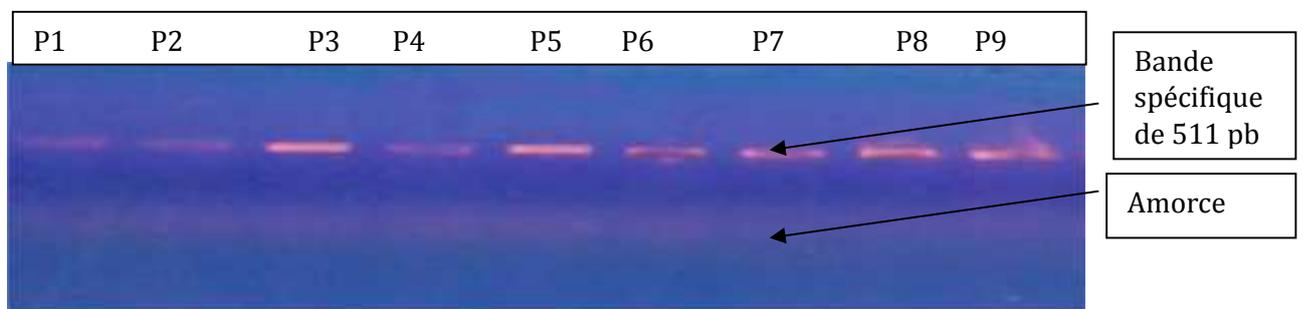


Figure 12 : Profils d'électrophorèse sur gel d'agarose des produits PCR de l'exon 10 du gène MSH2.

Pour les trois exons, les résultats illustrés dans les profils ci-dessus, montrent que les produits amplifiés ne contiennent pas des bandes parasites et que l'amplification a été spécifique pour chaque exon étudié.

L'obtention des produits PCR de bonne qualité nous a permis d'entamer les réactions de séquençage.

### III. Analyse bioinformatique des séquences :

#### 1. séquençage des exons 2,4 et 5 du gène MLH1.

Les ADN amplifiés correspondant au gène MLH1, ont été séquencés afin de mettre en évidence la présence ou l'absence de mutations, touchant les exons 2,4 et 5.

Après alignement par BLAST des séquences obtenues avec celles disponibles dans la base de données, les résultats ont montré qu'il n'y a aucune mutation au niveau des trois exons chez tous les patients étudiés.

En parallèle, deux polymorphismes ont été trouvés, l'un en amont de l'exon 4 et l'autre en aval de l'exon 5 chez deux patients. Les figures suivantes correspondent aux résultats de séquençage et d'alignement obtenus pour les exons 2, 4 et 5.

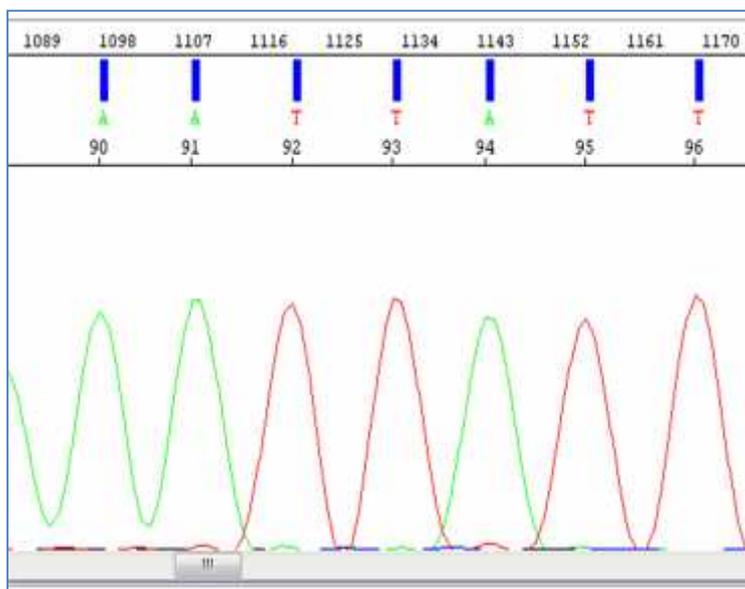


Figure 13 : Electrophorégramme du séquençage de l'exon 2 du gène MLH1 par l'amorce F du patient N° 9. (Même allure pour tous les patients).

L'analyse de la séquence du patient 2 a montrée une absence totale de mutations touchant l'exon 2 du gène MLH1.

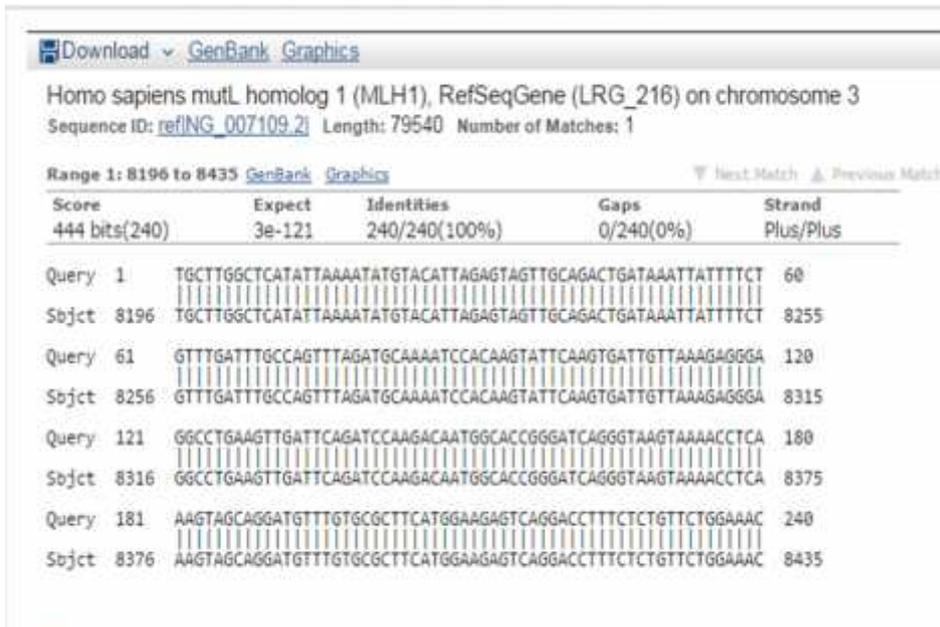


Figure 14 : alignement de la séquence de l'exon 2 du patient 9 avec la correspondante de la base de données.

Le résultat d'alignement a permis de confirmer l'absence totale de mutations au niveau de l'exon 2.

La figure suivante représente le résultat de séquençage de l'exon 4 :

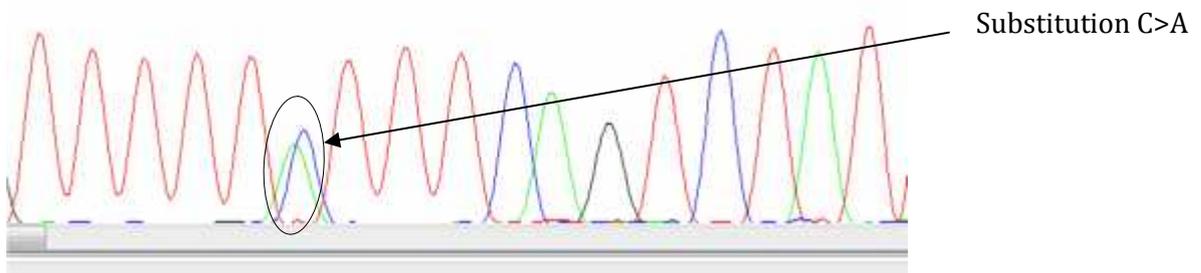
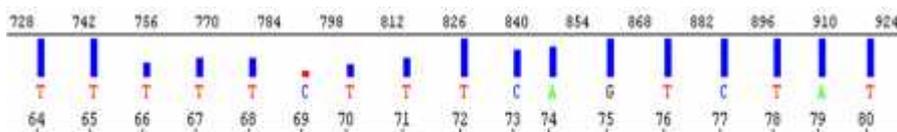


Figure 15 : Electrophorégramme du séquençage de l'exon 4 du gène MLH1 par l'amorce F du patient N° 9.

La figure montre la présence d'une substitution hétérozygote de Cytosine en Guanine au niveau de l'exon 4.

La séquence obtenue a été analysée par le logiciel BLAST, le résultat obtenu est illustré dans la figure 16.

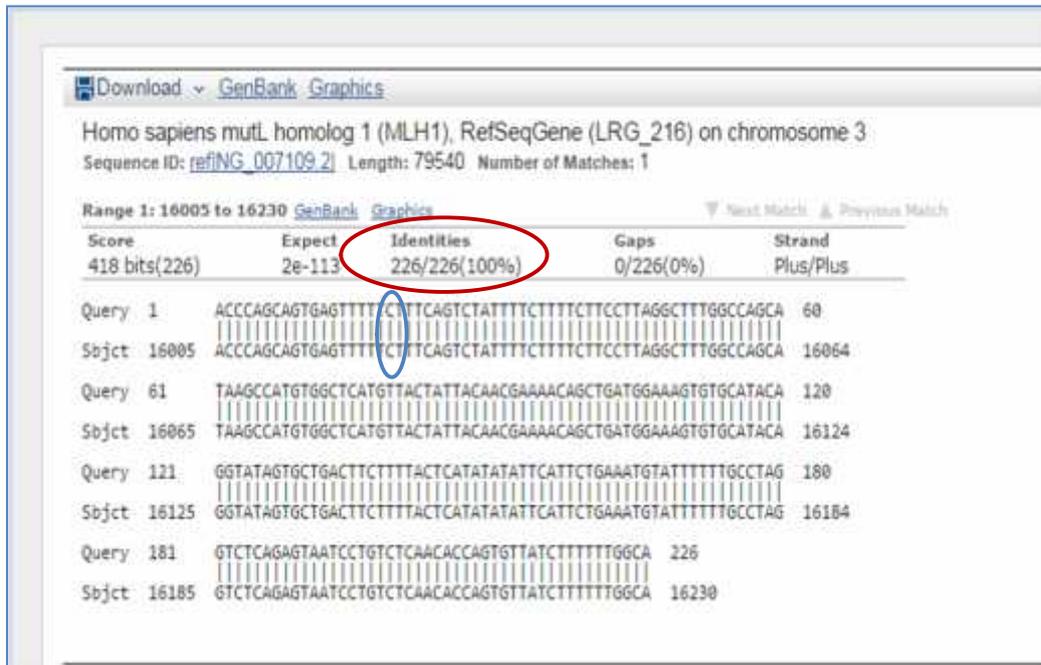
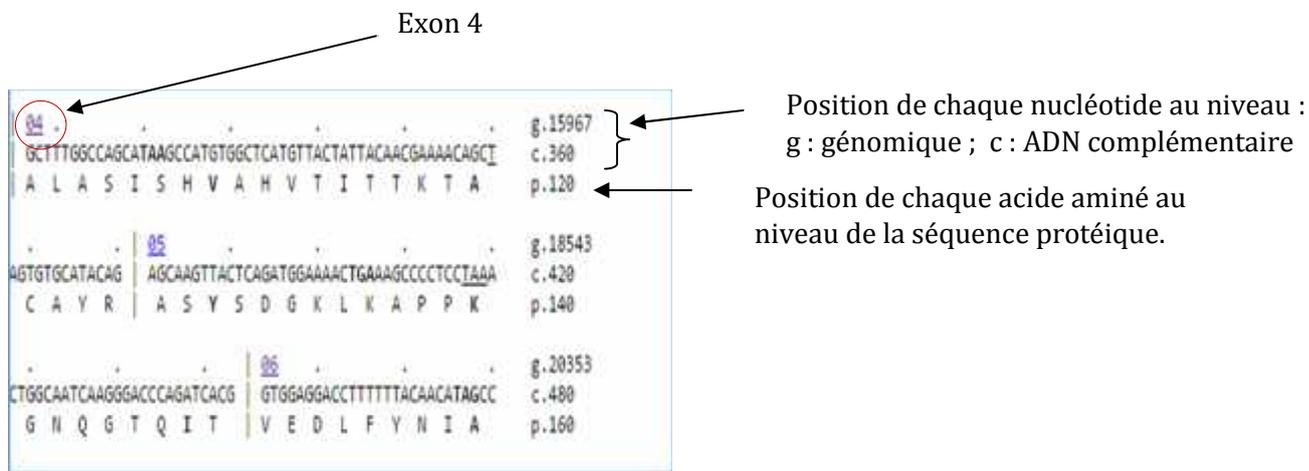


Figure 16 : alignement de la séquence de l'exon 4 du patient 9 avec la correspondante de la base de données.

Les résultats obtenus (figure 16), montrent que la séquence étudiée présente un pourcentage d'identité de 100% avec la séquence de base.

Afin de positionner et donner une nomenclature au polymorphisme détecté, une consultation de la base de données «LOVD InSiGHT Database» a été effectuée (Figure 17).



En cliquant sur le numéro 4, la région intronique en amont de l'exon 4 apparaît :

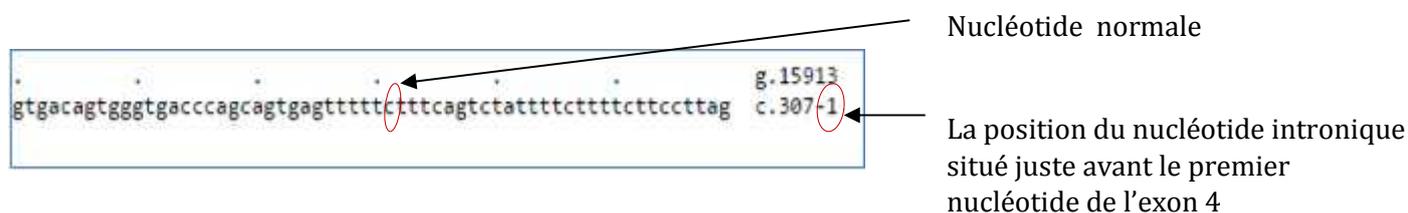


Figure 17 : Positionnement du polymorphisme détecté chez le patient 9 au niveau de l'exon 4.

La nomenclature universel du variant intronique :

c.307 – 29 C>A ; IVS 3 -29 C>A

La consultation de la base de données [LOVD InSiGHT Database](#), a permis de conclure que le polymorphisme signalé dans l'électrophorégramme (substitution du nucléotide Cytosine en Adénine à l'état hétérozygote dans la région intronique) est situé dans la région non codante (la région intronique), précisément en amont de l'exon 4 .

La confirmation de l'effet de ce polymorphisme intronique détecté sur le fonctionnement de la protéine, est possible grâce à la consultation de la base de données UMD (Universal Mutations Database) (tableau 3).

**Tableau 3 : interprétation clinique du polymorphisme c.307 – 29 C>A.**

OM nomenclature	cDNA Nomenclature	exon	mRNA nomenclature	Protein nomenclature	Functional Domain	Biological significance	Validation by	Validation date	# records
IVS14C>A (C14C>A)	cIVS14C>A (c3714C>A)	4			ATPase	UV	French SDR network	5/06/07	1
IVS15A>C (C15A>C)	cIVS15A>C (c3715A>C)	4			ATPase	UV	French SDR network	5/06/07	1
IVS15A>G (C15A>G)	cIVS15A>G (c3715A>G)	4			ATPase	Neutral	French SDR network	10/06/08	4
IVS12T>C (C12T>C)	cIVS12T>C (c3712T>C)	4			ATPase	UV	French SDR network	5/06/07	1
IVS13C>A (C13C>A)	cIVS13C>A (c3713C>A)	4			13	Neutral	French SDR network	4/06/10	21

Le tableau ci-dessus montre que le variant intronique détecté, est classé comme neutre, et donc n'a pas d'effet sur la protéine (classe 1).

Le résultat de séquençage de l'exon 5 est illustré dans la figure suivante :

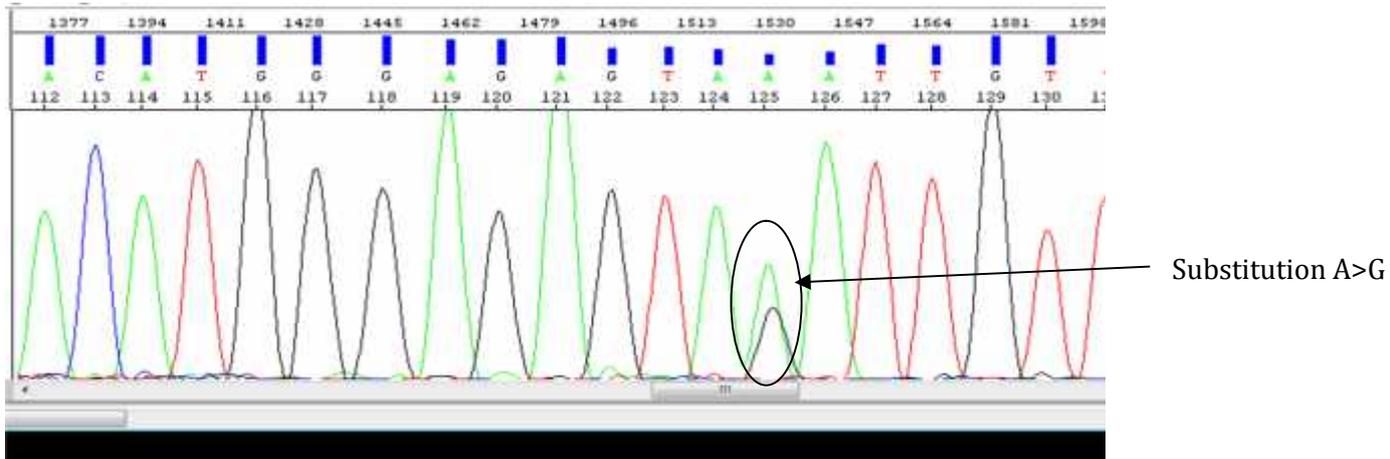


Figure 18: Electrophorégramme du séquençage de l'exon 5 du gène MLH1 par l'amorce F du patient N° 9.

Le résultat montre, qu'il s'agit d'une substitution hétérozygote au niveau de la séquence de l'exon 5, du patient 9.

La séquence obtenue, a été analysée par BLAST. Le résultat est montré dans la figure suivante :

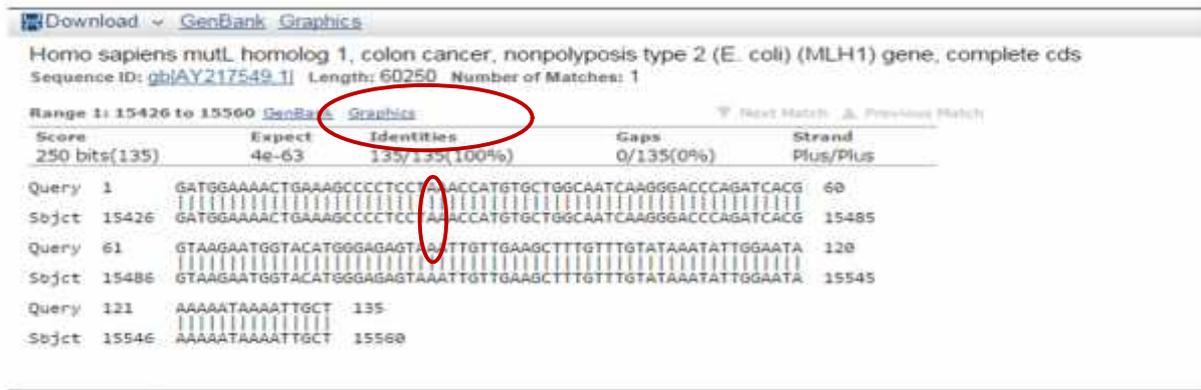
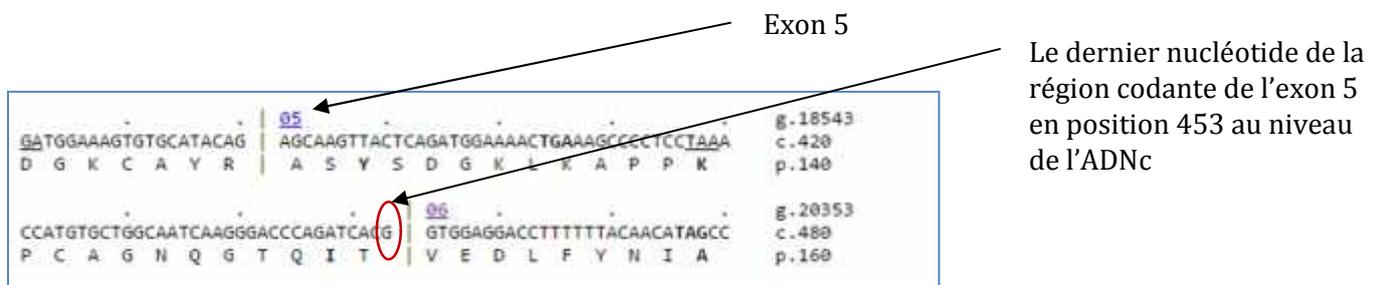


Figure 19 : alignement de la séquence de l'exon 5 du patient 9 avec la correspondante de la base de données.

Les résultats de séquençage et de l'alignement, montrent que les séquences amplifiées par PCR correspondent aux régions qui présentent le polymorphisme trouvé. Il s'agit d'une substitution, du nucléotide Adénine par Guanine à l'état hétérozygote.

Afin de positionner et donner une nomenclature au polymorphisme détecté, une consultation de la base de données «LOVD InSiGHT Database» a été effectuée (Figure 20).



En appuyant sur le numéro 6, la région intronique de l'exon 5 apparaît :

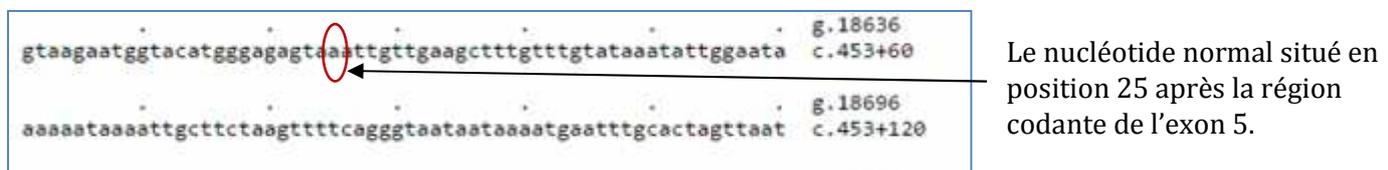


Figure 20 : Positionnement du polymorphisme détecté chez le patient 9 au niveau de l'exon 5.

La nomenclature universelle du variant intronique détecté :

c. 453+ 25 A>G ; IVS5 + 25 A>G

La consultation de la base de données [LOVD InSiGHT Database](#), a permis de conclure que le polymorphisme signalé dans l'électrophorégramme (substitution du nucléotide Adénine en Guanine à l'état hétérozygote dans la région intronique) est situé dans la région non codante (région intronique), précisément en aval de l'exon 5.

La confirmation de l'effet de ce variant intronique sur le fonctionnement de la protéine, est possible grâce à la consultation de la base de données UMD (Universal Mutations Database) (tableau 4).

**Tableau 4: interprétation clinique du variant intronique c. 453+ 25 A>G.**

OM annotation	cDNA Nomenclature	exon	mRNA annotation	Protein annotation	Functional Domain	Biological significance	Validation by	Validation date	# records
IVS5-25A-G (53+25A-G)	cIVS5-25A-G (c.453+25A-G)	5				Likely Neutral	French MDR network	13-12-11	1
IVS5-79A-G (53+79A-G)	cIVS5-79A-G (c.433+79A-G)	5				Neutral	French MDR network	14-06-08	2
IVS5-13A-G (54+13A-G)	cIVS5-13A-G (c.454+13A-G)	5				Control	French MDR network	28-03-11	1
IVS5-47T-G (54+47T-G)	cIVS5-47T-G (c.454+47T-G)	5				UV	French MDR network	22-05-08	1
IVS5-51T-C (54-51T-C)	cIVS5-51T-C (c.454-51T-C)	5				UV	French MDR network	19-03-09	22
IVS5-61T-G (54-61T-G)	cIVS5-61T-G (c.454-61T-G)	5				UV	French MDR network	28-04-14	1

Le tableau ci-dessus montre que le variant intronique détecté, est probablement neutre.

Ce variant peut être qualifié comme neutre parce qu'il touche une région non codante de l'ADN. Néanmoins, il peut avoir de graves conséquences sur le phénotype. En effet, le changement d'un seul nucléotide peut induire 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 [77].

## **2. Résultat de séquençage des exons 2, 3 et 10, du gène MSH2.**

Le séquençage de l'ADN amplifié correspondant aux 3 exons du gène MSH2 a été réalisé pour tous les patients.

L'alignement entre les séquences étudiées et celles disponibles dans la base de données montre qu'il n'y a aucune mutation sur les exons 2 et 10 chez tous les patients. Cependant, une seule substitution a été détectée au niveau de l'exon 3 chez un seul patient. Les résultats obtenus, sont illustrés dans les figures suivantes (21 et 22) :

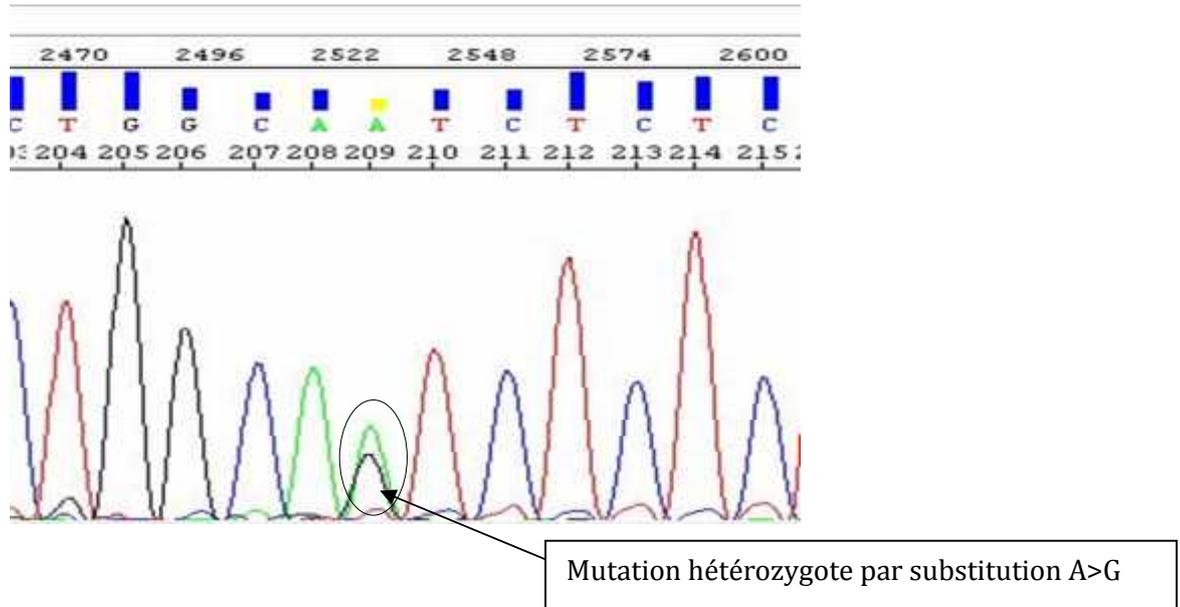


Figure 21 : Electrophorégramme du séquençage de l'exon 3 du gène MSH2 par l'amorce F du patient N° 6.

Le résultat montre la présence d'une mutation, il s'agit d'une substitution à l'état hétérozygote.

La séquence obtenue, a été analysée par BLAST. Le résultat d'alignement est illustré dans la figure suivante :



Figure 22 : Alignement de la séquence de l'exon 3 avec la correspondante de la base de données.

Les résultats de séquençage et de l'alignement, montrent que les séquences amplifiées par PCR correspondent aux régions qui présentent le polymorphisme trouvé. Il s'agit d'une substitution, du nucléotide Adénine par Guanine à l'état hétérozygote.

Dans le but de positionner et donner une nomenclature à la mutation détectée, une consultation de la de la base de données «[LOVD InSiGHT Database](#)» a été effectuée (figure 23)

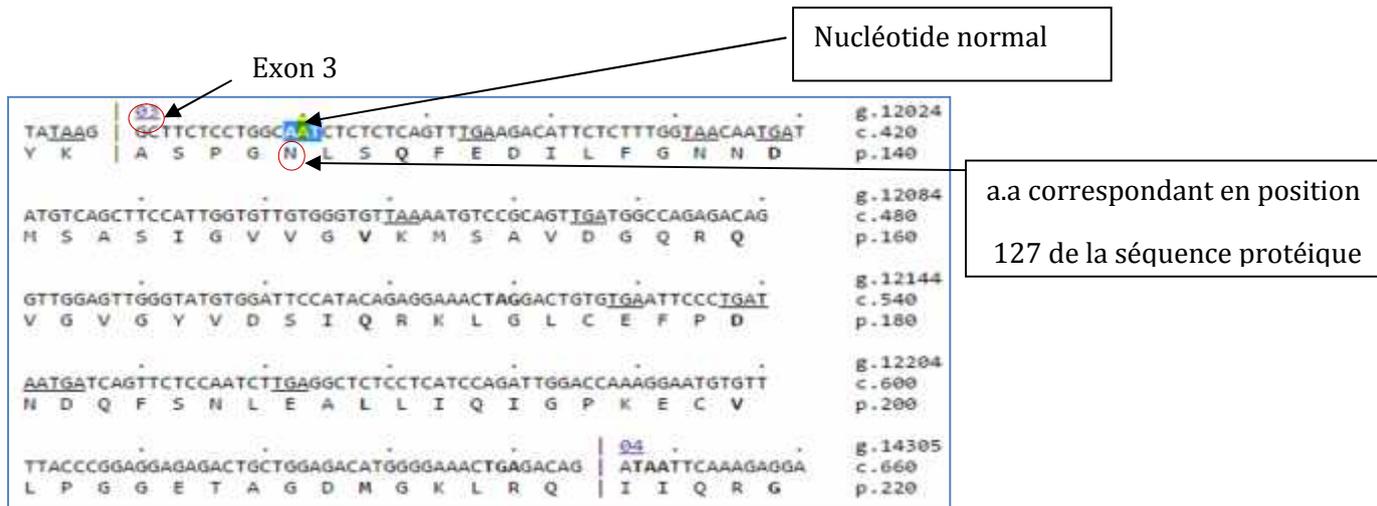
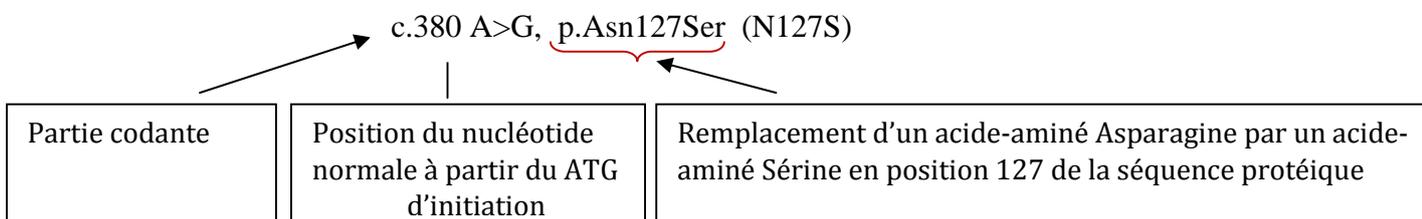


Figure 23 : Positionnement de la mutation détectée ainsi que l'acide aminé correspondant à partir de la séquence codante de l'exon 3 du gène MSH2.

Le codon normal étant AAT, codant pour une Asparagine (N), alors que le codon muté étant AGT codant pour une Sérine. Il s'agit donc d'une mutation par substitution de type **faux sens**.

La nomenclature universelle de la mutation détectée étant :



Après avoir précisément nommé la mutation, deux situations sont possibles : cette variation de séquence a déjà été décrite au préalable, ou non. Cette information sera obtenue par la consultation de la base de données UMD.

Si la variation de séquence a déjà été rapportée, les informations disponibles peuvent permettre de savoir si elle a un caractère délétère qui a déjà été confirmé au préalable chez d'autres patients, ou au contraire si elle a été identifiée sans effets pathologiques dans la population générale (tableau 5).

**Tableau 5 : interprétation clinique de la mutation détectée au niveau de l'exon 3 du gène MSH2.**

Old nomenclature	cDNA Nomenclature	exon	mRNA nomenclature	Protein nomenclature	Functional Domain	Biological significance	Validation by	Validation date	# records
376G>A	c.376G>A	3		p.Gly126Ser	Connector	UV	French M.D.P. network	17/10/08	1
380A>G	c.380A>G	3		p.Asn127Ser	Connector	Neutral	French M.D.P. network	29/11/06	22
382C>G	c.382C>G	3		p.Leu128Val	Connector	UV	French M.D.P. network	16/11/08	1
387_388delTC	c.387_388delTC	3		p.Gln130ValGln	Connector	Cancel	French M.D.P. network	21/02/14	1
388C>T	c.388C>T	3		p.Gln130G	Connector	Cancel	French M.D.P. network	21/02/14	3
390_391delGT	c.390_391delGT	3		p.Gln132HisGln	Connector	Cancel	French M.D.P. network	21/02/14	16

Comme le montre le tableau en dessus, la variation de la séquence détectée n'a pas d'effet pathologique sur le fonctionnement de la protéine. Il s'agit d'un variant de classe 1 (neutre).

## Discussion

Le mécanisme de réparation des mésappariements de l'ADN (MMR) joue un rôle important dans la maintenance de la stabilité du génome et permet ainsi de limiter la propagation de mutations. La spécificité de ce mécanisme MMR repose sur sa capacité à discriminer le brin néosynthétisé du brin parental.

Cependant, une déficience dans l'un des gènes de réparation est largement associée à une susceptibilité au cancer colorectal héréditaire sans polypose nommé syndrome de Lynch.

Aujourd'hui, 2784 mutations sur les gènes du système MMR ont été associées au syndrome de Lynch d'après la base de données Insight (International Society for Gastro-intestinal Hereditary Tumours - <http://www.insight-group.org/>). 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. Cependant ils coexistent un grand nombre des variants situés dans les régions inter-géniques.

Ces mutations sont définies comme Variants de Signification Clinique et Biologique Inconnue (ou VSI), car le lien de causalité avec la pathologie ne peut être établi avec certitude. Des investigations complémentaires sont nécessaires pour comprendre l'impact de ces mutations sur la fonction MMR. Elles constituent déjà 20-30% de toutes les mutations des gènes MMR [78].

Des études précédentes ont montré que 25 % des VSI sont considérés comme des mutations délétères car ils touchent des acides aminés très conservés situés dans les domaines fonctionnels de la protéine [79]. Cependant, il est estimé que les VSI représentant respectivement 29 %, 16 % des mutations des gènes MLH1 et MSH2 sont encore non interprétables [80].

Concernant l'impact des variants sur la fonction des protéines MMR, divers tests fonctionnels ont été rapportés dans la littérature.

Un variant est prédit comme délétère lorsqu'il touche des acides aminés conservés situés dans des domaines fonctionnels tels que le domaine ATPase, le domaine de reconnaissance de mésappariement et les domaines d'interactions entre les protéines du système MMR.

Dans cette étude, le séquençage des exons 2,4 et 5 du gène MLH1 et les exons 2,3 et 10 du gène MSH2, a permis d'identifier 3 variants dans une série comprenant 9 patients suspectés syndrome de Lynch. Il s'agit de deux variants introniques situés en amont de l'exon 4 et en aval de l'exon 5 du gène MLH1 et un variant touchant l'exon 3 du gène MSH2.

La consultation de la base de données UMD, suggère que le variant c.380 A>G (N127S) affectant l'exon 3 du gène MSH2 n'a aucun effet délétère. Il est situé dans le domaine connecteur de la protéine MSH2 (125aa-297aa). Ollila et al (2008) ont pu montrer que ce domaine est impliqué dans la signalisation allostérique entre le domaine de levier (3) et le domaine ATPase (figure 24).

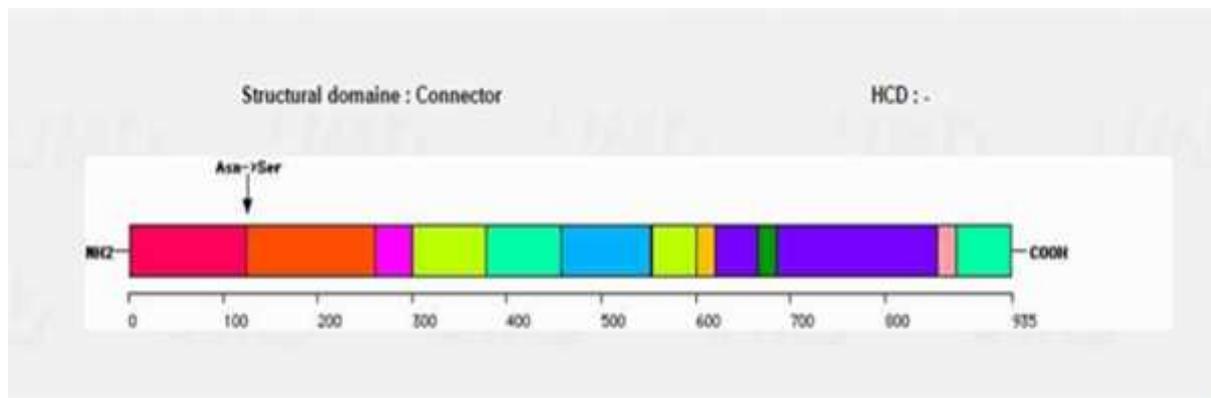


Figure 24 : positionnement du variant au niveau de la protéine MSH2.

- Domaine d'interaction avec l'ADN, aa 1-124
- Domaine connecteur, aa 125-297
- Domaine de levier, aa 300-456 et 554-619
- Domaine pince, aa 457-553
- Domaine ATPase, aa 625-855
- Domaine d'interaction avec MSH3 et MSH6, aa 378-625 et 875-934
- Domaine de liaison aux homologues, aa 673-686

En 2012, Jukka et al ont pu montrer que le variant c.380A>G, n'est pas suffisant pour induire une déficience dans le système MMR. En effet, la rotation du domaine 2 (connecteur) indispensable pour l'allostérie entre le domaine 3 et le domaine 5, a été conservée durant le cycle de réaction de la réparation figure 25.

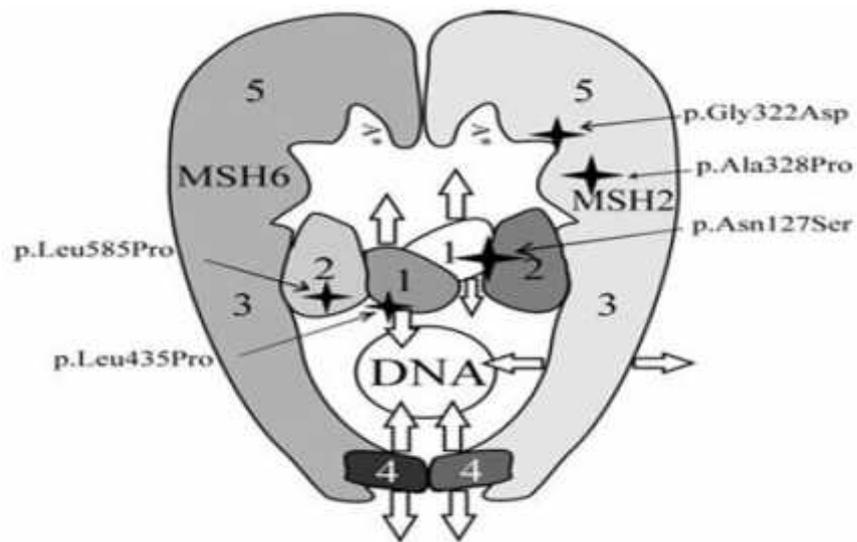


Figure 25 : Structure tridimensionnelle du complexe MutL et positionnement de la mutation N127S [81]. 1 : domaine de reconnaissance du mésappariement ; 2 : domaine connecteur ; 3 : domaine de levier ; 4 : domaine pince ; 5 : domaine ATPase. Les différentes flèches indiquent les mouvements de chaque domaine durant le cycle de réaction de réparation.

De même, en 2008, Ollila et al ont réalisés des tests fonctionnels basés sur l'induction de l'expression des gènes MMR d'intérêt dans des lignées cellulaires cancéreuses déficientes, afin d'évaluer l'impact du variant c.380A>G sur le fonctionnement de système MM.

Les résultats ont montré que la substitution de l'acide aminé Asparagine par la Sérine n'a pas influencée l'interaction du monomère MSH2 avec MSH6, ce qui suggère l'effet neutre du variant.

En 2014, Denis Ermadi a pu déterminer l'effet biochimique du variant c.380A>G sur l'acide aminé (polarité et charge), sur la stabilité de la protéine et sur son niveau d'expression.

Elle a montrée que le variant p.N127S situé dans le domaine connecteur, n'a pas d'influence sur la structure protéique. En effet, la substitution de l'Asparagine en Sérine préserve les mêmes propriétés biochimiques de ce résidu, tels que la polarité et la charge. Ces deux résidus sont polaires et non ionisables.

En conclusion, ces résultats fournissent des preuves génétiques pour démontrer la non pathogénicité du variant N127S du gène MSH2.

Les deux variant c.307 – 29 C>A et c. 453+ 25 A>G affectant une partie non codante et situés respectivement en amont de l'exon 4 et en aval de l'exon 5 du gène MLH1 peuvent contribuer à des anomalies d'épissage d'intron s'ils touchent spécifiquement un site d'épissage, ce qui peut engendrer l'inactivation de la protéine en question. La consultation des bases des données, suggère que le variant c.307 – 29 C>A n'a pas d'effet pathogène.

Thompson et al (2013) ont évalué ce variant comme neutre, puisqu'il est rapporté dans la population normale à une fréquence 1%. Cependant, plusieurs auteurs (Arnold et al., 2009 ; , Chiara Pastrello et al., 2011) ont montré que le variant est de signification inconnue, car il n'y avait pas assez de données pour apprécier le lien entre le variant et une prédisposition héréditaire.

En 2008, Plon et al, ont déterminé la probabilité de pathogénicité des deux classes de variants (neutre et probablement neutre). Ces probabilités sont respectivement, comprise entre 0.001-0.049 et <0.001. Ils ont conclu que ces deux variants ne peuvent pas être utilisés en conseil génétique, mais ils peuvent permettre de proposer des indications de surveillance chez les sujets porteurs.

## Conclusion et perspectives

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence pour la première fois, chez une population marocaine, les différentes mutations qui peuvent affecter les exons 2,4 et 5 du gène MLH1 et les exons 2,3 et 10 du gène MSH2 impliqués dans le système de réparation de mésappariements.

En utilisant les techniques de la biologie moléculaire, trois variants ont été identifiés, un seul au niveau de l'exon 3 du gène MSH2 et qui est qualifié comme non pathogène et deux au niveau de la région intronique des exons 4 et 5 dont la classification est respectivement neutre et probablement neutre.

Dans la plupart des cas, le rôle pathogène des variants ne peut pas être établi à partir des données cliniques, telle que la ségrégation de la pathologie dans la famille. Cependant, une progression importante a été possible grâce au développement d'outils bioinformatiques, il s'agit des analyses *in Silico* permettant la modélisation et la prédiction de l'effet fonctionnel des variations sur la protéine touchée.

Parallèlement Rasmussen et al (2011) ont proposé une méthodologie de classification essentiellement basée sur les tests fonctionnels (évaluation de l'épissage, fonctionnalité de la protéine) pour évaluer les conséquences d'un variant sur la fonction MMR.

De même, la mutagenèse dirigée proposée par Drost et al (2012) reste un outil reproductible pour l'interprétation des données mutationnelles. Les auteurs ont évalué cette technique sur une série de 25 variants du gène MSH2 et ont démontré une corrélation avec les tests *in Silico* dans 83% des cas.

## Références bibliographiques

- [1] Jean-Baptiste Bachet ; 2010. Fédération des pathologies digestives, Hôpital Ambroise Paré, APHP
- [2] Ferlay ; J ; Shin, Bray ; Forman ; D Mathers ; C Parkin ; D.M ; 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN ; International Journal Cancer ; 127(12) ; 2893-2917.
- [3] Belot A; Grosclaude P ; Bossard N ; Jouglà E; Benhamou E; Delafosse P ; et al ; 2008 . Cancer incidence and mortality in France over the period 1980–2005 ; Rev Epidemiol Sante Publique; 56:15975.
- [4] Ben Abdalla M ; 1998. Registre des cancers Nord-Tunisie (1995–1998).
- [5] Cunningham ; D Atkin ; W Lenz ; H.J ; Lynch ; H.T ; Minsky ; B Nordlinger ; B Starling ; N ; 2010. Colorectal cancer. Lancet ; 375 ; 1030-1047.
- [6] Etzioni, R Urban, N Ramsey, S McIntosh, M Schwartz, S Reid, B et al. The case for early detection. NatureReviews Cancer. 2003; 3: 1-10.
- [7] B Buecher ; A de Pauw ; 2012. La Revue de médecine interne; 33; 471–474.
- [8] Fearon ER ; Vogelstein B ; 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis Cell; 61(5) ; 759-67.
- [9] Toyota M ; Ahuja N ; Ohe-Toyota M ; et al ; 1999. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer ; Proc Natl Acad Sci USA; 96(15) ; 8681-6.
- [10] J Lamoril et J.-C Deybach ; P Bouizegarène ; 2006. Immuno-analyse et biologie spécialisée ; 21 ; 211–222.
- [11] Lichtenstein P ; Holm NV ; Verkasalo PK ; 2000. Environmental and heritable factors in the causation of cancer: analysis of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland ; N Engl J Med ; 343 ; 78-85.
- [12] Lynch ; H.T ; Boland ; C.R ; Gong ; G Shaw ; T.G ; Lynch ; P.M ; Fodde ; R ; et al ; 2006. Phenotypic and genotypic heterogeneity in the Lynch syndrome: diagnostic, surveillance and management implications ; European Journal of Human Genetics; 14 ; 390-402.
- [13] Fletcher ; O Houlston ; R.S ; 2010. Architecture of inherited susceptibility to common cancer ; Nat Rev Cancer ; 10 ; 353-361.
- [14] Jasperson KW ; Tuohy TM ; Neklason DW ; Burt RW ; 2010. Hereditary and familial colon cancer ; Gastroenterology ; 138 ; 2044–58.
- [15] Kinzler KW ; Nilbert MC ; Su LK et al ; 1991. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21 ; Science ; 253 ; 661-665.

- [16] Macrae F ; du Sart D ; Nasioulas S ; 2009. Familial adenomatous polyposis ; *Best Pract Res Clin Gastroenterol* ; 23 ; 197–207.
- [17] de la Chapelle ; A ; 2009. Genetic predisposition to colorectal cancer ; *Nature Reviews Cancer* ; 4 ; 769-780.
- [18] Inherited colorectal cancer syndromes. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*. 22(4) ; 198-208.
- [19] Renkonen-Sinisalo L ; Sampson JR ; Stormorken A ; Tejpar S ; Thomas HJ ; Wijnen J ; Lubinski J ; Müller H ; Ponz De Leon M ; Vasen HF ; Möslein G ; Alonso A ; Aretz S ; Bernstein I ; Bertario L ; Blanco I ; Bulow S ; Burn J ; Capella G ; Colas C ; Engel C ; Frayling I ; Rahner N ; Hes FJ ; Hodgson S ; Mecklin JP ; Møller P ; Myrhøj T ; Nagengast FM ; Parc Y ; 2010. Recommendations to improve identification of hereditary and familial colorectal cancer in Europe ; *Fam Cancer* ; 9 ; 109–115.
- [20] Lynch HT ; Shaw MW ; Magnuson CW ; et al ; 1966. Hereditary factors in cancer: study of two large midwestern kindreds ; *Arch Intern Med* ; 117:206-12.
- [21] Fishel R ; Lescoe MK ; Rao MRS ; et al ; 1993. The human mutator gene homolog hMSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer ; *Cell* ; 75 ; 1027-38.
- [22] Bronner CE ; Baker SM ; Morrison PT ; et al ; 1994. Mutations in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary nonpolyposis colon cancer ; *Nature* ; 368 ; 258-61.
- [23] Musulen E ; Blanco I ; Carrato C ; Fernandez-Figueras MT ; Pineda M ; Capella G ; Ariza A ; 2013. Usefulness of epithelial cell adhesion molecule expression in the algorithmic approach to Lynch syndrome identification ; *Hum Pathol* ; 44 ; 412–6.
- [24] Jiricny J ; 2006. The multifaceted mismatch-repair system ; *Nat Rev Mol Cell Biol* ; 7 ; 335-46.
- [25] Zaanani A ; Viguière J ; Lièvre A et al ; 2008. Dépister le cancer colorectal ; *Revue de médecine générale* ; 809 (22) ; 896-97.
- [26] Boland CR ; 2006. Decoding hereditary colorectal cancer ; *N Engl J Med* ; 354 ; 2815-7.
- [27] de la Chapelle A ; 2005. The incidence of Lynch syndrome ; *Fam Cancer* ; 4 ; 233-7.
- [28] Nyström-Lahti M ; Wu Y ; Moisio AL ; Hostra RMW ; Osinga J ; Mecklin JP ; Järvinen HJ ; Leisti J ; Buys CHCM ; de La Chapelle A ; Peltomäki P ; 1996. DNA mismatch repair gene mutations in 55 kindreds with verified or putative hereditary non-polyposis colorectal cancer ; *Hum Mol Genet* ; 5 ; 763–769.
- [29] Sana Aissi-Ben Moussa ; Amel Moussa ; Nadia Kourda ; Amel Mezlini ; Nabil Abdelli ; 2011. Lynch syndrome in Tunisia: first description of clinical features and germline mutations ; 26 ; 455–467.
- [30] Lindor N.M ; Petersen G.M ; Hadley D.W ; et al ; 2006. Recommendations for the care of individuals with an inherited predisposition to Lynch syndrome: a systematic review ; *JAMA* ; 296 (12) ; 1507-17.

- [31] Vasen HF ; Moslein G ; Alonso A ; et al ; 2007. Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer) ; J Med Genet ; 44 ; 353-62.
- [32] Jasperson, KW ; Tuchy ; T.M ; Neklason ; D.W ; Burt ; R.W ; 2010. Hereditary and familial colon cancer ; Gastroenterology ; 138 ; 2044-2058.
- [33] Lynch ; H.T ; Boland ; C.R ; Gong ; Shaw ; T.G ; Lynch ; P.M ; Fodde ; R ; et al ; 2006. Phenotypic and genotypic heterogeneity in the Lynch syndrome: diagnostic, surveillance and management implications ; European Journal of Human Genetics ; 14 ; 390-402.
- [34] Quehenberger F ; Vasen H ; van Houwelingen H ; 2005. Risk of colorectal and endometrial cancer for carriers of mutations of hMLH1 and hMSH2 gene: correction for ascertainment ; J Med Genet ; 42 ; 491-6.
- [35] Boland, C.R ; Koi, M ; Chang, D.K ; Carethers ; J.M ; 2008. The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemical and clinical behaviour in Lynch syndrome: from bench to bedside ; Familial Cancer ; 7 ; 41-52.
- [36] Boland ; C.R ; Goel ; A ; 2010. Microsatellite instability in colorectal cancer ; Gastroenterology ; 138 ; 2073-2087.
- [37] Zhang X ; Li J ; 2013. Era of universal testing of microsatellite instability in colorectal cancer ; World J Gastrointest Oncol ; 5(2) ; 12-19.
- [38] Lahue RS ; Au KG ; Modrich P ; 14 juill 1989. DNA mismatch correction in a defined system ; Science ; 245(4914) ; 160-164.
- [39] Peltomäki ; 2005. P. Lynch syndrome genes ; Familial Cancer ; 4 ; 227-232.
- [40] Wagner ; R ; Jr ; and Meselson ; M ; 1976. Repair tracts in mismatched DNA heteroduplexes ; Proc Natl Acad Sci U S A. ; 73 ; 4135-4139.
- [41] Zhang ; Y ; Yuan ; F ; Presnell ; S.R ; Tian, K ; Gao ; Y ; Tomkinson ; A.E ; Gu ; L ; and Li ; G.M ; 2005. Reconstitution of 5'-directed human mismatch repair in a purified system Cell ; 122 ; 693-705.
- [42] Genschel ; J ; Bazemore ; L.R ; and Modrich ; 2002. P. Human exonuclease I is required for 5' and 3' mismatch repair ; J Biol Chem ; 277 ; 13302-13311.
- [43] Genschel ; J. and Modrich ; P ; 2003. Mechanism of 5'-directed excision in human mismatch repair ; Mol Cell ; 12 ; 1077-1086.
- [44] Dzantiev ; L ; Constantin ; N ; Genschel ; J ; Iyer ; R.R ; Burgers ; P.M ; and Modrich ; P ; 2004. A defined human system that supports bidirectional mismatch-provoked excision ; Mol Cell ; 15 ; 31-41.
- [45] Pluciennik ; A ; Dzantiev ; L ; Iyer ; R.R ; Constantin ; N ; Kadyrov ; F.A. and Modrich ; P ; 2010. PCNA function in the activation and strand direction of MutL $\alpha$  endonuclease in mismatch repair.

- [46] Baudhuin LM ; Burgart LJ ; Leontovich O ; et al ; 2005. Use of microsatellite instability and immunohistochemistry testing for the identification of individuals at risk for Lynch syndrome ; *Fam Cancer*; 4 ; 255-65.
- [47] Boland CR ; Koi M ; Chang DK ; Carethers JM ; 2008. The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch syndrome: from bench to bedside ; *Fam Cancer* ; 7(1) ; 41-52.
- [48] Hewish M ; Lord CJ ; Martin SA ; et al ; 2010. Mismatch repair deficient colorectal cancer in the era of personalized treatment ; *Nat Rev Clin Oncol* ; 7 ; 197-208.
- [49] M. Ferron ; M. Ferron ; F. Praz ; M ; Pocard. *Annales de chirurgie* ; 130 ; 602–607.
- [50] N. Janin ; C.R ; Acad. Sci ; Paris ; 1999. *Sciences de la vie ; Life Sciences* ; 322 ; 1017–1031.
- [51] Vasen ; H.F.A ; Watson ; P ; Mecklin, J.P ; Lynch ; H.T ; 1999. ICG-HNPCC. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the international collaborative group on HNPCC ; *Gastroenterology* ; 116: 1453-1456.
- [52] Umar ; A ; Boland ; C.R ; Terdiman ; J.P ; Syngal ; S ; de la Chapelle ; A ; Rüschoff ; J ; et al ; 2004. Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability ; *Journal of the National Cancer Institute* ; 96(4) ; 261-268.
- [53] Robinson K.L ; Liu T ; Vandrovcova J ; et al ; 2007. Lynch Syndrome (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer) Diagnostics ; *Journal of the National Cancer Institute* ; 99 (4) ; 291-299.
- [54] Olschwang S ; Eisinger F ; 2005. Prédilection héréditaire au cancer colorectal et inactivation de la fonction de réparation des mésappariements de l'ADN ; *Pathologie biologique* ; 54 (4) ; 215-229.
- [55] Alexander J ; Watanabe T ; Wu TT ; et al ; 2001. Histopathological identification of colon cancer with microsatellite instability ; *Am J Pathol* ; 158 ; 527-35.
- [56] Julie C ; Tresallet C ; Brouquet A ; et al ; 2008. Identification in daily practice of patients with Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) : Revised Bethesda guidelines based approach versus molecular screening ; *Am J Gastroenterol* ; 103 ; 2825-35.

[57] Terdiman JP ; 2005. It is time to get serious about diagnosing Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer with defective DNA mismatch repair) in the general population ; *Gastroenterology* ; 129 ; 741-4.

[58] Schischmanoff P ; O Lagorce C ; et al ; 2005. Le syndrome HNPCC (Hereditary Non Polyposis Colon Cancer) Diagnostic et prise en charge : Utilisation pratique de la génétique dans la prise en charge des adénocarcinomes coliques = Use of genetics in the management of adenocarcinomas of the colon ; *Gastroentérologie clinique et biologique* ; 29 (10) ; 1028-1034.

[59] Shia J ; 2008. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part I ; The utility of immunohistochemistry. *J Mol Diagn* ; 10 ; 293-300.

[60] Kuiper RP ; Vissers LE ; Venkatachalam R ; Bodmer D ; Hoenselaar E ; Goossens M ; Haufe A ; Kamping E ; Niessen RC, Hogervorst FB ; Gille JJ ; Redeker B ; Tops CM ; van Gijn ME ; van den Ouweland AM ; Rahner N ; Steinke V ; Kahl P ; Holinski-Feder E ; Morak M ; Kloor M ; Stemmler S ; Betz B ; Hutter P ; Bunyan DJ ; Syngal S ; Culver JO ; Graham T ; Ligtenberg MJ ; 2011. Recurrence and variability of germline EPCAM deletions in Lynch syndrome ; *Hum Mutat* ; 32 ; 407–14.

[61] Tutlewska ; Jan Lubinski and Grzegorz Kurzawski ; 2013. Hereditary Cancer in Clinical Practice ; 11 ; 9

[62] Martín-López JV ; Fishel R ; 2013. The mechanism of mismatch repair and the functional analysis of mismatch repair defects in Lynch syndrome ; *Fam Cancer*; 12(2) ; 159-168.

[63] da Silva ; F.C ; Valentin ; M.D ; Ferreira, F.O ; Carraro ; D.M ; Rossi ; B.M ; 2009. Mismatch repair genes in Lynch syndrome: a review ; *Sao Paulo Med J* ; 127(1) ; 46-51.

[64] Kolodner ; R.D ; Hall ; N.R ; Lipford ; J ; Kane ; M.F ; Morrison ; P.T ; Finan ; P.J ; et al ; 1995. Structure of the human MLH1 locus and analysis of a large hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma kindred for MLH1 mutations ; *Cancer Res* ; 55 ; 242-248.

[65] Hesson ; L.B ; Hitchins ; M.P ; Ward ; R.L ; 2010. Epimutations and cancer predisposition: importance and mechanisms ; *Current Opinions in Genetics and Development* ; 20 ; 1-9.

- [66] Kolodner ; R.D ; Hall ; N.R ; Lipford ; J ; Kane ; M.F ; Rao ; M.R.S ; Morrison ; P et al ; 1994. Structure of the human MSH2 locus and analysis of two Muir-Torre kindreds for msh2 Mutations ; Genomics ; 24(3) ; 516-526.
- [67] Obmolova G ; Ban C ; Hsieh P ; Yang W ; 12 oct 2000. Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA ; Nature ; 407(6805) ; 703-710.
- [68] Wagner A ; Barrows A ; Wijnen JT ; van der Klift H ; Franken PF ; Verkuijlen P ; et al ; 2003. Molecular analysis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the United States: high mutation detection rate among clinically selected families and characterization of an american founder genomic deletion of the MSH2 gene ; Am J Hum Genet ; 72 ; 1088-100
- [69] Peltomäki P ; Vasen H ; 2004. Mutations associated with HNPCC predisposition - Update of ICG-HNPCC/INSiGHT mutation database ; Dis Markers ; 20(4-5) ; 269-276.
- [70] Mohd Nizam Zahary ; Gurjeet Kaur ; Muhammad Radzi Abu Hassan ; Harjinder Singh ; Venkatesh R Naik ; Ravindran Ankathil ; 2012. Germline mutation analysis of MLH1 and MSH2 in Malaysian Lynch syndrome patients ; World Journal of Gastroenterol.
- [71] Andy Vierstraete. Molecular biology of the cell. 1999.
- [72] Knippers, R. Molekulare Genetik. Georg Thieme Verlag. Stuttgart. 1995.
- [73] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>
- [74] <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- [75] Fokkema ; I.F ; Taschner ; P.E ; Schaafsma ; G.C ; Celli, J ; Laros ; J.F ; den Dunnen ; J.T ; 2011. LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases. Hum Mutat ; 32(5) ; 557-63
- [76] International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours (InSiGHT) ; Mutations. 2011.
- [77] Tournier I ; Vezain M ; Martins A ; Charbonnier F ; Baert-Desurmont S ; Olschwang S ; et al ; déc 2008. A large fraction of unclassified variants of the mismatch repair genes MLH1 and MSH2 is associated with splicing defects ; Hum Mutat ; 29(12) ; 1412-1424.
- [78] Peltomaki P ; Vasen H ; 2004. Mutations associated with HNPCC predisposition – Update of ICG-HNPCC ; INSiGHT mutation database ; Dis Markers ; 20 ; 269-76.
- [79] Grandval P ; Fabre AJ ; Gaildrat P ; Baert-Desurmont S ; Buisine M-P ; Ferrari A ; et al ; 2013. UMD-MLH1/MSH2/MSH6 databases: description and analysis of genetic variations in French Lynch syndrome families ; Database J Biol Databases Curation.

**[80]** Ou J ; Niessen RC ; Lützen A ; Sijmons RH ; Kleibeuker JH ; de Wind N ; et al ; nov 2007. Functional analysis helps to clarify the clinical importance of unclassified variants in DNA mismatch repair genes ; Hum Mutat ; 28(11) ; 1047-1054.

**[81]** Warren JJ ; Pohlhaus TJ ; Changela ; Iyer RR ; Modrich PL ; Beese LS ; 2007. Structure of the human MutSalpha DNA lesion recognition complex. ; Mol Cell ; 26 ; 579–592. [PubMed: 17531815]