



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي



Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم بيولوجيا الحيوان

Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Science

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Génétique Moléculaire*

N° d'ordre :

N° de série :

***Étude des gènes de prédisposition aux cancers
colorectaux : Syndrome de Lynch***

Présentée par : ZIADA-BOUCHAAR Hedia

Jury d'évaluation :

Présidente : ROUABAH Leila (*Professeur - Université Frères Mentouri, Constantine 1*).

Directeur : ABADI Noureddine (*Professeur – Université Salah Boubnider, Constantine 3*).

Co-Directrice : SATTA Dalila (*Professeur - Université Frères Mentouri, Constantine 1*).

Examineurs : BOURAS Mourad (*Professeur - Université El Hadj Lakhdar, Batna*) ;

FILALI Taha (*Professeur – Université Salah Boubnider, Constantine 3*) ;

TEBIBEL Soraya (*Professeur - Université Frères Mentouri, Constantine 1*).

Année universitaire
2016 – 2017

*Merci Ya Allah, mon DIEU
tout puissant, qui a guidé mes pas sur le
chemin de la science.
Et qui m'a donné la volonté, la santé et le
courage pour la réalisation de ce travail.*

« Laka el Hamdou wa laka echoukrou »

REMERCIEMENTS

A mon directeur de thèse : Pr. ABADI Nouredine (Université 3 Constantine)

Vous m'avez fait confiance et ouvert les portes de la connaissance, vous m'avez encouragé à développer la pratique de la biologie moléculaire en mettant à ma disposition votre laboratoire et son équipement et la liberté de choisir mon chemin de recherche avec toute confiance en mes capacités. Je vous suis éternellement reconnaissante.

Je vous remercie de votre patience, votre disponibilité et des précieux conseils que vous n'avez cessé de me prodiguer tout au long de la réalisation de cette thèse.

Vos qualités humaines d'homme de science ainsi que votre amour de notre pays sont un exemple qui s'offre à nous chaque jour.

A ma directrice de thèse : Pr. SATTI Dalila (Université 1, Constantine)

Aucune expression de remerciement ne saurait suffisamment témoigner ma reconnaissance pour l'immensité de votre disponibilité, patience, rigueur scientifique, tolérance et esprit de collaboration que vous n'avez cessé de nous dispenser depuis notre premier pas en génétique.

Mon profond respect pour la personne aux généreuses qualités humaines que vous êtes et pour qui la gentillesse, la prévenance et la compréhension n'ont d'égaux que les précieux conseils et l'inébranlable confiance en mes capacités que vous n'avez manqué de m'accorder depuis le début de cette formation.

A travers ce travail, fruit des efforts déployés depuis des années, permettez-moi de vous exprimer ma très grande reconnaissance et gratitude.

J'exprime également mes remerciements aux membres du jury pour la très aimable disponibilité qu'ils témoignent en acceptant de juger mon travail :

A la présidente de ce jury : Pr. Rouabah Leila (Université 1, Constantine)

Je tiens à vous remercier de l'honneur que vous m'avez fait en acceptant de présider ce jury. Je vous suis très reconnaissante de l'intérêt que vous avez toujours porté à mon travail, je n'oublie jamais vos conseils et nos discussions ont toujours éclairé mon chemin.

Mr. FILALI Taha (Professeur - Université 3, Constantine)

Les mots, merci et gratitude sont faibles pour vous exprimer ma reconnaissance. Votre aide précieuse et votre soutien pendant toutes ces années ont permis la réalisation de ce travail, Merci.

Mr. BOURAS Mourad (*Professeur - Université El Hadj Lakhdar, Batna*),

L'honneur que vous nous faites nous touche infiniment et nous tenons à vous exprimer notre profonde reconnaissance. Veuillez accepter, cher Monsieur, dans ce travail, l'assurance de notre estime et notre profond respect.

Mme TEBIBEL Soraya (*Professeur - Université1, Constantine*) :

Je vous suis vraiment reconnaissante pour votre investissement dans l'évaluation de mon travail. Vous nous honorez par votre présence au jury. Mon profond respect vous est acquis.

Je remercie également :

Le Pr. Benlatreche Cherifa pour ses encouragements et l'intérêt qu'elle a porté à cette étude durant toutes les années de travail au laboratoire.

Qu'elle trouve ici le témoignage de toute ma gratitude et mon profond respect pour une grande personnalité.

Les Drs : Amari, Chirouf, Bouzidi, les archivistes Nadia, Houda et Abdelmalek, Dr. Djemaa, Taleb et tout le personnel du service chimiothérapie et d'oncologie médicale (CAC).

Le Dr. Hammada pour ses conseils et encouragements et le personnel du service de gasro-entérologie.

Tous les membres de laboratoire de Biologie et de Génétique Moléculaire :

Dr. Sifi Karima, Dr. Hanachi Sabah, Abla Manel, Zohir Boulakroun, Messaouda, Maya pour leurs aides et encouragements.

Un merci particulier à Madame Yasmina Dadsi pour sa contribution avec beaucoup de compétences dans la partie expérimentale de ma thèse.

Merci Yasmina pour ta gentillesse.

Cette étude n'aurait pas été possible sans la collaboration du personnel de laboratoire d'oncogénétique de Cochin (*Paris*) : Je remercie Pr Eric Clauser pour son accueil dans son laboratoire. Merci à Michel, Magali, Marie-Odile North et plus particulièrement à Hamzaoui Nadim, pour leur excellente contribution technique et bio-informatique dans la partie expérimentale de cette thèse, qu'ils trouvent le témoignage de ma grande gratitude et de mon profond respect.

Mes remerciements à tous mes chers amis, collègues enseignantes et enseignants avec qui j'ai partagé les bons souvenirs mais aussi les moments difficiles tout au long de notre parcours de formation universitaire et professionnelle : Razika, Sana, en particulier Djalila pour son aide à tout moment et Larbi, Naouel, Warda, Wissem, Wided, Asma, Moufida et Sandra un merci chaleureux à Halima et Yazila.

Ma très chère Mina Zitouni, que je remercie particulièrement pour son aide immense dans la correction et « l'editing en anglais » de l'article.

Tous les membres de la Faculté de Sciences de la Nature et de la Vie et plus particulièrement ceux des Départements de Biologie Animale, Biochimie et Biologie moléculaire.

Je remercie infiniment tous les patients CCR pour leur collaboration et participation dans cette recherche que le bon DIEU leur accorde patience et guérison.

Enfin je remercie tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.

D E D I C A C E S

A mes PARENTS bien-aimés : Abdelghani et Hanifa,

Je vous offre cette thèse, Sans vous, votre amour et vos sacrifices elle n'aurait pas vu le jour.

J'ai toujours eu en accompagnement la sensation de votre soutien affectueux surtout dans les moments difficiles durant mes années d'études.

Il n'est pas de mots assez forts pour exprimer mon immense amour et ma profonde gratitude, pour les efforts que vous avez consacrés pour mon éducation :

vous m'avez toujours guidée et conseillée avec la plus grande des sagesses. Ma réussite est la vôtre.

Je prie DIEU, le tout puissant, de vous accorder santé et longue vie afin que je puisse vous combler à mon tour sans jamais vous décevoir.

A mon EPOUX Samir

Tu as cru en mes capacités intellectuelles et m'a constamment encouragée et soutenue tout au long de ces années. Ta présence à mes côtés et ta patience m'ont donné la force pour surmonter les moments les plus difficiles.

Ton aide et tes conseils m'ont été précieux et m'ont permis d'avancer en toute confiance et d'atteindre mes objectifs.

Que ce travail soit pour toi le témoignage de notre amour permanent.

Et que DIEU puisse bénir notre union éternelle.

A mes très chères ANGES, adorables et tendres princesses ***Yara et Djana*** source de joie et de bonheur. Vous remplissez mon cœur. Merci mes chéries d'être là et surtout d'être patientes : Maman tu étudies toujours, quand est ce que tu termineras ? Que vous répondre, on ne termine jamais avec le savoir et que DIEU vous l'accorde. J'espère pouvoir rattraper tous les moments que j'ai passés loin de vous.

Mes chères SŒURS Hadjer et Khaoula.

Mes chers FRERES Mohamed Elhadi et Abdrrahim.

Soyez assurés de ma sincère gratitude. Je tiens à vous exprimer ici mon affection, ma reconnaissance.

Merci tout simplement d'être mes frères et mes sœurs.

Je prie DIEU le tout puissant de vous accorder santé, et beaucoup de bonheur.

A L'ENSEMBLE de ma famille, en particulier *Oncle Mounir et tante Leila* qui étaient toujours présents à mes côtés par leur amour et soutien moral, *Oncle Mustafa et tante Adra, Mes tantes Nadira et Leila* et à tous mes *cousins et cousines* pour leurs soutien et encouragements tout au long de mes études. *Mes tantes maternelles Salima, Malika, Saida, Soltana* et à tous leurs enfants.

A la mémoire de mes **GRANDS PARENTS** qui sont toujours présents dans mon cœur, leur souvenir est une bougie illuminant mon chemin et leur amour était l'une des fortes raisons de ma réussite.
A la mémoire de mon défunt oncle *Zineddine*.

A ma BELLE-MERE et mon BEAU-PERE
À qui j'exprime mon respect et ma considération.
Que DIEU le tout puissant vous garde et vous procure santé et bonheur.
A tous les membres de ma belle famille.

A mes très chères **AMIES** avec qui j'ai passé les jours les plus joyeux dans ma vie. J'ai partagé avec vous d'agréables moments de complexité : *Moona, Mouna, Saby, Nesrine, khadidja*, mais aussi *Hiba, Lilia et Ahlem*.

A **TONTON Claude Culot**, pour toi une dédicace spéciale et mes vifs remerciements pour m'avoir aidé dans la correction de ma thèse. J'ai tellement apprécié tes conseils et remarques pertinents.
A ta femme *Malika*, bienvenue dans la famille.

Je dédie cette thèse à mon très cher pays, l'ALGERIE.

Liste des abréviations

ACP :	A mplification en Chaîne par P olymérase
AAPC :	A ttenuated A denomatous P olyposis C oli
AJCC :	A merican J oint C ommittee on C ancer
AKT:	AKR T cell lymphoma
APC :	A denomatous P olyposis C oli
ARM :	A ge-related m ethylation
BAX :	B cl2 associated X protein
BER :	B ase E xcision R epair
BET:	B romure d' E thidium
BRR:	B unnayan- R iley- R uvalcaba
CCD :	C harge- C ouple- D evice
CCR :	C ancer C olorectal
CGH :	H ybridation g énomique c omparative
CIMP :	C pG I sland M ethylator P henotype
CIN :	C hromosomal I nstability
CMMR-D.	C onstitutional M is M atch R epair D eficiency
COX-2:	C yclo- O xygenase-2
CpG :	C ytosine- p hosphate- G uanine
DCC :	D eleted in C olon C ancer
DNmt :	D N A m éthyl- t ransferase
EDTA:	E thylene D iamine T etra- a cetic A cid
EGFR :	E pidermal G rowth F actor R eceptor
EIF4E :	E ukaryotic T ranslation I nitiation f actor 4
EpCAM :	E pithelial C ell A dhesion M olecule
FAP:	F amilial A denomatous P olyposis
FCA :	F oyers de C ryptes A aberrantes
GSK3B :	G lucogen S ynthétase K inase 3β
GTBP:	G T B inding P rotein
GWAS:	g enome-wide a ssociation s tudy
HAT :	H iston A cétylase T ransferase
HER1 :	H uman E pidermal R eceptor -1
HFS:	H uman S plicing F inder
HNPCC :	H ereditary N on- P olyposis C olorectal C ancer
<i>HRAS</i> :	H arvey R AS
ICG-HNPCC.	I nternational C ollaborative G roup for H N P CC
IDL :	I nsertion/ D eletion L oop
IGF2 :	I nsulin-like G rowth F actor 2
IHC :	I mmunohisto ch imie
IMC :	I ndice de M asse C orporelle

INCa : **I**nstitut National du **C**ancer
 InSiGHT : . . . **I**nternational **S**ociety for **G**astrointestinal- **H**ereditary **T**umours
 JPS: **J**uvenile **P**olyposis **S**yndrome
 KRAS: **K**irsten **R**elative **A**llele **S**ignal
 LOH: **L**oss **O**f **H**eterozygoty
 LOVD: **L**eiden **O**pen **V**ariation **D**atabase
 LRRFIP1 : . . . **L**eucine-**R**ich **R**epeat **F**lightless-**I**nteracting **P**rotein **1**
 LS: **L**ynch **S**yndrome
 MAP : **M**UTYH **A**ssociated **P**olyposis
 MAPP-MMR **M**ultivariate **A**nalysis of **P**rotein **P**olymorphisms-**M**ismatch **R**epair
 MAPK : **M**itogen-**A**ctivated **P**rotein **K**inase
 MCC : **M**utated in **C**olon **C**ancer
 MEK: *MAPK/ERK kinase*
 MLH1, 3 **M**utL **H**omologue 1,3
 MICI : **M**aladies **I**nflammatoires **C**hroniques de l'Intestin
 MLPA : **M**ultiplex **L**igation dependent **P**robe **A**mplification ou
 MMR : **M**ismatch **R**epair
 MSI : **M**icrosatellite **I**nstability
 MSI+: **M**SI-**P**ositive, **H**igh **G**rade of **M**icrosatellite **I**nstability
 MSI-H: **M**SI-**P**ositive, **H**igh **G**rade of **M**icrosatellite **I**nstability
 MSI-L: **L**ow **G**rade of **M**icrosatellite **I**nstability
 MSS : **M**icrosatellite **S**tability
 MSH2,4,5,6 **M**utL **H**omologue 2,4,5,6
 MTOR : **M**ammalian **T**arget **O**f **R**apamucine
 MYH: **M**utY **H**omolog
 NRAS: **N**euroblastoma **R**AS
 NGS : **N**ext **G**eneration **S**equencing
 OMS : **O**rganisation **M**ondiale de la **S**anté
 PCNA: **P**roliferating **C**ell **N**uclear **A**ntigen
 PCR. **P**olymerase **C**hain **R**eaction
 PI3K : **P**hosphatidyl **I**nositol **3** **K**inase
 PI3K: (*Phosphatidyl Inositol 3 Kinase*
 PMS1: **P**ostmeiotic **S**egregation **1** **G**ene
 PMS2: **P**ostmeiotic **S**egregation **2** **G**ene
 PolyPhen-2 *Polymorphism Phenotyping v2*
 PTEN : **P**hosphatase and **T**ensin **H**omolog
 RB1 **R**etinoblastoma **G**ene
 RER : **R**eplication **E**Rror
 RFC: **R**eplication **F**actor **C**
 SAM : **S**-**A**dénosyl**M**éthionine
 SIFT: **S**ort **I**ntolerant **F**rom **T**olerant

SL : **S**yndrome de **L**ynch
SMAD2,3,4 **S**MA and **MAD**-related protein 2,3,4
SNP : **S**ingle **N**ucleoid **P**olymorphism
SOS: **S**on Of **S**evenless
STK11: **S**erine/**T**hreonine protein **K**inase gene
TACSTD1 :. **T**umor-**A**ssociated **C**alcium **S**ignal **T**ransducer**1**
TBE: **T**ris-**B**orate-**E**DTA
TCF : **T**-**C**ell **F**actor
TSG: **T**umour **S**uppressor **G**ene
TGFβ : **T**ransforming **G**rowth **F**actor **B**eta
TGF RII **T**ransforming **G**rowth **F**actor **R**eceptor **I**I
TNM : **T**umor **N**ode **M**etastasis
TP53: **T**umour **P**rotein **53**
UICC : **U**nion **I**nternationale **C**ontre le **C**ancer.
UMD : **U**niversal **M**utation **D**atabase
VSI : **V**ariant de **S**ignification biologique et clinique **I**nconnue
Wnt: **W**ingless **T**ype
5-FU: **5**-**F**luorouracile.

Liste des figures

Figure	Page
1 Anatomie du colon et du rectum.....	4
2 Les différentes couches histologiques de la paroi du colon et du rectum.....	5
3 Structure de l'épithélium intestinal d'un crypte.....	5
4 Taux d'incidence du Cancer Colorectal selon le sexe et la région du monde.....	6
5 La voie de l'instabilité chromosomique.....	14
6 Mécanismes de l'instabilité microsatellitaire.....	14
7 Mécanisme d'inactivation de la transcription.....	16
8 Les changements moléculaires, génétique et épigénétiques en respectant la progression de CCR.....	18
9 Intrication des différentes voies de la cancérogenèse.....	19
10 Voies de la cancérogenèse.....	19
11 Représentation schématique des voies RAS/MAPK et PI3K/AKT.....	21
12 Voie de signalisation Wnt : en l'absence du ligand Wnt /en présence du ligand Wnt.....	23
13 La voie de signalisation TGFβ.....	24
14 Rôle du gène APC, position des principales mutations germinales et corrélation génotype –phénotype.....	28
15 Réparation de la lésion oxydative impliquant la 8-oxoG par MUTYH.....	30
16 Mode d'action du système MMR chez l'homme.....	37
17 Schéma de la réparation d'un mésappariement par le MMR chez les eucaryotes.....	37
18 Représentation schématique du gène <i>MLH1</i>	38
19 Représentation schématique de la protéine MLH1.....	38
20 Représentation schématique du gène <i>MSH2</i>	39
21 Représentation schématique de la protéine MSH2.....	39
22 Représentation schématique du gène <i>MSH6</i>	40
23 Représentation schématique du gène <i>PMS2</i>	40
24 Répartition des mutations des gènes MMR dans le syndrome de Lynch.....	41
25 Organisation structurale de locus <i>EpCAM-MSH2</i>	43
26 Exemple d'un profil d'une tumeur MSI.....	46
27 Exemple de résultats d'immunohistochimie des protéines MMR.....	47
28 Indications de consultation d'oncogénétique dédiée au syndrome de Lynch.....	49
29 Programme PCR des gènes <i>MLH1</i> et <i>MSH2</i>	57
30 Plaque d'amplification PCR du gène <i>MLH1</i>	58

31	Profil de migration des amplicons des exons de <i>MLH1</i>	59
32	Profil d'électrophorèse de certains exons amplifiés par PCR.....	59
33	Description de la réaction MLPA.....	66
34	Déroulement de la manipulation MLPA.....	68
35	Répartition de la population d'étude selon le sexe et l'âge de diagnostic.....	69
36	Répartition des patients SL selon le site primaire de la tumeur.....	71
37	Répartition des patients SL selon le stade de la tumeur.....	72
38	Répartition des cas SL selon les critères d'Amsterdam I/II et de Bethesda avec ou sans antécédents familiaux.....	74
39	Chromatogramme du séquençage du début de l'intron 5 de gène <i>MSH2</i> touchant le 3 ^{ème} nucléotide chez le cas ind ex F 3.1 et 5 autre membres de la famille F3.....	77
40	La mutation c.942 + 3A> T touche un site donneur de l'épissage de l'exon 5.....	77
41	Chromatogramme de séquençage du variant c.2210 +11_2210 + 22del12 sur <i>MSH2</i> chez 6 membres de la famille F3.....	79
42	Arbre généalogique de la famille F3.....	79
43	Utilisation de logiciel Human Splice Finder (HSF) v3.0 pour le variant c.2210+11_2210+22del12.....	81
44	Utilisation de logiciel NetGene v 2.4 pour le variant c.2210+11_2210+22del12.....	82
45	Utilisation de logiciel NNSPLICE 0.9 pour le variant c.2210+11_2210+22del12 du gène <i>MSH2</i> chez la famille F3.....	82
46	Pedigree de la famille F27.....	84
47	Utilisation de PolyPhen-2 sur le variant c.728G>A du gène <i>MSH2</i>	85
48	Utilisation de SIFT sur le variant c.728G>A du gène <i>MSH2</i>	85
49	Utilisation de MAPP MMR sur le variant c.728G>A du gène <i>MSH2</i>	85
50	Chromatogramme de séquençage de la mutation c.881_884delTCAGinsCATTCCT....	86
51	Utilisation de logiciel NetGene v 2.4 pour le variant c.881_884delTCAGinsCATTCCT.....	87
52	Utilisation de logiciel NNSPLICE 0.9 pour le variant c.881_884delTCAGinsCATTCCT.....	87
53	Utilisation de logiciels HFS v 3.0 pour le variant c.881_884delTCAGinsCATTCCT....	88
54	Arbre généalogique de la famille F10 porteuse de la mutation c.881_884delTCAGinsCATTCCT.....	89
55	Chromatogramme montrant la transvesion c.1020C> G.....	90
56	Chromatogramme de la délétion GATT sue le gène <i>MLH1</i>	98
57	Description schématique de la délétion c.1 -? _ 260 + del sur <i>MSH6</i>	102
58	Profils MLPA obtenus chez un sujet sain et chez la patiente F2.....	99

Listes des tableaux

Tableau		Page
1	Les différents syndromes de prédisposition héréditaire aux CCR.....	26
2	Cancers du spectre étroit et spectre large associés au syndrome de Lynch.....	33
3	Principaux acteurs impliqués dans les voies de réparation MMR chez <i>E.coli</i> et chez l'homme.....	35
4	Classification des variants MMR selon les critères InSiGHT.....	42
5	Séquences des amorces et tailles d'amplimers du gène <i>MLH1</i>	54
6	Séquences des amorces et tailles d'amplimers du gène <i>MSH2</i>	55
7	Composition du milieu réactionnel des PCR.....	57
8	Répartition de la population d'étude selon le sexe.....	69
9	Caractéristiques cliniques et Résultats des analyses moléculaires chez les familles HNPCC étudiées.....	76
10	Distribution des cas de SL selon la localisation primaire de la tumeur.....	71
11	Corrélation génotype/phénotype de la présence ou l'absence des deux variants détectés chez les différents membres analysés de la F3.....	80
12	Description des polymorphismes identifiées dans les gènes <i>MLH1</i> et <i>MSH2</i> des familles HNPCC analysées.....	93

Table des matières

Introduction	1
Chapitre I : Revue bibliographique	
1. Cancer Colorectal	4
1.1. Caractéristiques anatomiques et fonctionnelles du Colon et Rectum.....	4
1.1.1. Anatomie.....	4
1.1.2. Histologie.....	5
1.1.3. Fonctions.....	6
1.2. Données épidémiologiques.....	6
1.3. Étapes de la progression tumorale dans le CCR.....	7
1.4. Stades et classification.....	8
1.5. Facteurs de risque et facteurs protecteurs.....	9
1.5.1 Age et sexe.....	9
1.5.2 Habitudes de vie.....	10
1.5.3 Antécédents de maladies.....	11
2. Carcinogène colorectale	12
2.1. Instabilité chromosomique.....	12
2.2. Instabilité génétique.....	14
2.3. Modifications épigénétiques.....	15
2.4. Interaction entre mécanismes.....	19
2.5. Voies de signalisation cellulaire impliquées.....	20
2.5.1. Voies de signalisation cellulaire liées à l'EGFR.....	20
2.5.2. Voies de signalisation cellulaire non liées à l'EGFR.....	22
3. Formes héréditaires du cancer colorectal	26
3.1. Polypose adénomateuse familiale (PAF).....	27
3.1.1. Polypose adénomateuse familiale atténuée.....	27
3.1.2. Variants du gène APC dans la PAF.....	28
3.1.3. Corrélations génotype-phénotype.....	28
3.2. Polypose liée à MUTYH.....	29
3.2.1. Syndrome MAP.....	29
3.2.2. Système de réparation BER.....	30
3.2.3. Variants du gène MUTYH.....	31
4. Syndrome de Lynch	32
4.1. Incidence, découverte et historique.....	32
4.2. Caractéristiques cliniques.....	32
4.2.1. Variétés cliniques.....	33
4.2.2. Critères d'Amsterdam et de Bethesda.....	33
4.3. Génétique et mécanisme moléculaire du syndrome de Lynch.....	34
4.3.1. Système MMR.....	34
4.3.2. Gènes MMR.....	38
4.3.3. Mutations germinales dans les gènes MMR.....	40
4.3.4. Polymorphismes et variants des gènes MMR impliqués.....	42
4.3.5. Inactivation épigénétique du système MMR.....	43
4.4. Syndrome X.....	44
4.5. Stratégies de diagnostic de Syndrome de Lynch.....	45
4.5.1. Recherche d'instabilité des microsatellites.....	45
4.5.2. Analyse en immunohistochimie des protéines MMR.....	47
4.6. Prise en charge de syndrome de Lynch.....	48

Chapitre II : Étude Expérimentale

1. Patients et méthodes.....	50
1.1. Patients.....	50
1.1.1. Recrutement des sujets	50
1.1.2. Questionnaire, enquête familiale et consentement.....	50
1.1.3. Prélèvement sanguin.....	51
1.2. Méthodes.....	51
1.2.1. Extraction de l'ADN.....	52
1.2.2. Amplification par PCR des exons de gènes <i>MLH1</i> , <i>MSH2</i> et <i>MSH6</i>	53
1.2.3. Purification enzymatique du produit de PCR.....	60
1.2.4. Réaction de séquençage	60
1.2.5. Purification des produits de séquence.....	61
1.2.6. Électrophorèse capillaire.....	62
1.2.7. Bioinformatiques.....	63
1.2.8. Ressources Web et Software utilisés pour l'étude fonctionnelle <i>in Silico</i>	63
1.2.9. Statistiques.....	64
1.2.10. Analyse des réarrangements par Multiplex Ligation dependent Probe Amplification.....	65
2. Résultats et discussion.....	69
2.1. Répartition de la population d'étude selon le sexe.....	69
2.2. Répartition des cas index selon le sexe l'âge de diagnostic.....	69
2.3. Répartition des probants SL selon les caractéristiques cliniques.....	70
2.3.1. Répartition des patients SL selon le site primaire de la tumeur.....	70
2.3.2. Répartition des patients SL selon le stade d'évolution de la tumeur.....	72
2.4. Répartition des patients SL par rapport aux critères d'Amsterdam et de Bethesda	73
2.5. Stratégie adoptée dans l'étude des gènes MMR impliqués dans la genèse du SL	75
2.5.1. Étude des gènes MMR par séquençage.....	77
A. Variants pathogènes de <i>MSH2</i> , <i>MLH1</i> , et <i>MSH6</i>	77
1. Gène <i>MSH2</i>	77
2. Gène <i>MLH1</i>	86
3. Gène <i>MSH6</i>	90
4. Corrélation génotype-phénotype.....	90
B. Polymorphismes des gènes <i>MLH1</i> et <i>MSH2</i> identifiés chez les patients SL.....	92
1. Polymorphismes sur les parties régulatrices.....	94
2. Polymorphismes dans les parties exoniques et introniques.....	95
2.5.2. Étude des gènes MMR par Multiplex Ligation dependent Probe Amplification.....	98
Discussion générale et perspectives.....	103
Conclusion.....	108
Références bibliographiques.....	109
ANNEXES	
RESUMES	

INTRODUCTION

Le cancer colorectal (CCR) regroupe sous cette dénomination le cancer du colon et celui du rectum. Les CCR, par leur fréquence et leur gravité, représentent un sérieux problème en cancérologie dans le monde. C'est le troisième cancer diagnostiqué dans les deux sexes confondus après le poumon et le sein (*Ferlay et al., 2015*). En Algérie, ce cancer constitue actuellement un problème majeur de santé publique. Il a été noté, qu'entre 2006 et 2010, le CCR a touché 9.9/ 10⁵ habitants et a présenté 9.6% et 8.5% d'atteinte chez l'homme et la femme respectivement (*Hamdi Cherif et al., 2014*).

La carcinogenèse colique est un processus d'initiation et de transformation de cellules normales. Celui-ci est une séquence de multiples étapes aboutissant à l'accumulation d'anomalies génétiques héritées et acquises suite à des modifications génétiques et épigénétiques de l'ADN (*Jones et al., 2002 ; Tariq and Ghias, 2016*).

Dans les CCR, on distingue les formes sporadiques et les formes héréditaires. Les formes sporadiques seraient dûes à une combinaison de facteurs aussi bien génétiques qu'environnementaux contrairement aux cancers héréditaires qui sont souvent liés à une prédisposition génétique héréditaire. La forme la plus fréquente des CCR héréditaires est le syndrome de Lynch (SL) également connu sous le nom HNPCC (Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer) (MIM 120435). Le SL présente entre 2-4% de tous les CCR (*Vasen et al., 2010*). Sa prévalence dans la population générale est estimée entre 1/660 et 1/2000 (*de la Chapelle, 2005*). La première description du syndrome HNPCC date de 1913 identifié par l'anatomopathologiste Alfred Warthin (*Warthin AS., 1913*) puis caractérisé en 1966 par Henri Lynch, qui lui donna son nom (*Lynch et al., 1966*).

En 1991, le consortium international sur le SL énonce des critères, dits d'Amsterdam I définissant ce syndrome sur le plan clinique dont les critères de reconnaissance reposent sur des informations individuelles et généalogiques (*Vasen et al., 1991 ; Boland et Lynch, 2013*). Le SL se caractérise par l'apparition précoce de CCR mais également par un risque plus élevé du développement d'autres cancers, en particulier, de l'endomètre, de l'ovaire, de l'estomac, de l'intestin grêle, de l'épithélium biliaire et urinaire (*Balaguer et Castells, 2007*) et, certaines tumeurs cutanées et cérébrales (*Cohen et Leininger, 2014*).

Les tumeurs se développant dans le cadre d'une prédisposition de type HNPCC sont le plus souvent caractérisées par une instabilité des microsatellites MSI (MicroSatellite Instability).

La base génétique de ce syndrome est associée à des altérations constitutionnelles dans les gènes de réparation des mésappariements (Mismatch Repair : MMR) de l'ADN (*Berginc et al., 2009*). Ces gènes sont en particulier, *MLH1* (MIM 120436), *MSH2* (MIM 609309), *MSH6*

(MIM 600678) et *PMS2* (MIM 600259). Les mutations sont distribuées tout au long de ces gènes ce qui exclut la présence de points chauds précis.

Les variations dans les gènes *MLH1* et *MSH2* représentent environ 80-90% de toutes les mutations germinales trouvées dans les familles ayant un SL tandis que celles sur *MSH6* et *PMS2* ne représentent que les 10% restants. Ces dernières ont été rapportées dans les familles avec un SL atypique (*Silva et al., 2009*).

En outre, les modifications épigénétiques constitutionnelles des gènes MMR peuvent expliquer une proportion de l'absence de mutations *MLH1* ou *MSH2* chez les familles qui montrent une perte d'expression de l'une de ces protéines dans le tissu tumoral (*Peltomäki, 2014*). De la même manière, il a été récemment démontré que les délétions germinales des derniers exons (l'extrémité 3') du gène *EpCAM* (epithelial Cell Adhesion Molecule) (MIM 185535), situé directement en amont de *MSH2* peuvent conduire à la répression épigénétique de *MSH2*. Ce mécanisme pourrait conférer un phénotype similaire au SL dans les tissus avec une déficience de la protéine MSH2 (*Tutlewska et al., 2013*).

Une grande partie de ces cancers peut être évitée, d'autres peuvent être dépistés à un stade précoce, et ce par la mise en oeuvre de stratégies de prévention et de détection génétique. Dans le but de découvrir l'aspect mutationnel des gènes MMR dans la population algérienne, notre étude s'est basée sur une analyse moléculaire de ces gènes dans des familles suspectées d'avoir un syndrome de Lynch afin d'atteindre les objectifs suivants :

- Mettre au point la technique de séquençage des gènes MMR dans le laboratoire de Biologie et Génétique moléculaire à Constantine afin de développer une stratégie de diagnostic génétique de SL se basant sur :
 - La recherche de mutations constitutionnelles sur les gènes *MLH1*, *MSH2* et *MSH6* par séquençage direct de tous les exons et les parties introniques adjacentes.
 - Le dépistage des apparentés du patient porteur de la mutation pathogène à travers l'histoire familiale.
 - L'identification des variants délétères de ces gènes, spécifiques à la population algérienne afin d'éclaircir leur impact sur la présence de la variété clinique de ce syndrome.
- Développer la technique Multiplex Ligation dependent Probe Amplification (MLPA) dans le but de détecter des remaniements génomiques de grande taille sur les gènes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, et *EpCAM*.

- Evaluer l'impact sur le phénotype d'éventuels nouveaux variants des gènes analysés en utilisant des études fonctionnelles *in silico* et *in vitro*. Ceci permet de donner une signification biologique et clinique au variant.

CHAPITRE I :
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Cancer Colorectal

Le terme *colorectal* fait référence à la fois au côlon et au rectum. Le cancer colorectal comprend le cancer du côlon (gros intestin) et celui du rectum ou cancer rectal. Ces deux types de cancers ont plusieurs éléments communs, pour cela ils sont regroupés sous l'appellation cancer colorectal.

1.1 Caractéristiques anatomique et fonctionnelles du colon et du rectum

1.1.1 Anatomie

Le gros intestin fait suite à l'intestin grêle. Il est situé dans la cavité abdominale en avant des anses grêles. Son diamètre est de 8 cm à son origine et de 4 cm à sa terminaison pour une longueur de 1,50 mètre. Il est divisé en plusieurs segments (Fig.1) :

- le cæcum fait la jonction avec la fin de l'intestin grêle ; à ce niveau est fixé l'appendice, à droite du côlon ;
- le côlon ascendant ou côlon droit, remonte jusqu'au niveau du foie pour faire un angle, angle colique droit ;
- le côlon transverse qui s'étend de l'angle colique droit à l'angle colique gauche ;
- le côlon descendant ou côlon gauche allant de l'angle gauche au niveau du bassin et se terminant par le côlon sigmoïde ;
- le côlon pelvien ou sigmoïde est situé avant la jonction avec le rectum. Sa longueur est variable allant de 20 à 40 cm ;
- le rectum : environ 13 cm de long, constitue la partie terminale du gros intestin ;
- l'anus, point de sortie du côlon, est formé d'un sphincter anal interne à motricité involontaire et un anneau externe à motricité volontaire.

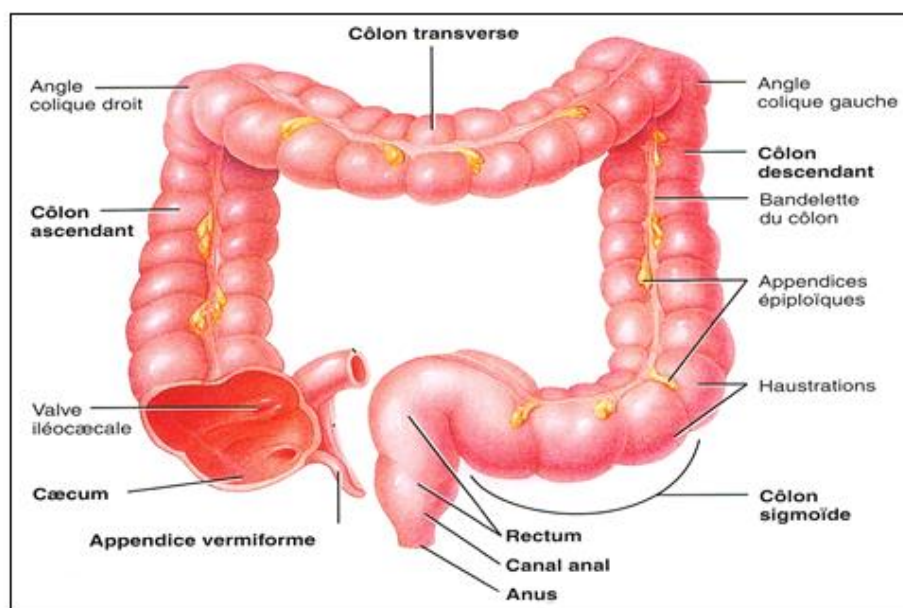


Figure 1 : Anatomie du colon et du rectum.
(TORTORA et DERRICKSON, 2007)

1.1.2 Histologie

Structure de l'épithélium intestinal : Le côlon, comme tous les organes du tractus gastro-intestinal, est formé de 4 couches concentriques (Fig. 2). De l'extérieur vers l'intérieur, se trouvent :

- une couche externe, la séreuse ;
- une musculuse constituée de muscles lisses innervés ;
- une couche intermédiaire, sous-muqueuse où se trouve le tissu stromal ;
- une couche interne, la muqueuse composée d'un épithélium de muqueuse. Cette dernière comprend un mélange de cellules absorbantes et de cellules muqueuses dites : cryptes de Lieberkühn, organisées comme des invaginations tubulaires droites partant de la surface jusqu'à la musculaire.

Au sein de ces cryptes se trouvent plusieurs types cellulaires (*MacFarlane et Stover, 2007*) (Fig. 3).

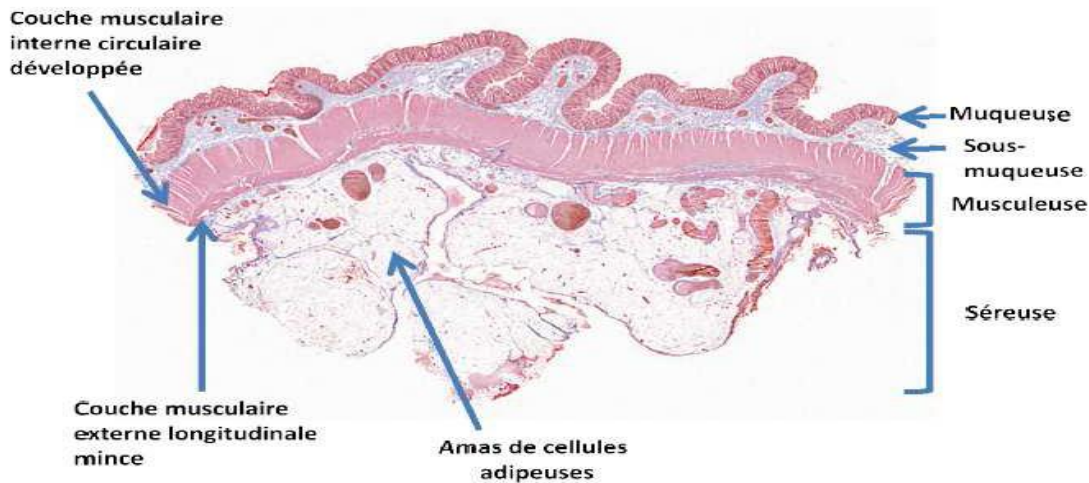


Figure 2 : Les différentes couches histologiques de la paroi du colon et du rectum. (*Sancho et al., 2004*).

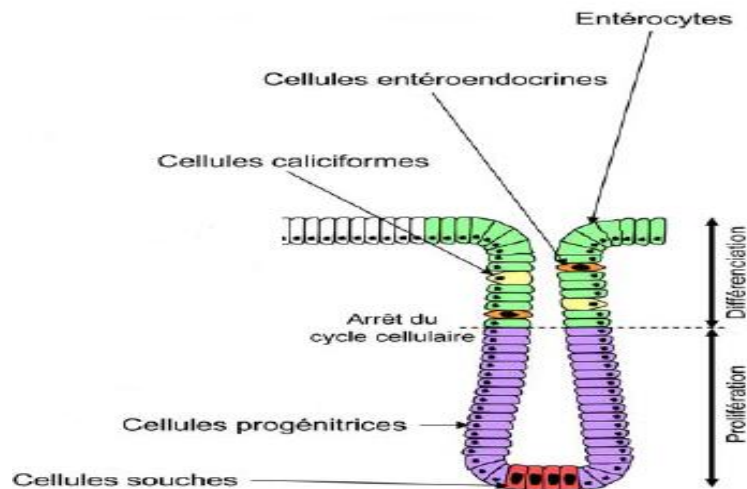


Figure 3 : Structure de l'épithélium intestinal d'un crypte (*Sancho et al., 2004*).

1.1.3 Fonctions

Les principales fonctions du côlon et du rectum sont d'absorber l'eau et les éléments nutritifs des aliments ingérés et d'acheminer les résidus alimentaires hors du corps :

1. le côlon reçoit les aliments partiellement digérés de l'intestin grêle sous forme liquide, la flore intestinale décompose certaines substances en plus petites parties. L'épithélium absorbe l'eau et les éléments nutritifs, donnant aux résidus qui restent une consistance semi-solide (matières fécales, ou selles) ;
2. l'épithélium produit également un mucus à l'extrémité du tube digestif, ce qui facilite le passage des selles dans le côlon et le rectum. Les mouvements péristaltiques font avancer ces selles jusqu'au rectum ;
3. le rectum sert de zone d'attente. Lorsqu'il est plein, il émet un signal au cerveau pour que celui-ci déclenche le déplacement des selles et leur expulsion par l'anus.

1.2 Données épidémiologiques

Les cancers colorectaux, par leur fréquence et leur gravité, représentent un sérieux problème en cancérologie dans le monde, soit plus de 10% du fardeau cancer en terme d'incidence en 2012 selon le rapport Cancer 2014 de l'OMS. C'est le troisième cancer diagnostiqué (1.36 million) dans le monde chez les deux sexes confondus après celui du poumon (1.82 million) et celui du sein (1.67 million)(*Ferlay et al., 2015*). L'incidence de l'atteinte par le cancer colorectal est très variable en fonction des régions dans le monde. Le CCR est un cancer des pays riches : Il est fréquent en Nouvelle Zélande, en Australie, en Europe, en Amérique du Nord et l'Est de l'Asie. Il est rare en Afrique et en Asie du Sud-Central (Fig. 4) (*Torre et al., 2015*).

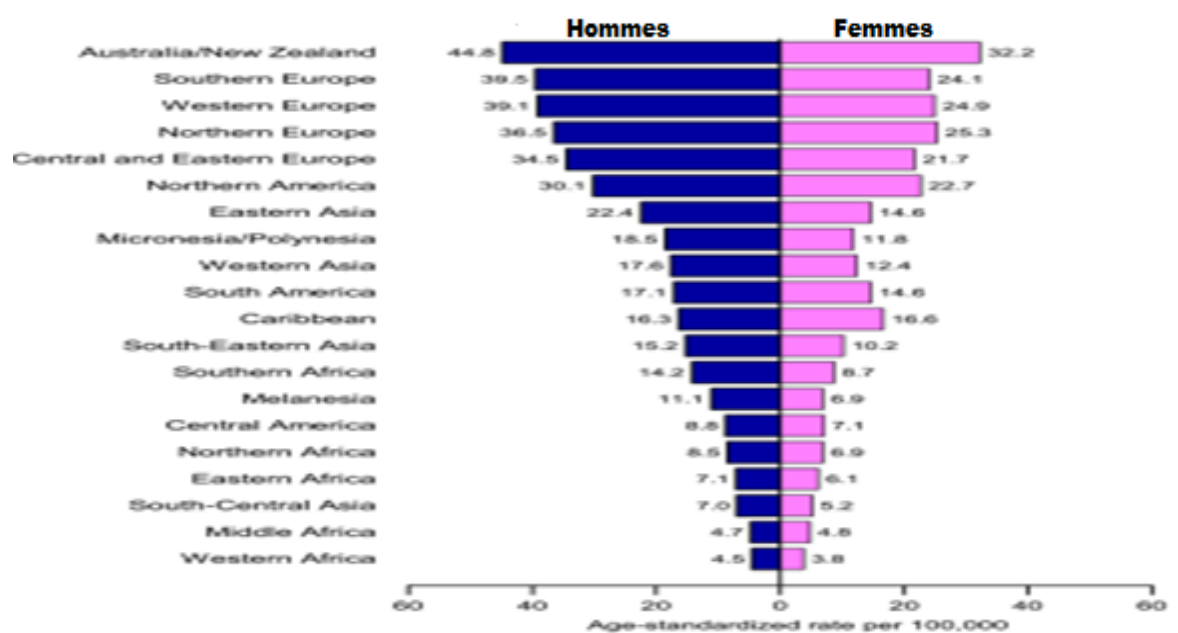


Figure 4 : Taux d'incidence du Cancer Colorectal selon le sexe et la région du monde. Taux estimé pour 100 000 (standardisé sur l'âge) (*Torre et al., 2015*)

La mortalité représente 8,5% du total avec plus de décès (52%) dans les régions les moins développées du monde, reflétant un faible taux de survie dans ces régions (Ferlay et al., 2015). Il y a moins de variabilité dans les taux de mortalité dans le monde, avec les taux les plus élevés estimés de mortalité chez les deux sexes en Europe centrale et de l'Est (20,3 pour 100 000 pour les hommes, 11,7 pour 100.000 chez les femmes), et le plus bas en Afrique de l'Ouest (3,5 et 3,0, respectivement).

En France le cancer colorectal est un problème de santé publique. Selon les séries de GLOBOCAN 2012, on estimait à 42000 le nombre de nouveaux cas de cancers colorectaux et à 17 600 le nombre de décès liés à ce cancer (Binder-Foucard F et al., 2013) avec une mortalité encore proche de 40% (Ferlay et al., 2013).

En Égypte, le CCR représente 6,5% de tous les cancers (El-Bolkainy et al., 2006). Au Maroc, l'incidence standardisée du cancer colique est de 3,77 pour 100 000 hommes/an et de 2,64 pour 100 000 femmes/an, Il représente 8,30% de l'ensemble des cancers en général, et 38,82% des cancers digestifs (Al Hilal.M, 2005). En Tunisie, le CCR occupe le premier rang des cancers digestifs. L'incidence standardisée de ce cancer est de 6,5/100 000 habitants par an chez l'homme et de 6,1/1 00 000 habitants par an chez la femme (Gharbi et al., 2010).

En Algérie :

Le cancer colorectal arrive en 2^e position par ordre de fréquence, après le cancer du sein chez la femme et le cancer du poumon chez l'homme. Le cancer colorectal est encore diagnostiqué à un stade tardif. L'Algérie enregistre chaque année 40.00 nouveaux cas annuellement de cancer du colon et près de 1200 nouveaux cas de cancer du rectum (El-Houari et al., 2011).

L'atteinte est voisine pour les deux sexes jusqu'à 60 ans, puis les taux d'incidence augmentent régulièrement, plus rapidement chez les hommes que chez les femmes (Allem, 2014). Les résultats obtenus dans une étude rétrospective de cancer colorectal à travers l'Ouest algérien, sur une période allant de 2000 à 2006, ont révélé une légère prédominance masculine avec un sex-ratio de 1,2 (Meddah et al., 2009). Selon le registre de Sétif, il a été noté, qu'entre 2006 et 2010, le CCR a touché 9.9/ 10⁵ habitants et a présenté 9.6% et 8.5% d'atteinte chez l'homme et la femme respectivement (Hamdi Cherif et al., 2014).

1.3 Etapes de la progression tumorale dans le CCR

Le CCR est une tumeur maligne de la muqueuse du côlon ou du rectum. La première étape dans le développement d'un CCR est l'apparition à la surface de l'épithélium du côlon ou du rectum, d'une hyperprolifération cellulaire. Sur le plan morphologique, cette anomalie de la muqueuse colique, mieux vue après application de colorant comme le bleu de méthylène

à 0,2%, traduit un aspect élargi et déformé des cryptes appelées foyers de cryptes aberrantes (FCA) (D. Heresbach et N. Heresbach *Le Berre*, 2003).

Ces FCA existent sous la forme d'une hyperplasie, c'est à dire une augmentation de volume cellulaire ou une augmentation du nombre de ses cellules ou d'une dysplasie caractérisée par une malformation ou déformation résultant d'une anomalie du développement d'un tissu (Stevens *et al.*, 2007). La prolifération cellulaire anormale tend à l'accumulation des cellules dans la muqueuse et aboutit à la formation d'un polype.

Le terme « polype » fait référence à une masse discrète qui fait saillie dans le lumen intestinal. Dans la majorité des cas, le CCR provient d'un polype adénomateux dégénéré. Un adénome est une lésion néoplasique qui peut évoluer vers un cancer. La prévalence rapportée des polypes adénomateux sur la base des données de dépistage par colonoscopie augmente avec l'âge et atteint 30% des sujets à partir de 65 ans (Winawer *et al.*, 2007).

Certains types de polypes adénomateux ou adénomes peuvent, avec le temps, se transformer en cancer : 10 % des adénomes atteignent 1 cm de diamètre, et, parmi ceux-ci, environ un quart deviennent des cancers (Bouvier *et al.*, 2002). Ce processus se développe habituellement sur une dizaine d'années. Le développement d'un adénocarcinome est d'abord superficiel intra-épithélial puis intra muqueux sans franchissement de la lame basale et est désigné sous le terme « *in situ* », stade précoce de cancer. Le carcinome invasif s'applique aux lésions entraînant une rupture de la lame basale et dépassant la musculaire muqueuse. Le cancer va ensuite infiltrer progressivement en profondeur les différentes parois du côlon ou du rectum et diffuser dans les ganglions lymphatiques puis à distance.

La séquence côlon-adénome-adénocarcinome est devenue bien caractérisée au plan histologique et génétique. La plupart des cancers colorectaux résultent d'adénomes sporadiques et de la transformation maligne d'un polype adénomateux bénin, mais quelques-uns résultent d'adénomes familiaux ou de syndromes de l'intestin irritable.

1.4 Stades et classification

Une fois le cancer colorectal est diagnostiqué, le choix de la stratégie thérapeutique se base sur la classification TNM « Tumor Node Metastasis » soit « tumeur, ganglions lymphatiques, métastases » de l'union internationale, AJCC/UICC (American Joint Committee on Cancer/Union internationale Contre le Cancer) (Edge *et Compton*, 2010). Cette classification dépend de trois critères pour mesurer l'étendue d'un cancer colorectal :

- La taille et la profondeur de la tumeur ;
- L'atteinte ou non des ganglions lymphatiques et le nombre de ganglions atteints ;
- La présence ou non de métastases.

La classification TNM reste un des facteurs pronostiques majeurs (*Plótár et al., 2013*). Elle a été créée sous l'impulsion de Pierre Denoix, un chirurgien d'origine française (*Denoix, 1946*) et elle est continuellement mise à jour. La dernière édition est celle de 2010 (Annexe I, Tableau A) (*Scoazec et Sabourin, 2010*).

Les CCR sont répartis en 4 stades allant de I à IV. Schématiquement, les stades I et II sont caractérisés par un envahissement de la paroi intestinale allant de la sous muqueuse à la totalité de la paroi; le stade III par un envahissement ganglionnaire proche de la tumeur ; le stade IV par la présence d'une dissémination métastatique à distance.

1.5 Facteurs de risque et facteurs protecteurs

1.5.1 Age et sexe

L'atteinte par le cancer colorectal est rare avant l'âge de 50 ans où il ne représente que 6% (*Rougier P, 2004*), alors qu'elle est 15 fois plus élevée chez les adultes de plus de 50 ans que chez ceux de 20 à 49 ans (*SEER, Stat Database 2007*). Dans l'ensemble, 90% des nouveaux cas et 94% des décès surviennent chez des personnes de plus de 65 ans. L'incidence augmente rapidement avec l'âge, en effet la proportion des cas diagnostiqués double chaque décennie entre 40 et 70 ans dans les deux sexes (*Viguier J et al., 2003*).

L'âge moyen du diagnostic est de 69,5 ans chez l'homme et de 72,8 ans chez la femme (*Viguier J et al., 2003*). A travers l'Ouest algérien, l'étude de Meddah et al.(2009) montre que l'âge moyen global de l'atteinte de CCR avoisine les 53,5 ans chez les deux sexes confondus. L'étude de Brenner et al. (2007) montre que les femmes attrapent un CCR 4 à 8 ans plus tard que les hommes. Il existe une légère prédominance masculine avec un sex-ratio de 1,5 (*Rougier P, 2004*). A partir de ces différentes données, une évaluation de niveaux de risque a été proposée :

- **Sujets à risque moyen**

Ce sont les personnes de plus de 50 ans sans facteur prédisposant connu au cancer colorectal. Environ 75% des cancers colorectaux sont dits « sporadiques » (*Chan et al., 2011*).

- **Sujets à risque élevé**

Ce groupe comprend les sujets aux antécédents personnels de cancer colorectal ou d'adénome, et aux antécédents familiaux de CCR ou d'adénome de plus de 1 cm chez un ou plusieurs parents au premier degré. Les personnes atteintes d'une maladie inflammatoire chronique de l'intestin étendue sont également des sujets à risque élevé de développer un cancer colorectal (*Kirkegaard et al., 2010*).

- **Sujets à risque très élevé**

Ce niveau de risque est représenté par les personnes appartenant à une famille atteinte de cancers à transmission héréditaire autosomique dominante (*Chan et al., 2011*).

1.5.2 Habitudes et mode de vie

- **Régime alimentaire :** Le régime alimentaire est le facteur de risque environnemental le plus important du cancer colorectal. Plusieurs études ont confirmé qu'une forte consommation de viande rouge et une alimentation riche en graisses animales sont associées à un risque significatif accru de cancer colorectal (*Larsson et Wolk, 2006*) (*Kirkegaard et al., 2010*) (*Chan et al., 2011*), alors qu'une alimentation riche en fruits, en légumes et en céréales diminue le risque de ce cancer (*Kirkegaard et al., 2010*). Il est à noter que le calcium d'origine alimentaire ou en suppléments aurait un effet protecteur. L'effet de la vitamine D semble avoir une diminution modérée de la récurrence des adénomes colorectaux après suppléments calciques (*Lewis et al., 2016*) ;
- **Sédentarité :** Les personnes physiquement inactives courent un risque plus élevé de développer un CCR, et ceci, indépendamment de leur poids. Une augmentation de l'activité physique peut en réduire le risque (*Kirkegaard et al., 2010*) ;
- **Obésité :** Une augmentation de l'IMC (Indice de Masse Corporelle) est considérée comme un facteur de risque indépendant pour le cancer colorectal (*Adamowicz et al., 2015*) ;
- **Tabagisme :** Il augmente modérément mais significativement la taille de l'adénome et le risque d'un CCR, néanmoins lorsqu'il est important et dure depuis longtemps. Plusieurs chercheurs ont noté une relation significative entre le tabagisme et la formation ainsi que l'agressivité des adénomes (*Otani et al., 2003 ; Lee et al., 2016*). De nombreuses substances toxiques présentes dans la fumée de cigarette peuvent pénétrer dans l'organisme, puis s'y propager et atteindre la muqueuse intestinale, où elles risquent d'endommager l'ADN cellulaire (*Botteri et al., 2008*). En effet, la nicotine contenue dans la cigarette pourrait participer au développement du CCR et sa progression par la stimulation de la prolifération cellulaire et l'inhibition de l'apoptose des cellules T8 ainsi que la surexpression des gènes impliqués dans la voie PI3K/AKT tels que *Akt* et *ERK* (*Cucina et al., 2012*).
- **Boissons alcoolisées :** La consommation d'alcool augmente le risque de cancer colorectal de 9% dès un verre par jour. Le risque dépend de la quantité totale d'alcool consommée et non du type d'alcool (*Rehm, 2011 ; INCA, 2013*). L'alcool semble intervenir dans une étape précoce de promotion du cancer et de la croissance de l'adénome. L'étude réalisée en Côte d'Or a mis en évidence une liaison spécifique de l'alcool avec le risque d'adénome de taille supérieure à 1cm (*Boutron et al., 1995*) ;

- **Anti inflammatoires** : Il a été suggéré que la prise à long terme de médicaments anti-inflammatoires tels que l'aspirine pourrait réduire la survenue récurrente de polypes colorectaux non héréditaires (*Burn et Sheth, 2016*). Il a ainsi été montré que l'aspirine réduisait le risque de cancer colorectal chez les personnes atteintes du syndrome de Lynch (SL), et favorisent la régression des polypes colorectaux chez les patients atteints de Polypose adénomateuse familiale (PAF), mais des recherches supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ces résultats de manière définitive (*Adamowicz et al., 2015*).

1.5.3 Antécédents de maladies

L'exploration des antécédents permet d'obtenir des informations au sujet de troubles dont ont souffert les parents directs du patient. Cette exploration est extrêmement utile car, outre le fait que certaines maladies sont transmises selon les lois de la génétique, la présence de certaines d'entre-elles chez les parents peut accroître statistiquement le risque de CCR chez les descendants. Les antécédents les plus connus sont repris ci-après :

- **Le diabète de type 2** augmente le risque de développer une tumeur dans le gros intestin, indépendamment du fait que la personne soit en surpoids ou non (*Beauchemin, 2011*).
- **Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)** : La maladie de Crohn et la colite ulcéreuse sont associées à un risque accru de cancer colorectal (*Triantafyllidis et al. 2009*). En effet, les patients affectés ont environ dix fois plus de risque de développer ce type de cancer (*Itzkowitz and Yio, 2004 ; Terzić et al., 2010*). Les cellules inflammatoires produisent des médiateurs, tels que des radicaux libres, des prostaglandines et des cytokines, qui participent aux différentes phases de la réaction inflammatoire. L'exposition chronique à ces médiateurs de l'inflammation engendre une augmentation de la prolifération cellulaire, une mutagenèse, une activation d'oncogènes et de l'angiogenèse (*Shacter et Weitzman, 2002*). Par ailleurs, les tissus enflammés constituent un environnement idéal pour la sélection et la croissance des cellules cancéreuses colorectales (*Beauchemin, 2011*).
- **Antécédents de polypes colorectaux** : Les polypes sont considérés comme des lésions précancéreuses. Lorsque des polypes sont découverts dans le gros intestin, par exemple lors d'un examen de dépistage, ils doivent être supprimés pour les empêcher de se transformer en cancer (*Flejou, 2008*).
- **Antécédents personnels de CCR ou d'autres types de cancer** : Les antécédents d'autres tumeurs, comme les lymphomes, le cancer du testicule ou le cancer de l'endomètre, augmentent le risque de développer un cancer colorectal (*Capocaccia et*

al., 2015 ; Chouhan et al., 2016 ; Trabert et al., 2016). Même si la tumeur a été complètement retirée durant le traitement précédent, il y a un risque accru de développer une nouvelle tumeur dans une autre partie du gros intestin ou du rectum.

- **Antécédents familiaux de cancers :** Le risque de développer un cancer colorectal est augmenté si un parent du premier degré présente un cancer colorectal. Cela peut être dû à des facteurs génétiques héréditaires ou à des facteurs environnementaux communs. Il a été récemment démontré que les parents de patients atteints de carcinome d'origine inconnue sont exposés à un risque accru de plusieurs néoplasmes malins, y compris le cancer du côlon (Samadder et al., 2016).

2. Carcinogenèse colorectale

La carcinogenèse colique est un processus d'initiation et de transformation de cellules normales. Il est constitué de multiples étapes nécessitant l'accumulation d'anomalies génétiques héritées et acquises suite à des modifications génétiques et épigénétiques de l'ADN (Tariq et Ghias, 2016). L'instabilité génétique est une caractéristique des cellules cancéreuses. Les déterminants de cette instabilité génétique sont en majorité liés à des mécanismes cellulaires fondamentaux, comme le cycle cellulaire, la réplication ou la réparation de l'ADN. A ces mécanismes s'ajoutent les modifications épigénétiques qui sont transmises de cellules mères à cellules filles.

Trois mécanismes différents ont été individualisés dans la cancérogenèse colorectale :

- L'instabilité chromosomique (CIN: Chromosomal instability) ;
- L'instabilité des microsatellites :(MSI: Microsatellite instability ou RER: Replicative error) ;
- Les modifications épigénétiques : (CIMP : CpG Island Methylator Phenotype).

2.1 Instabilité chromosomique

Elle est présente dans environ 80 à 85% des tumeurs colorectales sporadiques (Laurent-Puig et al., 2010). Le phénotype d'instabilité chromosomique dit CIN ou perte d'hétérozygotie, LOH+ (Loss of Heterozygoty) est caractérisé le plus souvent par des pertes alléliques sur plusieurs chromosomes. Ce remaniement chromosomique a été mis en évidence par des études de LOH, d'hybridation génomique «CGH array».

Plusieurs formes d'instabilités chromosomiques ont été observées :

- des amplifications des gènes qui se produisent rarement dans les cancers colorectaux mais qui apparaissent jouer un rôle dans la transition des étapes de certains CCR.

- des altérations dans le nombre de chromosomes, aneuploïdie. Les cellules aneuploïdes sont totalement aberrantes : elles possèdent un grand nombre de chromosomes surnuméraires (47, 50, 60, parfois plus) et comprennent des mutations, qui les rendent le plus souvent incontrôlables. Ce phénomène est connu depuis une vingtaine d'années comme un processus pathogène fondamental de la tumorigenèse (*Offerhaus et al., 1992 ; Piard et al., 2002*), Cependant une étude anglaise récente (*Burrell et al., 2013*) propose des hypothèses expliquant ce phénomène : «avant qu'une cellule ne se divise, le génome est répliqué pour transmettre une copie intégrale à chaque cellule fille, mais dans ces cellules aneuploïdes, ce processus est bloqué ou nettement ralenti, provoquant des cassures et des anomalies dans l'ADN, ainsi que la mauvaise répartition des chromosomes entre les cellules descendantes». En étudiant le génome de ces cellules chez des patients atteints de CCR, cette équipe à Londres a constaté que trois gènes nouvellement décrits seraient à l'origine de ces dysfonctionnements. Ils sont situés sur le bras long du chromosome 18. Les chercheurs montrent que ces trois gènes sont absents dans plus de la moitié des cancers colorectaux, ainsi que dans 80% des cas dans les cellules les plus susceptibles d'induire ces cancers et de développer des résistances aux traitements (*Burrell et al., 2013*).
- des réarrangement chromosomiques avec des pertes récurrentes de segments chromosomiques qui concernent en particulier les bras courts du chromosome 17, ceux du chromosome 8 et du chromosome 1 ; les bras longs du chromosome 18 et chromosome 5 et ceux du chromosome 22 ; ces régions renferment des gènes majeurs tel que : *APC* (Adenomatous polyposis coli) en 5q ; *p53* en 17p ; *DCC* (Deleted in Colon Cancer), *SMAD2* et *SMAD4* (SMA and MAD-related protein 2, 4) en 18q ; *MCC* (Mutated in Colon Cancer) en 5q (*Thiagalingam et al., 2001 ; Boige et al., 2004 ; Karoui et al., 2007*).

Ces réarrangements ont pour conséquence une association d'altérations au niveau d'un gène : perte allélique et mutation ponctuelle inactivatrice délétère au niveau de l'allèle conservé, se traduisant par une perte de la fonction de ce gène conduisant à un cancer.

Bien que l'origine de cette instabilité chromosomique est mal connue, il a été montré que 75% des CCR ont des mutations ou LOH sur le gène *APC*. La plupart de ces mutations sont regroupés dans la région entre les codons 1282 et 1581 (*Tariq et Ghias, 2016*). Les mutations sur le gène *APC* aboutissant à la formation du codon stop provoquant ainsi un défaut de ségrégation des chromosomes qui peuvent favoriser la CIN (Fig. 5).

Cependant l'inactivation du gène *APC* n'est probablement pas suffisante pour induire l'instabilité chromosomique, d'autres gènes sont vraisemblance impliqués, en particulier ceux participant au contrôle du fuseau mitotique lors de la division cellulaire (*Fodde et al., 2001 ; Christie et al., 2013*).

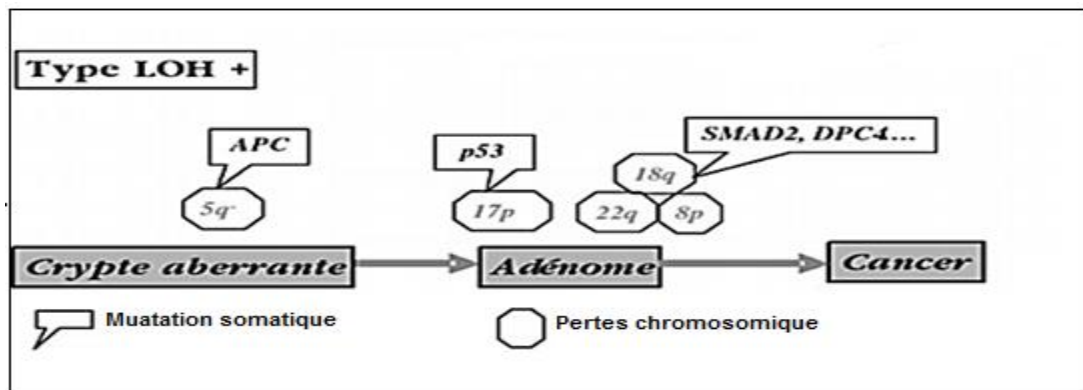


Figure 5 : La voie de l'instabilité chromosomique (*Vilar et Gruber, 2010*).

2.2 Instabilité génétique

Ce mécanisme est retrouvé dans environ 15% des CCR (*Laurent-Puig et al., 2010 ; Pino et Chung, 2011*). Il se caractérise par une instabilité des loci microsatellitaires dit un phénotype MSI ou RER. Les microsatellites sont des séquences d'ADN constituées de motifs de 1 à 5 pb répétées en tandem. Ces séquences sont réparties sur l'ensemble du génome et font l'objet d'un polymorphisme inter-individuel selon les nombres variables de répétitions. Ces insertions ou délétions de quelques nucléotides définissent l'instabilité microsatellitaire (Fig.6).

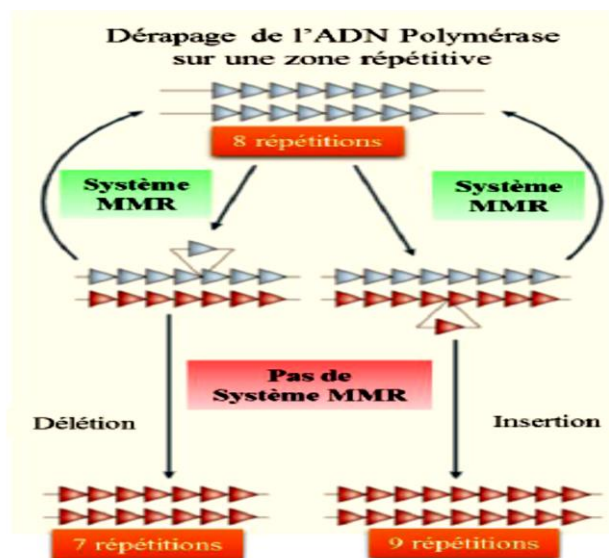


Figure 6 : Mécanismes de l'instabilité microsatellitaire (*Umar et al., 2004*).

L'ADN Polymérase dérape plus fréquemment au niveau de séquences répétées, créant temporairement des boucles d'insertions ou de délétions. Lors de la réplication suivante, en l'absence d'un système MMR efficace, il en résulte un raccourcissement ou une elongation de la séquence.

La plupart des microsatellites sont situés dans des régions non codantes de l'ADN et une mutation de ces séquences aura généralement peu de conséquences pour la cellule. Cependant, on estime qu'environ 20 % des gènes humains possèdent des microsatellites dans leur région codante et sont potentiellement sujets à des mutations (*Boland et al., 2007*). Parmi eux, les gènes impliqués dans la régulation de la croissance cellulaire (*TGFRII*, Transforming Growth Factor Beta Receptor II) qui possède une séquence poly-A₁₀, l'apoptose (*BAX*, Bcl2 associated X protein: poly-G₈) et les facteurs de transcription *TCF-4* (T-cell factor 4) ou *E2F4* sont souvent retrouvés mutés dans les cancers MSI+ (*Duval and Hamelin, 2002*).

Cette instabilité est la conséquence de mécanismes mutationnels particulièrement susceptibles d'affecter ou de générer des microsatellites tels que : les erreurs de réplication, les erreurs au cours de la transcription, les erreurs au cours de la recombinaison, ainsi que les insertions d'éléments mobiles du type Alu chez les primates.

Il existe un mécanisme de réparation de l'ADN capable de juguler l'instabilité des microsatellites, c'est le système de réparation des mésappariements : MMR (Mismatch Repair) qui permet d'atténuer l'impact des mutations de microsatellites codants (*Kunkel et Erie, 2005*). Ce système peut être inactivé en cas de mutation germinale associée à une mutation somatique (forme héréditaire de CCR : Syndrome de Lynch) dans 3% des cas (*Peltomäki et al., 1993*) et le reste par méthylation du promoteur de *MLH1* qui inactive sa transcription (forme sporadique)(*Chapelle et Hampel, 2010*).

L'inactivation du système MMR conduit à l'accumulation de mutations secondaires qui vont inactiver de nombreux gènes aboutissant à la transformation de la cellule.

Contrairement aux tumeurs avec un phénotype CIN, les cellules MSI sont le plus souvent diploïdes et on retrouve moins fréquemment des mutations sur *APC* ou *TP53* (*Olschwang et al., 1997*).

2.3 Modification épigénétique

Plusieurs phénomènes épigénétiques semblent d'être impliqués dans une proportion importante dans la carcinogenèse des tumeurs colorectales, cette voie de carcinogénèse intéresse les tumeurs du phénotype CIMP identifié pour la première fois en 1999 (*Toyota et al., 1999*). Au sein du génome, existent des régions riches en di nucléotides CpG, appelées îlots CpG. Ils représentent 1-2% du génome et sont présents dans les régions 5' d'environ 40% des gènes.

Ces îlots sont retrouvés dans les régions promotrices pour la moitié des gènes, normalement maintenues sous forme non méthylé.

Ces îlots CpG peuvent inactiver un gène en empêchant sa transcription si leur cytosine est méthylée (Fig. 7).

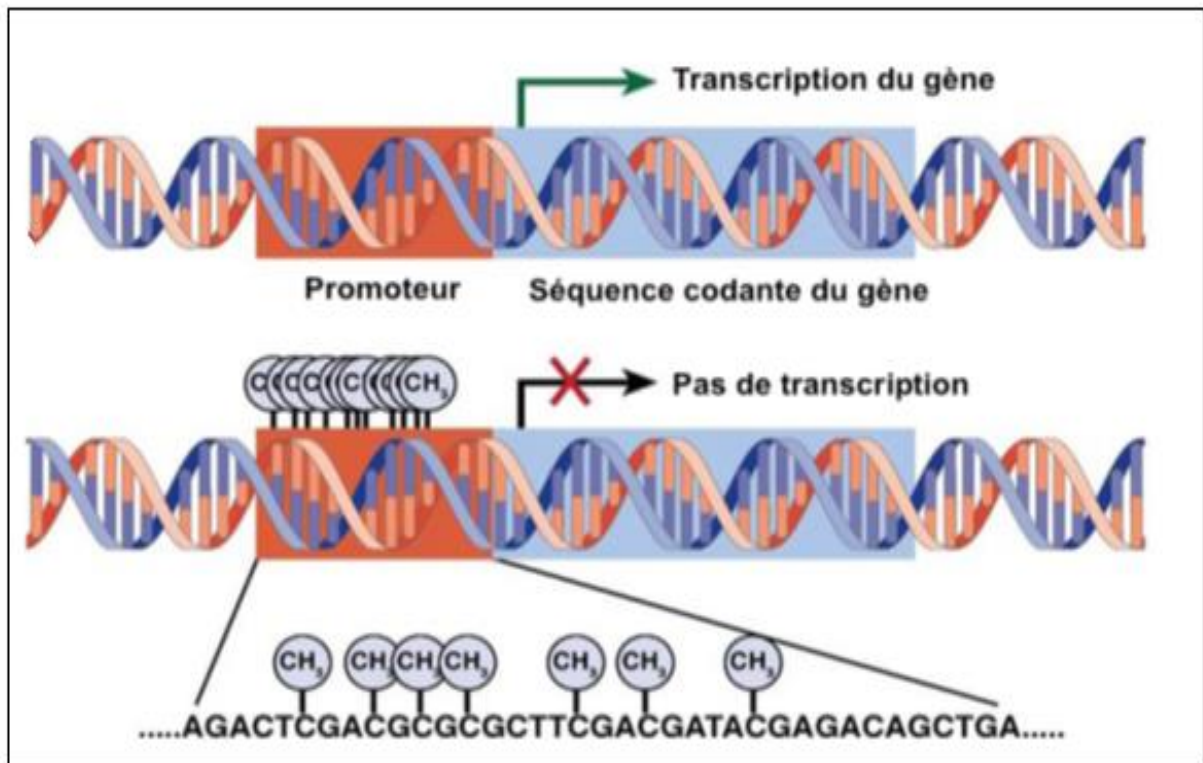


Figure 7: Mécanisme d'inactivation de la transcription (Leggett and Whitehall, 2010).

Le processus de cette méthylation est réalisé par des DNmt (DNA méthyl-transferase) qui induisent l'addition enzymatique d'un groupement méthyl sur le carbone en 5' d'une cytosine à partir d'un donneur universel de méthyle pour l'organisme : SAM (S-adenosyl-méthionine).

Deux événements majeurs et indépendants semblent être étroitement liés et impliqués dans la tumorigenèse : l'hypométhylation globale de l'ADN et l'hyperméthylation des promoteurs.

- **L'hypométhylation** du génome de polypes adenomateux et hyperplasiques se caractérise par une baisse de 20% à 60% de la teneur en 5-méthyle cytosine par rapport à des cellules normales (Gama-Sosa et al., 1983 ; Wong et al., 2007). Si les mécanismes responsables de cette hypométhylation ne sont pas clairement définis, ses conséquences sont, par contre mieux connues, entraînant :
 - activation des éléments transposables (LINE, SINE, Retrovirus qui sont normalement méthylés et réprimés) responsables d'une instabilité génomique (Tariq et Ghias, 2016) ;
 - l'augmentation des recombinaisons homologues responsables d'un taux plus élevé de mutations par réarrangement génétiques. Activation d'oncogène comme *H-ras*, *C-myc* ;

- la perte de l'empreinte de *IGF2* (Insuline-like Growth Factor2) est retrouvée dans près de 40% des tumeurs du CCR, ce qui conduit au phénotype MSI chez les jeunes patients (*Cui et al., 2002 ; Tian et al., 2012*).

- **L'hyperméthylation** se produit sur les ilots CpG situés au niveau des promoteurs. Dans le CCR, le phénomène le plus fréquent est l'hyperméthylation des gènes suppresseurs de tumeur qui est responsable de l'apparition de phénotype CIMP (*Issa, 2004 ; Tariq et Ghias, 2016*).

La méthylation aberrante des ilots CpG pourrait s'expliquer soit par une surexpression des DNmt ou d'une altération des facteurs protégeant normalement l'ADN de cette méthylation comme les HAT (Histone Acétylase Tansferase) qui maintient l'ADN dans un état transcriptionnellement actif (*Wong et al., 2007*).

Il existe 2 types de méthylation de *ново* :

- celle qui apparait au cours du vieillissement physiologique, c'est la méthylation de type A (ARM : Age-related méthylation), touchant, en fonction de l'âge, des cellules de l'épithélium normal du côlon, au niveau de la région promotrice des gènes impliqués dans la régulation de la croissance et/ou la différenciation de ces cellules, cette méthylation pourrait induire dans des conditions favorisantes la transformation maligne de ces cellules ;
- une méthylation retrouvée uniquement dans les cellules tumorales, elle n'est jamais observée dans les cellules de la muqueuse normale. C'est la méthylation cancer spécifique (Cancer -specifique methylation) ou méthylation de type C. Le fait que la méthylation de type C puisse affecter de nombreux gènes, a conduit à proposer le phénotype CIMP.

Le mécanisme du phénotype CIMP est encore en cours d'élucidation mais certains gènes semblent particulièrement sensibles pour le définir. En effet les gènes *hMLH1*, *RUNX3*, *IGF2*, *MINT 1*, *MINT 31*, *TIMP 3* et *HLTF* ont été retrouvés méthylés sur leurs promoteurs en cas de phénotype CIMP et pourraient devenir le panel des gènes à étudier (*Tariq et Ghias, 2016*).

La méthylation du gène *MLH1* responsable d'une inactivation du système MMR et donc d'un phénotype MSI rentre également dans ce cadre expliquant la possibilité de tumeur MSI+/CIMP+.

La plupart des CCR sporadiques présentant un phénotype MSI survenant chez des individus âgés, sont associés à des mutations du gène *BRAF* et à un phénotype CIMP+ (*Parsons et al., 2012*)

La figure 8 présente un récapitulatif de tous les changements moléculaires, génétique et épigénétiques impliqués dans la progression de CCR.

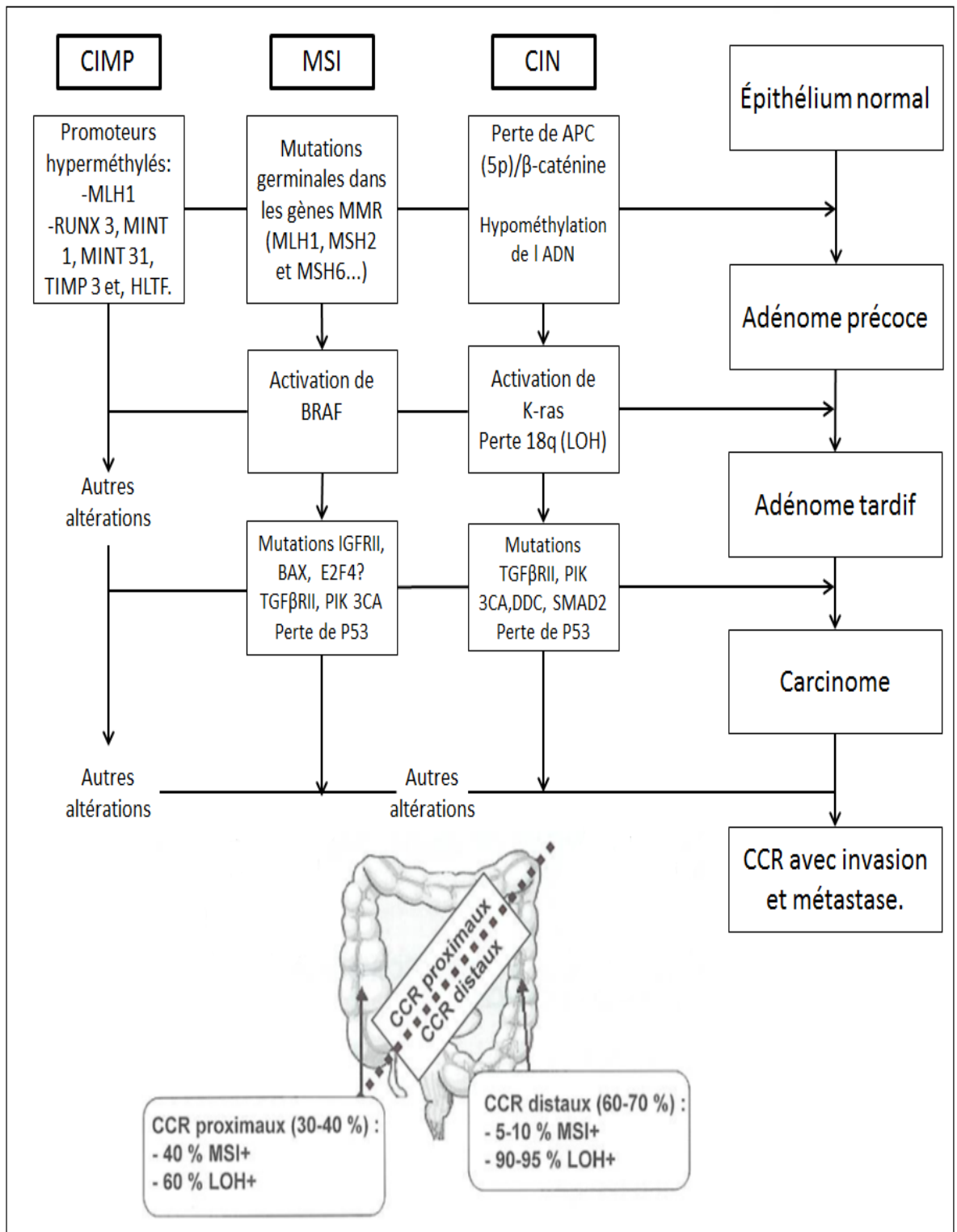


Figure 8 : Les changements moléculaires, génétique et épigénétiques en respectant la progression de CCR (Boige et al., 2004 ; Vilar et Gruber, 2010 ; Tariq et Ghias, 2016).

2.4 Interaction entre mécanismes

Ces mécanismes ne sont pas exclusifs comme le démontre la figure 9 :

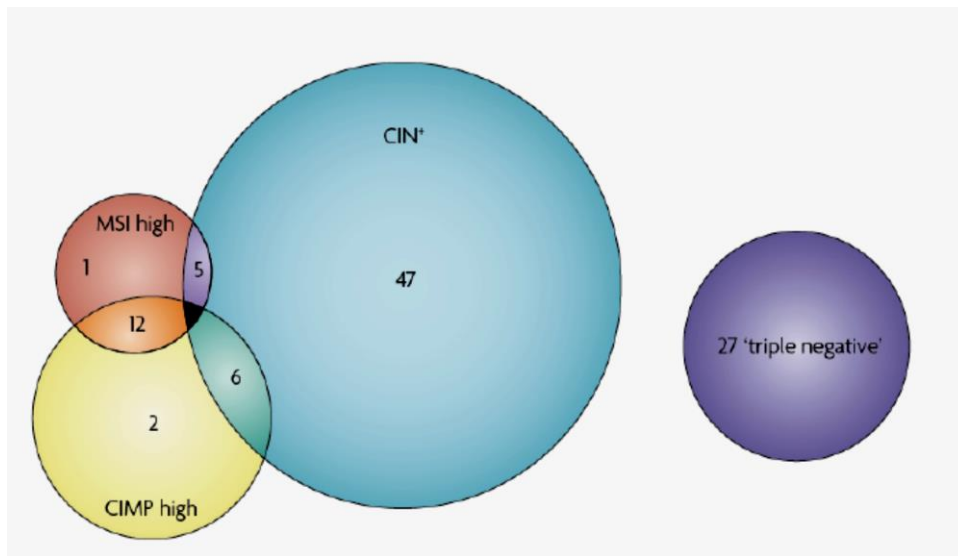


Figure 9 : Intrication des différentes voies de la cancérogenèse. Les valeurs sont des pourcentages (Walther et al., 2009).

La connaissance des mécanismes permet d'améliorer la compréhension de la cancérogenèse colorectale. Cette dernière dépend en fonction du type histologique du polype à l'origine du cancer (Fig.10). La voie du CIMP est responsable de CCR à partir d'adénomes festonnés alors que les adénomes tubuleux sont le plus souvent liés au mécanisme d'instabilité chromosomique. Ces mécanismes ont enfin également un impact sur le pronostic.

Les CCR MSI+ ont un meilleur pronostic que les CCR CIN+ et les patients présentent moins fréquemment des métastases à distance. Deux méta-analyses ont observé un hazard-ratio de décès de 1,45 pour les tumeurs CIN+ et de 0,65 pour les MSI (Walther et al., 2008). Certains mécanismes sont également associés à des résistances à la chimiothérapie ou à certaines biothérapies (Fig.10).

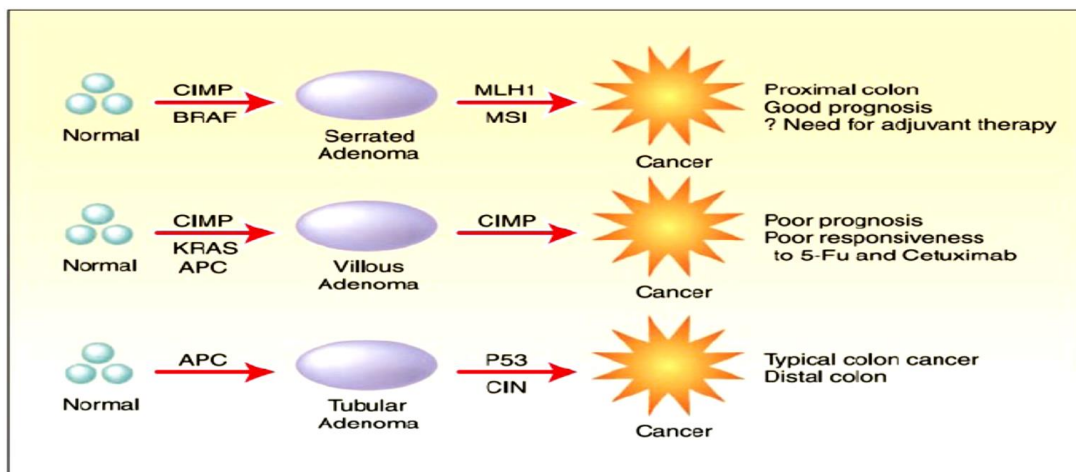


Figure 10 : Voies de la cancérogenèse (Issa, 2008).

Ces mécanismes vont modifier le fonctionnement de certaines voies de signalisation cellulaires et entraîner la cellule vers un phénotype tumoral.

2.5 Voies de signalisation cellulaire impliquées

La cancérogénèse étant un processus de dérèglement du cycle cellulaire, tout gène impliqué dans chacune de ses étapes est un oncogène potentiel. Les anomalies génétiques liées aux cancers colorectaux touchent des gènes impliqués dans les voies de signalisation cellulaires qui assurent de nombreuses fonctions : le contrôle et la transmission des signaux de croissance, de survie cellulaire, d'invasion dans le cancer, de l'angiogenèse, de l'adhésion et la différenciation cellulaire, ainsi que la résistance à l'apoptose (*Lièvre et Laurent-Puig, 2010*).

Il existe plusieurs voies de signalisation qui sont fréquemment altérées :

- les voies intracellulaires qui sont le résultat de l'activation des récepteurs à tyrosine kinase comme l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) ou HER-1 (Human Epidermal Receptor -1) ;
- la voie Ras (Relative Allele Signal)/MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) ;
- la voie PI3K (Phosphatidyl Inositol 3 Kinase)/AKT (AKR T cell lymphoma).

Et les autres voies de signalisation qui ne sont pas liées à l'EGFR :

- la voie WNT (Wingless-type MMTV integration site family member) (APC/ β caténine) ;
- la voie TGF β (Transforming Growth Factor Beta) /SMAD (SMA and MAD-related protein 4) ;
- la voie P53 (Protein 53).

2.5.1 Voies de signalisation liées à l'EGFR

• Voie de Ras/Raf/MAPK

La cascade Ras/Raf/MAPK est parmi les plus importantes voies de la transmission des signaux extracellulaires dans laquelle les protéines RAS jouent un rôle primordial. Elles font partie de la famille des GTPases. Il en existe 4 isoformes codées par trois gènes différents : *KRAS* (Kirsten RAS), *HRAS* (Harvey RAS) et *NRAS* (Neuroblastoma RAS). Leur activation est déclenchée majoritairement par les récepteurs membranaires à tyrosine kinase dont l'EGFR (*Laurenty, et al., 2014*).

Le complexe GRB2/SOS active la protéine RAS dans la voie RAS/MAPK et la protéine PI3K dans la voie PI3K/AKT après phosphorylation de l'EGFR (*Lièvre et Laurent-Puig, 2010*). SOS (Son Of Sevenless) recrute et active RAF1, qui à son tour phosphoryle et active MEK (MAPK/ERK kinase) et celle-ci phosphoryle ERK1 et ERK2 qui se dimérisent et sont

transloquées dans le noyau, où elle phosphorylent la famille ETS des facteurs transcriptionnels (*Scaltriti and Baselga, 2006 ; Prior and Hancock, 2012*) entraînant un signal de prolifération, la résistance à l'apoptose, l'angiogenèse, l'invasion et la diffusion métastatique (Fig.11).

- **Voie de PI3K/AKT**

Cette voie de signalisation peut être activée soit directement par l'EGFR activé soit par l'intermédiaire de la protéine Ras activée. Elle joue également un rôle important dans l'homéostasie cellulaire par sa fonction de régulation de plusieurs fonctions cellulaires, dont la migration, l'apoptose, la prolifération cellulaire et l'angiogenèse.

L'activation de la voie PI3K/AKT entraîne la transformation de PIP2 à PIP3 qui recrute PDK-1 et AKT à la membrane ce qui active mTOR (mammalian target of rapamucine) responsable de la stimulation d'autres facteurs prolifératifs impliqués dans la transformation oncogénique, et le facteur de traduction EIF4E (Eukaryotic Translation Initiation factor4) ainsi la prolifération cellulaire et l'inhibition de l'apoptose (*Johnson et al., 2010*) (Fig.11).

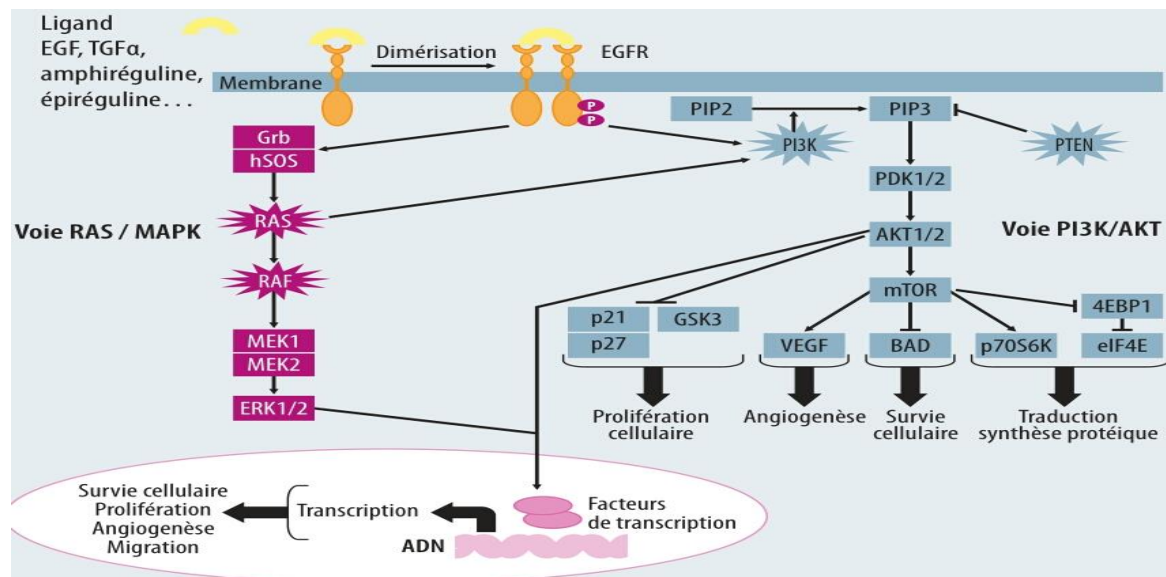


Figure 12 : Représentation schématique des voies RAS/MAPK et PI3K/AK (Lièvre et Laurent-Puig, 2010).

- **Implication des voies RAS/MAPK et PI3K/AKT dans le CCR**

La voie de signalisation Ras est dérégulée dans 30% des cancers. Cette dérégulation peut être induite soit par : une sur-activation de la voie de l'EGF qui est retrouvée dans un grand nombre de CCR (*Laurenty, et al., 2014*) ou par des mutations somatiques au niveau des gènes codant pour les protéines Ras. Dans les CCR, le gène *KRAS* est muté dans 40 à 50 % des cas (*Laurenty, et al., 2014*). Par ailleurs il est présent dans 60% à 90% des FCA hyperplasiques ou non dysplasiques (*Pretlow et al., 1992 ; Ochiai et al., 2014*).

Les mutations se trouvent dans l'exon 2 du gène *KRAS*, le plus souvent au niveau des codons 12 et 13 et là, sont retrouvées dans 50% des tumeurs de type CIN dont la mutation du codon

12 est souvent associée aux formes avancées et métastatiques de l'atteinte par le CCR (*Li et al., 2015*). Dans moins de 10 % des cas, ces mutations concernent l'exon 3 (codon 61) et l'exon 4 (codons 117 et 146) et elles surviennent très précocement au cours de la carcinogenèse colorectale, dès le stade d'adénome.

Quant aux deux autres formes du gène RAS : le gène *NRAS* est beaucoup plus rarement muté (environ 5 à 8 % des cas). Enfin, il n'est pas décrit de mutation du gène *HRAS* au cours des CCR.

Parmi les protéines de la famille RAF, Seule BRAF a été décrite comme mutée. C'est une protéine activée en aval de Kras. Environ 15% des CCR présentent des mutations sur BRAF. Dans plus de 95 % des cas, il s'agit d'une mutation à type de transversion T > A, conduisant à une substitution d'une valine par un acide glutamique au niveau du codon 600 (V600E) au sein du domaine kinase de la protéine ; ce qui aboutit à une augmentation de l'activité kinase de ce gène. Cette mutation est mutuellement exclusive de mutations du gène *KRAS* (*De Roock et al., 2010*) ceci pourrait s'expliquer par l'implication de chacune d'elles comme mutation « driver » activatrice de la même voie de signalisation. Elle est plus fréquente dans les tumeurs de localisation proximale (25 à 30 %) que distale (moins de 5 %) (*Thiel et Ristimäki, 2013*). La mutation *BRAF V600E* est observée principalement sur 18.7 % des CCR sporadiques avec phénotype MSI et CIMP+ (*Poynter et al., 2008*). En revanche, elle n'est jamais observée en cas de mutation germinale sur un gène MMR dans le cadre d'un syndrome de Lynch (*Kambara et al., 2004*).

Les mutations de différents composants de la voie PI3K/AKT sont très fréquentes dans la majorité des cancers dont le CCR telles que celles du gène *PIK3CA* codant pour la sous unité catalytique alpha de la PI kinase et celles sur l'un des acteurs de la voie, dont PTEN (Phosphatase and tensin homolog), Akt2 ou P85 (*Chin et al., 2014*). La surexpression cytoplasmique de phospho-AKT était plutôt corrélée avec un stade précoce de T et N du TNM, et l'absence d'invasion tumorale uniquement dans le groupe MLH1 négatif (*Lugli et al., 2006*).

2.5.2. Voie de signalisation non liées à l'EGFR

- **Voie WNT (*APC/β caténine*)**

Cette voie est importante dans la prolifération des cellules de la crypte du côlon. Elle constitue également une des étapes limitantes de l'initiation des CCR. La protéine principale de cette voie est la β caténine, codée par le gène *CTNNB1*, a une localisation intracellulaire variable dans la membrane, le cytoplasme et le noyau des cellules épithéliales.

La voie WNT (*APC/β caténine*) est dérégulée essentiellement par une perte de la protéine APC (*Fodde et al., 2001*). La protéine APC est impliquée dans de nombreuses voies

moléculaires essentielles au bon fonctionnement de la cellule. Elle régule la β -caténine et contrôle l'activation de nombreux gènes qui interviennent dans la prolifération cellulaire, maintient de l'intégrité du cytosquelette de la cellule et joue un rôle dans l'instabilité chromosomique (Cebtrat et Strzadala, 2001).

En absence du ligand Wnt, la protéine APC forme un complexe en association avec les enzymes GSK3B (Glucogen Synthétase Kinase 3 β), CSNK1A1 et l'axine (Christie et al., 2013). Dans ce complexe, la β -caténine est recrutée et phosphorylée ensuite, elle est adressée vers une dégradation *via* le protéasome. Le niveau de β -caténine cytoplasmique reste faible. L'expression des gènes cibles de la voie WNT est alors réprimée par l'association de Groucho aux facteurs de transcription TCF (T-cell factor) (Lo Muzio, 2001; Waterman, 2004).

En présence de ligand Wnt : il va se lier à son récepteur FRZ (Frizzled) et ses co-récepteurs (LRP5/LRP6). L'activation de ces récepteurs conduit à la phosphorylation de la protéine Dsh (dishevelled) qui par son association à l'axine, inhibe la GSK3 β de phosphoryler la β -caténine ce qui interrompt sa dégradation au protéosome. L'accumulation de β caténine libre dans le cytoplasme, qui va se transloquer dans le noyau pour former un complexe d'activation transcriptionnelle avec TCF et moduler la transcription des différents gènes de prolifération (Polakis,1999 ; Lo Muzio, 2001) (Fig. 12).

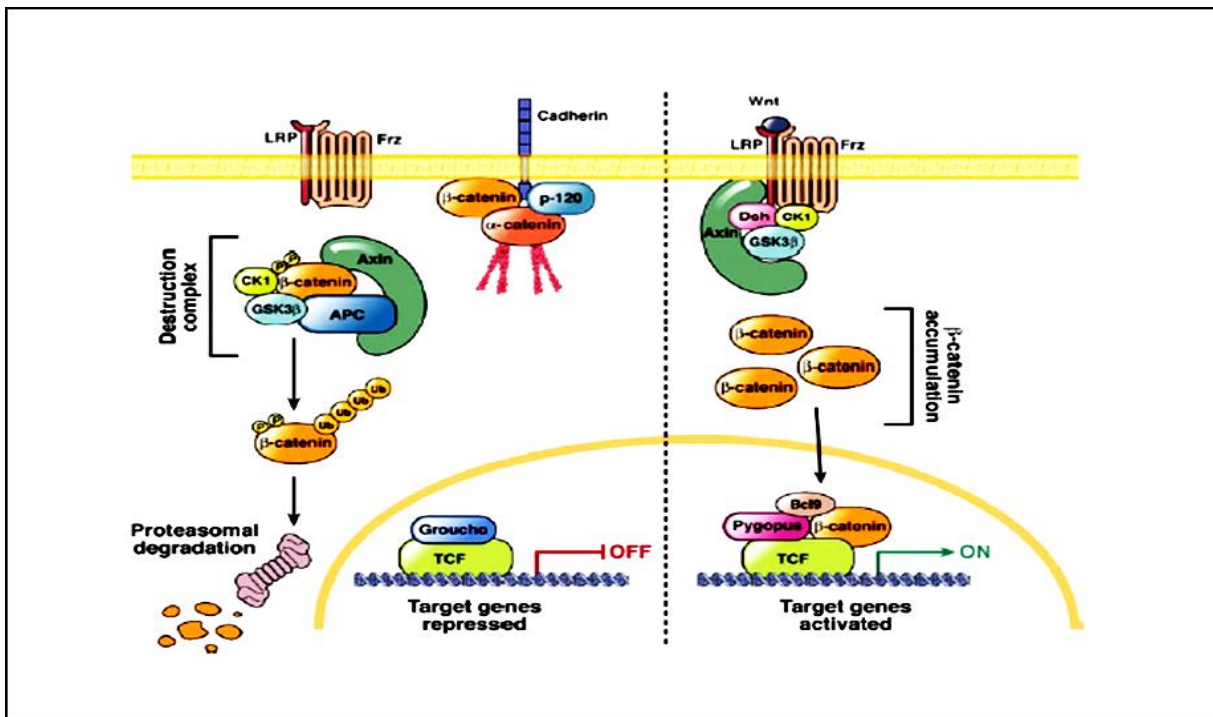


Figure 12 : Voie de signalisation Wnt : en l'absence du ligand Wnt / en présence du ligand Wnt (Pino et Chung, 2010).

Dans la cancérogenèse colorectale, une dérégulation de cette voie est associée à l'invasion tumorale et au développement métastatique :

- une mutation du gène *APC* est un événement essentiel de la tumorigenèse intestinale. Il est muté dans la plupart des CCR survenant à la fois dans les formes familiale (polypose adénomateuse familiale) (80%) (*Kinzler et al., 1991*), et dans les formes sporadiques de type LOH+ (*Tariq and Ghias, 2016*) ; La grande majorité de mutations de ce gène conduit à une protéine tronquée non fonctionnelle qui n'est plus capable de dégrader la β -caténine, ces mutations aboutissent donc à une accumulation de β -caténine libre capable d'émettre un signal de prolifération continu (*Clements et al., 2003*) ;

- dans 48% des mutations sur le gène β -caténine peuvent conduire aux CCR de phénotype CIN où le gène *APC* n'est pas muté (*Sparks et al., 1998*). Une mutation activatrice du gène β -caténine entraînant également une activation constitutive du complexe protéique β -caténine/TCF4 dans le cas des CCR MSI+ (*Duval et al., 1999*) ;

- les mutations activatrices avec décalage de cadre de lecture au niveau du gène du facteur de transcription TCF sont également responsables de 39% des cas de CCR MSI+ (*Duval et al., 1999*) tandis que le gène de l'axine est également muté dans les CCR MSI+ (*Narayan et Roy, 2003*).

• **Voie de TGF β**

Le TGF β se fixe à deux récepteurs transmembranaires TGFBR1 et TGFBR2, entraînant la phosphorylation de TGFBR1 par le TGFBR2. Le signal est ensuite transmis en intracellulaire via les voies SMAD et non-SMAD en activant notamment SMAD2, SMAD3. Leur phosphorylation permet aux protéines de migrer dans le noyau et de former un complexe avec SMAD4 (*Fearon, 2011*) où il participe à la transcription des gènes qui contrôlent négativement le cycle cellulaire (*Ikushima et Miyazono, 2010*) (Fig. 13).

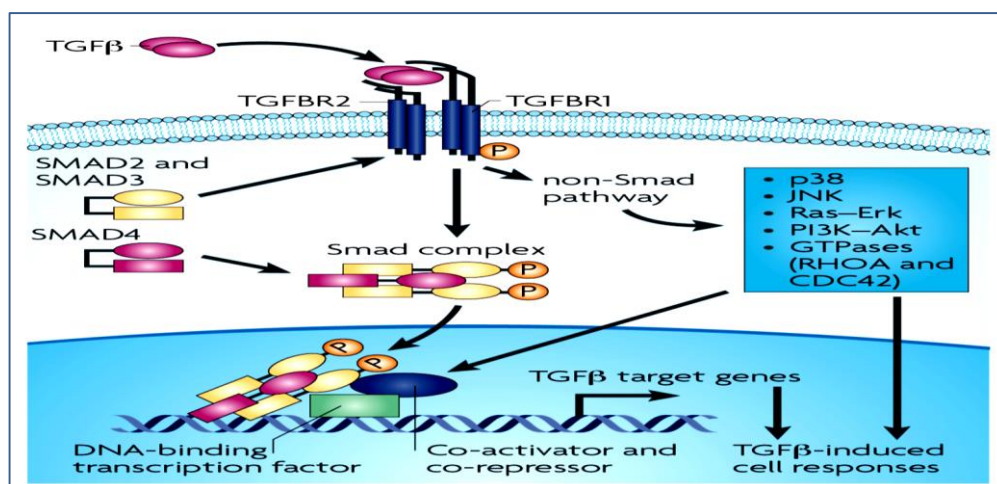


Figure 13: La voie de signalisation TGF β (*Ikushima et Miyazono, 2010*).

Cette voie de signalisation est ciblée de manière très évidente dans les CCR :

- le gène du TGFBR 2 a été trouvé muté dans 25% des CCR : il est inactivé dans 80% des cas du phénotype MSI+ (*Parsons et al., 1995*). La plupart de ces mutations conduisent à un décalage du cadre de lecture et à la synthèse d'un récepteur tronqué non fonctionnel (*Takayama et al., 2006*).

20 à 30% des CCR de phénotype CIN+ sont dérégulés par mutation inactivatrice des gènes SMAD2 et SMAD4 (*Takayama et al., 2006*) dont les mutations du gène SMAD2 ciblent 5% des CCR (*Takagi et al., 1998*), alors que celle du gène SMAD4 touchent 7% des CCR sans métastases et 35% des CCR métastatiques (*Miyaki et Kuroki, 2003*).

- **Voie de P53**

La P53 joue un rôle de gardien du génome (*Levine, 1997*) dont l'altération serait au centre de la transformation maligne d'une cellule. Le *p53* est un gène suppresseur de tumeur (GST) situé en 17 p13.1, code pour un facteur de transcription aux fonctions essentielles d'intégration de stress cellulaire, de régulation des programmes de division cellulaire et processus de l'apoptose en cas d'anomalie lors de la réplication de l'ADN.

Il engendre l'apoptose en induisant la transcription du gène pro-apoptotique *BAX*, si les altérations sont très importantes pour être réparées (*Pietsch et al., 2006 ; Naccarati et al., 2012*).

L'inactivation du *P53* a des conséquences dramatiques pour le maintien de l'intégrité du génome dans les cellules intestinales tumorales (*Chang et al., 1993*) :

- les mutations de *TP53* sont rapportées dans 50% des cas de cancer colorectal (*Rodrigues et al., 1990*) dont 60 à 80% sont de phénotype LOH+ (*Campo et al., 1991*) mais, moins fréquente dans les CCR MSI+. Le gène *p53* est invalidé à la fois par des pertes alléliques en 17p et des mutations ponctuelles sur l'autre allèle.

Il s'agit essentiellement de mutations ponctuelles qui surviennent de façon tardive au cours de la carcinogénèse colique (*Menendez et al., 2009*) ;

- en revanche, le gène *BAX* est le siège d'altération sur sa séquence répétée de 8 Guanine avec décalage du cadre de lecture du gène par insertion ou délétion d'une Guanine sur cette séquence, ces mutations sont présentes auprès de 30 à 50% des tumeurs MSI+ (*Lièvre et Laurent-Puig, 2004*).

3. Formes héréditaires du cancer colorectal

Les cancers colorectaux sont en majorité sporadiques. Des études de sujets apparentés et de jumeaux ont estimé qu'environ 30% de tous les cas de CCR sont de forme héréditaire de la maladie (*Brosens et al., 2015 ; Samadder et al., 2015*). Seuls 5% des cas sont associés à des mutations germinales de très haute pénétrance et des présentations cliniques bien caractérisées (*Brosens et al., 2015*). Les étiologies des 25% restants des CCR hérités ne sont pas complètement comprises (*Jasperson et al., 2010*). On distingue cinq groupes syndromiques familiaux de CCR dont la cause génétique est le plus souvent connue (Tab. 1).

Tableau 1 : Les différents syndromes de prédisposition héréditaire aux CCR. (*Davidson, 2007 ; Arvelo et al., 2015*).

SYNDROMES DE CCR FAMILIAUX	GÈNE INCRIMINÉ
Polyposes adénomateuse familiale (PAF)	
PAF sévère	<i>APC</i>
PAF atténuée	<i>APC</i>
Syndrome de Turcot	2/3 avec des mutations germinales d' <i>APC</i> 1/3 avec des mutations germinales des gènes MMR
Syndrome de Gardner	<i>APC</i>
Polypose associée à <i>MUTYH</i>	<i>MUTYH (MYH)</i>
Syndrome de polyposes Hyperplasiques	<i>K-RAS, B-RAF</i>
Syndrome de polypose Hamartomateuse	
Syndrome de Peutz-Jeghers (PJ)	<i>LKB1, STK11</i>
Polypose juvénile familiale (PJF)	<i>SMAD4, BNPRA, ENG</i>
Syndrome de Cowden	<i>PTEN</i>
Syndrome de Bannayan-Ruvalcaba-Riley (BRR)	<i>PTEN</i>
Syndrome de Gorlin	<i>PTCH</i>
Syndrome héréditaire de polypose mixte	Base génétique inconnue
Syndrome de Lynch (HNPCC)	
Syndrome de Lynch de type I ou II	<i>MLH1, MSH2, MSH6, PMS1 et PMS2.</i>
Syndrome de Muir-Torre et Turcot	<i>MLH1, MSH2, MSH6, PMS1 et PMS2</i>
Syndrome X	Base génétique inconnue

Deux syndromes prédisposent fortement au risque de CCR, qui sont le plus souvent rencontrés, il s'agit de la polypose adénomateuse familiale (PAF) (OMIM : #175100) et du cancer colorectal héréditaire sans polypose (HNPCC) ou syndrome de Lynch (SL) (OMIM : #120435) qui sont des maladies à transmission autosomique dominante. Chaque syndrome a

son mécanisme propre : la PAF est liée à une instabilité chromosomique, le SL est caractéristique du phénotype MSI.

Le risque cumulé au cours de la vie de développer un CCR lorsqu'un sujet est porteur d'une altération dans l'un des gènes impliqués est supérieur à 80 % en l'absence de traitement préventif (Baillet, 2002). Cependant, il existe une polypose qui est liée au gène *MUTYH* (MutY homolog), elle est jusqu'à maintenant la moins bien caractérisée.

3.1 Polypose Adénomateuse Familiale

La PAF (OMIM #175100) est la plus fréquente des polyposes (80%) mais responsable de moins de 1% des CCR, elle touche un individu sur 10000 (Jasperson et al., 2010). Elle a été décrite en 1859 pour la première fois par Charelaigue, chez une jeune fille de 16 ans et un homme de 21 ans présentant, tous les deux, un grand nombre de polypes dans le gros intestin. En 1882, William Harrison CRIPPS suggère le caractère héréditaire de la polypose adénomateuse familiale (Varesco, 2004).

La PAF est une des rares maladies qui permettent l'observation des premiers stades de la formation d'un adénome. Elle renforce la notion de séquence adénome-cancer. En effet, la PAF se manifeste par la formation de plusieurs centaines de polypes (présence de 100 à 1000 polypes) au niveau du côlon chez au moins un membre de la famille. Dès l'adolescence, ces adénomes évoluent naturellement vers des adénocarcinomes avec un âge moyen d'apparition de 40 ans mais très rarement avant 20 ans (Cp Penna et al., 1991). La plupart des adénomes mettent entre 6 à 10 ans pour subir une transformation maligne. En microscopie, l'adénome montre une architecture tubulaire identique à celle retrouvée chez les patients atteints d'un cancer sporadique (Gatalica et Torlakovic, 2008).

3.1.1 Polypose adénomateuse familiale atténuée

A la suite de l'observation d'une famille présentant une forme atténuée de polypose, la PAF a été scindée en deux syndromes : classique ou atténué (AAPC, Attenuated Adenomatous Polyposis Coli)(Lynch et al., 1995). Cette forme atténuée ne représente qu'une minorité de patients atteints de PAF (Knudsen et al., 2003) (environ 10% de PAF)(Vasen, 2000). Elle se caractérise par la présence d'un nombre faible de polypes (moins de 100). Ces derniers prédominent dans le côlon droit et se développent plus tardivement (10 à 15 ans) (Knudsen et al., 2010) que dans les formes classiques, soit un âge d'apparition de 50 ans (Gatalica et Torlakovic, 2008).

3.1.2 Variants du gène APC dans la polypose adénomateuse familiale

La PAF est autosomique dominante à forte pénétrance (*de la Chapelle, 2004*), due à une mutation germinale sur le gène APC (GenBank ID : 324). Ce gène a été localisé en 5q21-22 en 1987 suite à l'observation d'une délétion interstitielle dans cette région du chromosome 5 chez un patient présentant de multiples polypes coliques. L'inactivation de ce gène intervient dans 70 à 80 % des cancers sporadiques et dans 100 % des cas de cancers héréditaires de type PAF.

L'APC est un gène suppresseur de tumeurs, s'étendant sur 8532 paires de bases, il est organisé en 15 exons codant pour une protéine de 2843 acides aminés (*Macrae et al., 2009*) dont l'exon 15 représente 75% de la séquence codante. Il est divisé en de multiples domaines de fonctions différentes incluant notamment la liaison à la β -caténine, la liaison à l'ADN et EB1 (*de la Chapelle, 2004*) (Fig. 14). De par sa longueur, l'exon 15 représente une cible fréquente de mutations germinales et somatiques.

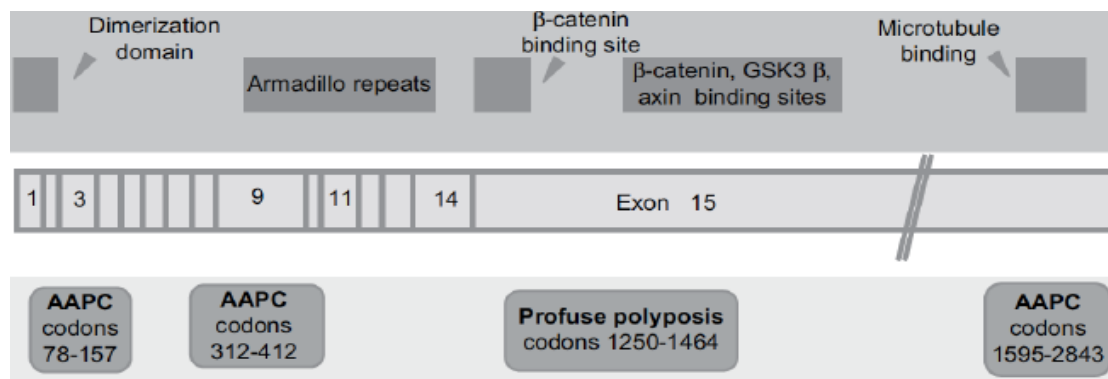


Figure 14 : Rôle du gène APC, position des principales mutations germinales et corrélation génotype-phénotype (*Macrae et al., 2009*).

Depuis la découverte et l'identification des mutations sur le gène APC dans la PAF par Groden (*Groden et al., 1991*), plus de 1000 mutations ont été reportées. Une mutation germinale est identifiée chez environ 85% des cas en PAF classique (*Davidson, 2007*) et 20% en PAF atténuée (*Knudsen et al., 2003*). Les mutations congénitales d'APC sont le plus souvent des mutations ponctuelles (*Nagase et al., 1992*) dont la majorité (95%) (*non sens, deletion et insertion*) conduit à une protéine tronquée (*de la Chapelle, 2004*). On estime que les mutations *de novo* d'APC sont responsables d'environ 20 à 25% des cas de PAF (*Jaspersen et al., 2010*). Les mosaïques germinales sont également une explication de PAF *de novo* dans 20% des cas (*Hes et al., 2008 ; Iwaizumi et al., 2015*).

3.1.3 Corrélation génotype-phénotype

Parallèlement à la description de diversité clinique de la PAF, une corrélation entre la mutation germinale et l'expression phénotypique de la maladie a été envisagée. En effet, il a

été montré que la position de la mutation pourrait influencer la sévérité de la maladie dans les cas de PAF:

- la présence d'un phénotype atténué est liée à l'existence d'une mutation en 5' ou 3' du gène (*Spirio et al., 1993*), dans les 4 premiers exons entre les codons 78 à 157, dans la partie de l'exon 9 épissée de manière alternative et dans la partie distale de l'exon 15 entre les codons 1595 et 2843. De la même manière, une polypose sévère (>5000 polypes) peut être associée à une mutation entre les codons 1250 et 1464 (*Walton et al., 1997*) (*Macrae et al., 2009*), notamment la transversion de la thymine 1307 par une adénine (*Friedl et al., 2001*). Cette mutation n'altère en rien la fonction de la protéine APC, cependant la présence de 8 adénines consécutives augmente le risque d'apparition de mutations lors de la réplication de l'ADN.

3.2 Polypose liée à *MUTYH*

3.2.1 Syndrome MAP

Cette nouvelle forme appelée MAP (*MUTYH* Associated Polyposis) (MIM # 608456), de description relativement récente (*Al-Tassan et al., 2002*), est une affection liée à une mutation germinale d'un gène appelé *MUTYH* (*MutY* homolog) (*Tsai-Wu et al., 2000*). Son mode de transmission est autosomique récessif avec une pénétrance forte et probablement complète lorsque les mutations causales sont bi-alléliques. Elle représente entre 0,5% et 1% de la totalité des CCR (*Al-Tassan et al., 2002 ; de la Chapelle, 2004*).

La polypose associée à *MUTYH* est le plus souvent de type atténué : la majorité des patients porteurs de mutation bi-allélique de ce gène, *MUTYH*, ont un nombre de polypes colorectaux compris entre 15 et 100 (*Buecher, 2007*). Le mécanisme aboutissant à l'apparition du cancer en cas de mutation bi-allélique de *MUTYH* semble différent des mécanismes déjà connus et donc spécifique. Le risque des porteurs monoallélique d'une mutation sur *MUTYH* est encore sujet à discussion pour certains mais la majorité des auteurs reconnaît un risque similaire à celui d'un patient ayant un antécédent de CCR au premier degré (*Jones et al., 2002 ; Buecher et al., 2012*).

Les cellules cancéreuses sont le plus souvent diploïdes (*Lipton et al., 2003*) et les cancers liés au syndrome MAP sont CIN-/MSI-. Cependant deux études ont identifié un phénotype MSI lié soit à une méthylation du promoteur de *MLH1* (*Colebatch et al., 2006*) soit à une perte d'expression de la protéine *MLH1* au tissu tumoral (*Lefevre et al., 2010*).

Certains adénomes MAP montrent une mutation faux-sens de *K-RAS* qui est retrouvée plus fréquemment en cas de CCR lié à une mutation bi-allélique sur *MUTYH* qu'en cas de CCR

sporadique. Par contre ni *BRAF*, ni *SMAD4*, ni *TGFB* n'ont été trouvés mutés dans les adénomes et les cancers MAP (Morak et al., 2014).

3.2.2 Système de réparation BER

Le gène *MUTYH* (MIM# 604933) est localisé sur le chromosome 1 entre les bandes p34.3 et p32.1, il s'agit d'un homologue du gène *MutY* d'*E.Coli* codant pour une protéine, un ADN glycosylase, appartenant au système de réparation de l'ADN par excision des bases, (BER, Base Excision Repair) (Nakabeppu et al., 2006).

La protéine *MUTYH* joue un rôle majeur, avec hMTH1 et hOGG1 (8-oxoguanine DNA glycosylase1), dans la réparation des lésions oxydatives de l'ADN, parmi lesquelles, la 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG) est hautement mutagène en raison de sa capacité à s'apparier de façon stable à une adénine lors de la réplication de l'ADN générant un mésappariement 8-oxoG/A.

La protéine *MUTYH* intervient en excisant spécifiquement l'adénine (Efrati et al., 1999 ; Sheng et al., 2012) (Fig. 15).

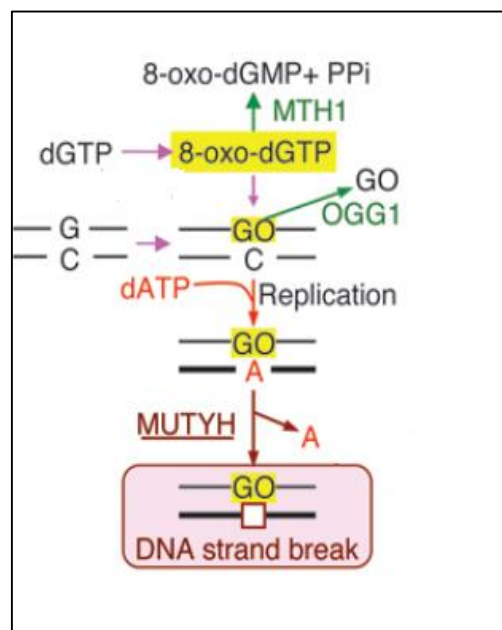


Figure 15 : Réparation de la lésion oxydative impliquant la 8-oxoG par MUTYH (Sheng et al., 2012).

MUTYH a pour substrat les adénines appariées avec une guanine ou un 8oxoG.

MTH1 constitue la première ligne de défense du système BER, il enlève du pool nucléotidique les dGTP en les hydrolysant. Quand *MTH1* n'a pas hydrolysé tous les dGTP, *OGG1* enlève les 8oxoG incorporés sur le brin fils d'ADN en face d'une adénine. Il permet ensuite l'incorporation d'une guanine. La dernière ligne de défense avant la seconde réplication qui aboutirait à la transversion G:Ca ->T:A est *MUTYH*.

L'absence d'activité de *MUTYH* va entraîner l'accumulation de transversion G:C > T:A sur le gène *APC*, au niveau des séquences GAA présentes sur 216 sites (Jones et al., 2002). Une telle transversion peut conduire à un codon stop (Cheadle et al., 2003 ; Al-Tassan

et al., 2004). Ce sont ces transversions qui vont inactiver somatiquement *APC*, conduisant à l'apparition de polypes puis du CCR.

En résumé, la similitude des symptômes entre la PAF et le syndrome MAP vient de l'atteinte commune d'*APC* de manière germinale et somatique pour la PAF, alors qu'elle est acquise pour le syndrome MAP.

3.2.3 Variants du gène *MUTYH*

Au moins 164 variants différents du gène *MUTYH* ont été rapportés dans la littérature parmi lesquels 30% ont un caractère délétère, les exons 7, 9, 10, 12, 13 et 14 comprennent 96,1% de l'ensemble des mutations délétères identifiées (*Buecher, 2011*).

Les mutations les plus souvent décrites sont c.494A>G ; p.Tyr165Cys (*notée Y165C*) qui est la plus délétère pour le système BER, et c.1145G>A, p.Gly382Asp (*notée G382D*) (*Buecher et al., 2012*). Au maroc, il a été identifié, à coté de la mutation c.494A>G, deux autres mutations : c.1105delC et c.1145G>A dans une série de 62 patients présentant un CCR et de polypose atténuée (*Laarabi et al., 2012*). La mutation c.1227_1228dup (*p.Glu396-GlyfsX43*) semble être rare et a été décrite chez quelques patients portugais (*Isidro et al., 2004*), elle n'a pas été trouvée dans une large série multicentriques avec 114 patients provenant des Etats-Unis, d'Australie ou du Canada (*Cleary et al., 2009*).

4. Syndrome de Lynch

4.1 Incidence, découverte et historique

Le syndrome de lynch (SL) ou Syndrome HNPCC (*Hereditary Non Polyposis Colon Cancer*) est la forme la plus fréquente des cancers colorectaux héréditaires, avec une incidence de 1 à 2 pour 1000 (Vasen, 2000 ; Boland, 2006). Il représenterait de 0,5 à 5% de la totalité des cancers colorectaux. Les chiffres variant en fonction des publications et de la définition du syndrome : 1 à 5% (Vasen, 2000) ; 5% (de la Chapelle, 2004) ; 3 à 4% (Boland, 2006 ; Rustgi, 2007) ; 1 à 3% (Dionigi et al., 2007) ; 2 à 5% et enfin 3% (Arvelo et al., 2015). Cette variation de syndrome de Lynch serait due à la fois aux facteurs génétiques, mais également à des facteurs environnementaux.

L'histoire du SL commence, 71 ans avant sa proclamation « princeps » en 1966 (Lynch et al., 1966), après observation clinique de cancers réalisée en 1895 par Aldred Scott Warthin dans une famille « G » dont il publia la généalogie en 1913 (Warthin AS., 1913). C'est en 1971 que Lynch et Krush ont réétudié cette même famille et ont décidé d'appeler ce syndrome « HNPCC » acronyme pour Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer (Lynch et Krush, 1971). Dès les années 1960, cette pathologie avait été déterminée comme étant transmise selon le mode autosomique dominant (Lynch et al., 1966). Le nom, HNPCC, de ce syndrome a été soumis à de nombreux débats, car ce nom évoque trop l'absence de polypes, ce qui ne correspond pas à la réalité clinique de cette pathologie. Il est rebaptisé : Syndrome de Lynch.

4.2 Caractéristiques cliniques

Le SL est caractérisé par un âge précoce de survenue de cancer (avant l'âge de 45 ans dans 80% des cas) (Davidson, 2007; Lynch et al., 2008). Les CCR dans ce syndrome ont tendance à avoir une localisation proximale : le cæcum, le côlon droit et transverse en constituent 70% des cas avec une prédominance du côlon droit. De plus, ces cancers ont la particularité d'être synchrones dans 45% des cas (Dionigi et al., 2007) mais aussi métachrones après 10 ans dans 25 à 30% des cas (Vasen, 2000 ; Lynch et al., 2008).

Sur le plan histologique, on observe généralement une faible différenciation, un stroma lymphocytaire dit *Crohn-like* ; ils sont fréquemment mucineux, cribiformes ou à cellules indépendantes en bague à chaton (Umar et al., 2004). Généralement, les adénomes se présentent à un âge précoce, ont une composante villeuse et sont découverts au stade de dysplasie de haut grade (De Jong et al., 2004).

Le risque élevé de CCR dans le SL n'est pas tant lié à l'initiation de la cancérogenèse qu'à une accélération de la séquence : un adénome peut se transformer en adénocarcinome en

l'espace de 2 à 3 ans, contre 8 à 10 ans chez une personne de la population générale, justifiant la recommandation d'une coloscopie tous les 2 ans (*Jass, 1995 ; Lynch et Chapelle, 1999*).

Sur le plan moléculaire, ces tumeurs HNPCC sont caractérisées majoritairement par un phénotype MSI ainsi que par la présence de certaines propriétés conventionnelles des adénomes comme les mutations sur les gènes *APC*, *β-catenine (CTNNB1)*, et /ou *K-ras* (*Arvelo et al., 2015*). Les CCR associés au SL sont généralement de meilleur pronostic que les CCR sporadiques, indépendamment du stade de la maladie (*Gryfe et al., 2000*).

4.2.1 Variétés cliniques

Deux types de syndrome de Lynch ont été définis cliniquement : les patients ayant le type I présentent des tumeurs localisées exclusivement dans le colon (spectre étroit) , alors que les patients, atteints de SL type II, sont associés à une augmentation significative du risque d'autres types tumoraux (spectre large) (Tableau 2).

Tableau 2 : Cancers du spectre étroit et spectre large associés au syndrome de Lynch.

Cancers du spectre Lynch étroit	Cancers du spectre Lynch élargi : ceux du spectre étroit + ceux ci-dessous	Référence
Adénocarcinome colorectal	Cancer de l'ovaire.	<i>Rustgi, 2007.</i>
Adénocarcinome de l'endomètre	Cancer de l'estomac	<i>Peltomäki, 2016.</i>
Adénocarcinome de l'intestin grêle	Cancer des reins et les voies biliaires	<i>Watson et al., 2008 .</i>
Cancer des voies urinaires excrétrices	Glioblastomes	<i>Win et al., 2012 . Engel et al., 2012.</i>
	Des tumeurs cutanées (sébacées) :Muir-Torre et cérébrales Turcot:	<i>Hamilton et al., 1995. Kleinerman et al., 2012.</i>
	Cancer du pancréas Cancer du sein Cancer de la prostate	<i>Niskakoski et al., 2013. Arvelo et al., 2015. Peltomäki, 2016.</i>

4.2.2 Critères d'Amsterdam et de Bethesda

Le consortium international sur le syndrome HNPCC énonce des critères, dits d'Amsterdam, définissant ce syndrome sur le plan clinique selon trois critères : critère de nombre, d'apparenté et d'âge. Ces critères ont été retenus en 1991 à Amsterdam (critères d'Amsterdam I) (*Vasen et al., 1991*). Les patients répondant à ces critères strictes semblent également exposés à un risque élevé de développer d'autres cancers, les critères d'Amsterdam ont été élargis et revus en 1999 (critères d'Amsterdam II)(*Vasen et al., 1999*) (Tableau B, Annexe I).

Environ la moitié des familles présentant un syndrome de Lynch ne répondent pas aux critères d'Amsterdam. Le degré de la sensibilité pour les critères d'Amsterdam II a été évalué à 72%, et 61% pour les critères d'Amsterdam I. En effet, les critères d'Amsterdam présentent des limites notamment dans les petites familles.

Pour améliorer la sensibilité de détection des patients atteints d'un syndrome de Lynch parmi la population générale, d'autres paramètres, prédictifs de la présence d'une instabilité génomique, due à la défaillance des gènes MMR dans un SL, ont depuis été proposés à la conférence de Bethesda, et énoncés en 1997 (*Rodriguez-Bigas et al., 1997*), puis révisés en 2004 (*Umar et al., 2004*). Ils correspondent à un ensemble de situations cliniques dans lesquelles la recherche d'une instabilité microsatellitaire est recommandée (Tableau C, Annexe I). Les critères de Bethesda permettent ainsi d'obtenir une sensibilité pouvant atteindre 98 % (*Carneiro da Silva et al., 2015*).

4.3 Génétique et mécanisme moléculaire du syndrome de Lynch

Au début des années 90, la prédisposition héréditaire au CCR du type syndrome de Lynch a été identifiée comme liée à un mécanisme MMR déficient ; par conséquent, les tumeurs présentent pour la grande majorité, une MSI qui est une des caractéristiques majeures du syndrome de Lynch (*Modrich et Lahue, 1996*).

4.3.1 Système MMR

La réplication de l'ADN lors des divisions cellulaires est un événement hautement sophistiqué. Sa fidélité est essentielle pour préserver l'intégrité du génome. La polymérase elle-même exhibe un très faible taux d'erreur (toutes les 10^4 à 10^5 pb). Et grâce à son mécanisme de relecture, le nombre d'erreurs est réduit à un taux toutes les 10^8 pb (*Zhang and Li, 2013*).

Les erreurs ayant échappé à ce contrôle rigoureux peuvent ensuite être prises en charge par un système très efficace de réparation des mésappariements, qui contribue à abaisser le taux d'erreur de réplication à une mutation toutes les 10^{10} pb : le système MMR (*Pino and Chung, 2011*). Ce système, particulièrement conservé au cours de l'évolution de la bactérie à l'homme, cible les mésappariements de nucléotides, mais également les petites boucles d'insertions /délétions (Insertion Deletion Loops ou IDL) qui résultent d'erreurs de réplication (*Hsieh and Yamane, 2008*). Ainsi, l'inactivation du système MMR confère un phénotype mutateur qui se caractérise par un taux de mutations spontanées élevé.

La conservation de ce système a permis de définir plus clairement le système MMR eucaryote dont la terminologie est basée sur le système analogue chez les procaryotes, le mieux caractérisé dans *Escherichia coli* (*Pino et Chung, 2011*).

Les protéines MutS et MutL dans *E.coli* et leurs homologues eucaryotes, MutS α et MutL α , respectivement, sont des acteurs clés dans la maintenance du génome associée au système MMR (Sameer et al., 2014). Tous les orthologues des gènes bactériens ont pu être identifiés à l'exception du gène *MutH* (Tableau 3).

Tableau 3 : Principaux acteurs impliqués dans les voies de réparation MMR chez *E.coli* et chez l'homme (Hsieh et Yamane, 2008).

Protéine <i>E. COLI</i>	Orthologue l'homme	chez	Fonction
Muts	MSH2-MSH6 (Muts α)		<u>Liaison aux aux mésappariements</u> Réparation des mésappariements nucléotidique et des IDL ≤ 2 pb
	MSH2-MSH3 (Muts β)		Réparation des IDL ≥ 2 pb
MutL	MLH1-PMS2 (MutL α)		Recrutement des autres acteurs
	MLH1-MLH2 (MutL β)		Inconnue
	MLH1-MLH3 (MutL γ)		Suppression de quelque IDL et recombinaison méiotique
MutH	Aucun		Reconnaissance du brin fils et activité endonucléasique
β -Clamp	PCNA		Interaction avec MutsS et MutL au niveau de fourche de réplication
ExoI, ExoX	EXO1		Fonction Exonucléastique
DNA Pol III	DNA poly		Synthèse de l'ADN
DNA ligase	DNA ligase		Scelle la coupure après la synthèse de l'ADN

MLH1,3: MutL homologue 1,3. MSH2,3,6 : MutL homologue 2,3,6. PMS1,2 Postmeiotic segregation 1,2.

Chez les eucaryotes, plusieurs homologues des protéines MutS ont été identifiés. Trois homologues ont notamment été trouvés chez l'homme, nommés MSH2, MSH3 et MSH6 (Zhang et Li, 2013). Le choix des sous-unités est dicté par le substrat et la spécificité de la fonction. Les protéines MSH forment des hétérodimères à la différence de l'homodimère MutS trouvé chez les bactéries (Modrich, 2016). MutS α , constitué des sous-unités MSH2 et MSH6, cible les mésappariements de base et les IDL d'un à deux nucléotides (Fukui, 2010) alors que MutS β , constitué des sous-unités MSH2 et MSH3, cible les IDL contenant jusqu'à 12 nucléotides (Hsieh et Yamane, 2008). Chez l'homme, le complexe MutS α est présent en quantité plus élevée que MutS β (Jacob et Praz, 2002). La fonction des protéines MSH3 et MSH6 étant partiellement redondante (interviennent dans la réparation des IDLs de 2 à 8 nucléotides), l'altération d'un des deux gènes correspondants est associée à un phénotype mutateur atténué (Jacob et Praz, 2002).

De la même façon, les eucaryotes présentent plusieurs protéines homologues des MutL bactériennes. On dénombre quatre homologues chez l'homme ; les protéines MLH1, MLH3, PMS1 et PMS2. Ces homologues forment trois hétérodimères MutL α (MLH1-PMS2), MutL β (MLH1-PMS1) et MutL γ (MLH1-MLH3) (Modrich, 2006). MLH3, PMS1 et PMS2, interagissent avec la même région de la protéine MLH1.

La voie de réparation des mésappariements implique essentiellement l'hétérodimère MutL α , composant majeur du système MMR. Les autres hétérodimères sont impliqués dans d'autres processus cellulaires (la recombinaison méiotique pour l'hétérodimère MutL γ).

Bien que PMS1 et MLH3 soient capable de se fixer sur MLH1 avec une haute affinité, leur rôle dans la réparation des mésappariements de l'ADN reste à démontrer. Comme MLH1 est le composant commun à ces trois hétérodimères, son altération entraîne un phénotype mutateur sévère, alors que la perte de la sous-unité PMS2, qui peut être partiellement compensée par MLH3, est associée à un phénotype atténué (Hsieh and Yamane, 2008).

Mécanisme de réparation du système MMR chez les eucaryotes :

La réparation des mésappariements ou des boucles d'insertion/délétion (ou IDLs) se fait en trois étapes (Fig. 16, page 37) :

- 1) Reconnaissance du mésappariement sur le brin d'ADN
- 2) Discrimination du brin néosynthétisé portant le mésappariement
- 3) Réparation du mésappariement

Les travaux de P.Modrich (Modrich, 2006) ont montré que dans le cas d'une réparation dirigée en 5' du mésappariement, la réparation a lieu après une incision, en présence de MutS α , Exo1, RPA et d'ATP. Dans le cas d'une réparation dirigée en 3' du mésappariement, la réparation nécessite la présence de MutL α , de PCNA et de RFC en plus des facteurs précités (Fig.17, page 37).

Il a été démontré qu'une activité hélicase est associée à la voie MMR eucaryote (Song et al., 2010). Outre son rôle dans la réparation des mésappariements, le système MMR est également impliqué dans d'autres mécanismes. Par exemple, il prévient les recombinaisons homologues au cours de la mitose et de la méiose. Il est également impliqué dans la régulation du cycle cellulaire et le déclenchement des voies de transduction provoquant l'apoptose (Jiricny, 2006).

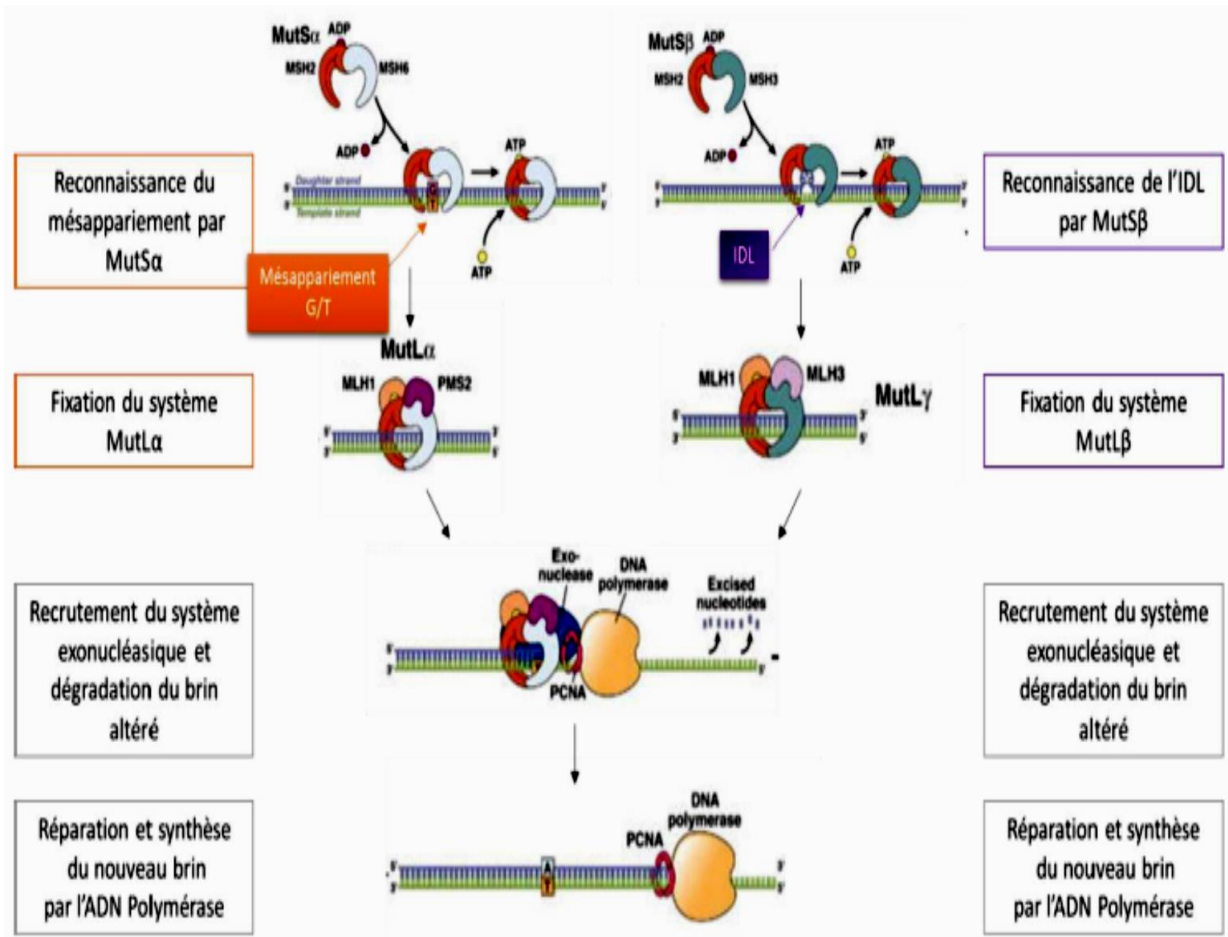


Figure 16 : Mode d'action du système MMR chez l'Homme (Boland et Goel, 2010).
 Le complexe MutS α (MSH2 et MSH6) reconnaît les mésappariements de base et IDL de petite taille (≤ 2 nucléotides) et adopte une conformation de pince coulissante entourant l'ADN. Cette étape nécessite l'échange de l'ADP en ATP. Ce complexe est ensuite lié à MutL α (MLH1 et PMS2). Celui-ci interagit avec la protéine PCNA et l'Exonucléase 1 qui va dégrader le brin fils jusqu'au mésappariement. Finalement, le complexe se dissout quand la synthèse du nouveau brin par l'ADN Polymérase est effectuée. Selon le même principe, le complexe MutL β (MSH2-3) agit sur les IDL de plus grande taille (> 2 nucléotides).

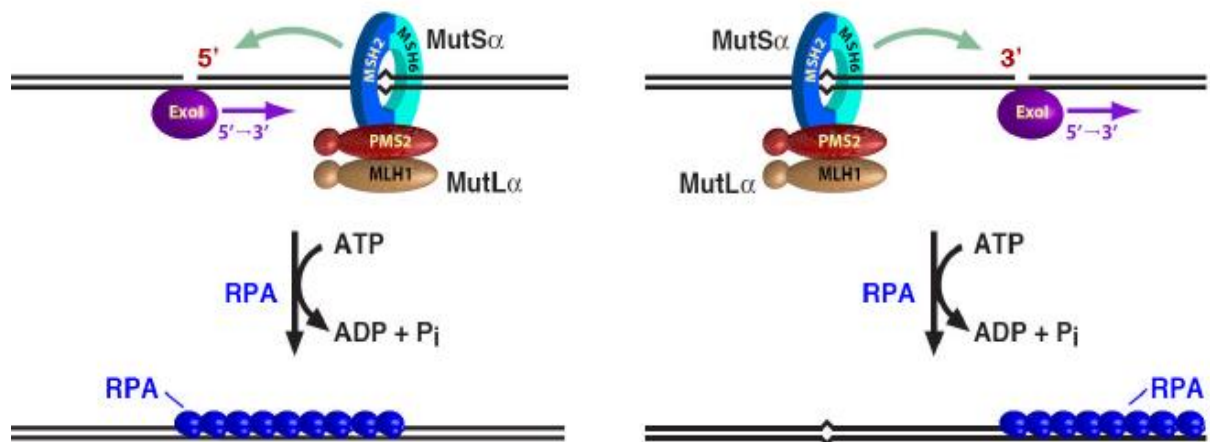


Figure 17 : Schéma de la réparation d'un mésappariement par le MMR chez les eucaryotes dans le cas où une incision se trouve en 3' du mésappariement (à droite) ou en 5' du mésappariement (à gauche) (Modrich, 2006).

4.3.2. Gènes MMR

- Gène *MLH1*

Le gène *MLH1* (MIM# 120436), localisé en position 3p22.3 sur le chromosome 3, est constitué de 19 exons sur une région de 57360 pb (Fig. 18). Il code pour une protéine de 84 kDa qui comprend 756 acides aminés.

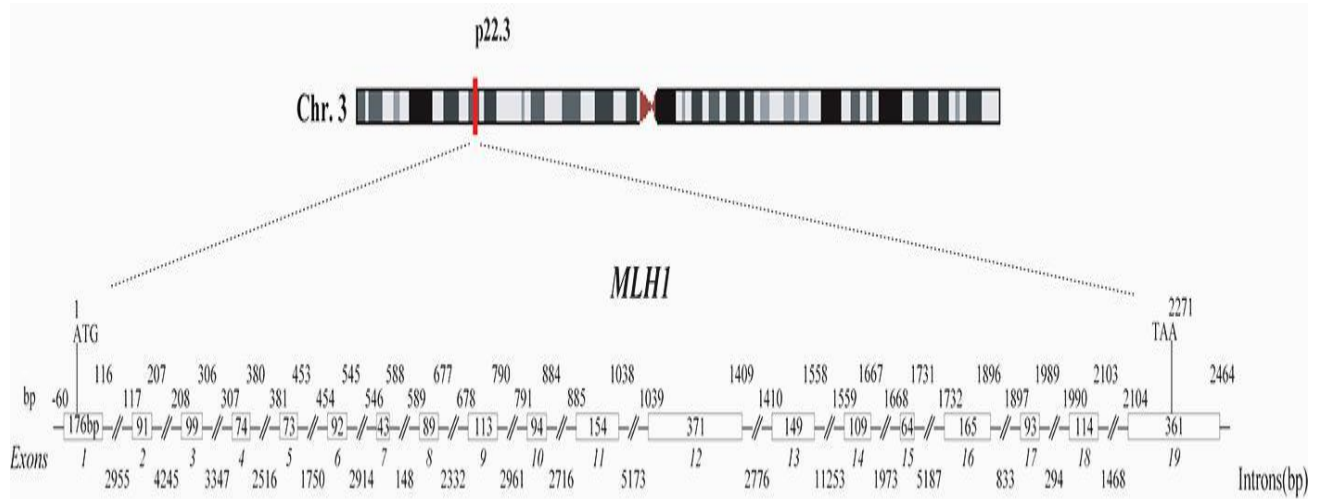


Figure 18 : Représentation schématique du gène *MLH1*.
(<http://www.med.mun.ca/MMRvariants/thegenes.aspx>)

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) (Fig. 19).

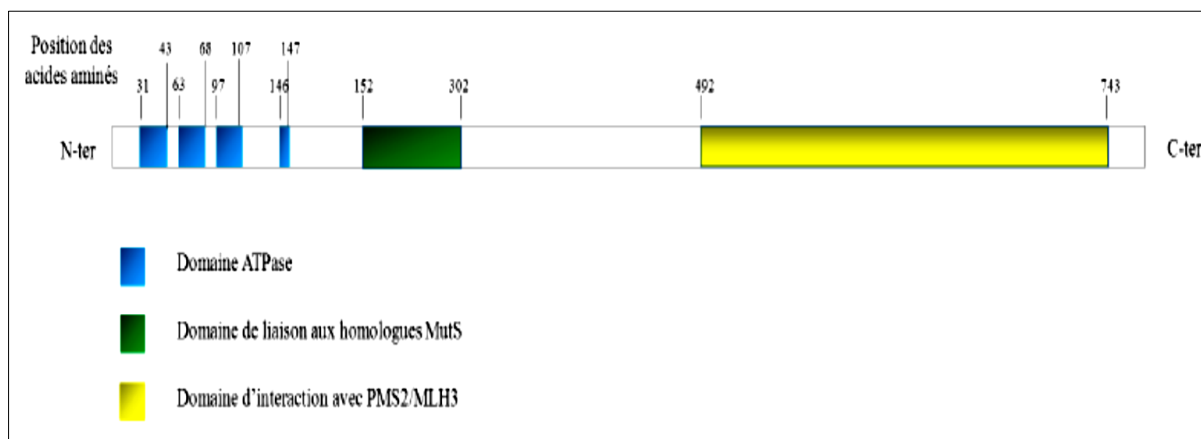


Figure 19 : Représentation schématique de la protéine *MLH1* (Martín-López et Fishel, 2013).

- Gène *MSH2*

Le gène *MSH2* (MIM# 609309) est le premier gène MMR identifié en 1993 (Fishel et al., 1993) par analyse de liaison dans les familles où les tumeurs colorectales arboraient un profil MSI (Leach et al., 1993). Il est situé sur le chromosome 2 en position p22-p21. Ce gène

comprend 16 exons s'étendant sur 80098 pb (Fig. 20). Il code pour une protéine de 104 kDa constituée de 934 acides aminés.

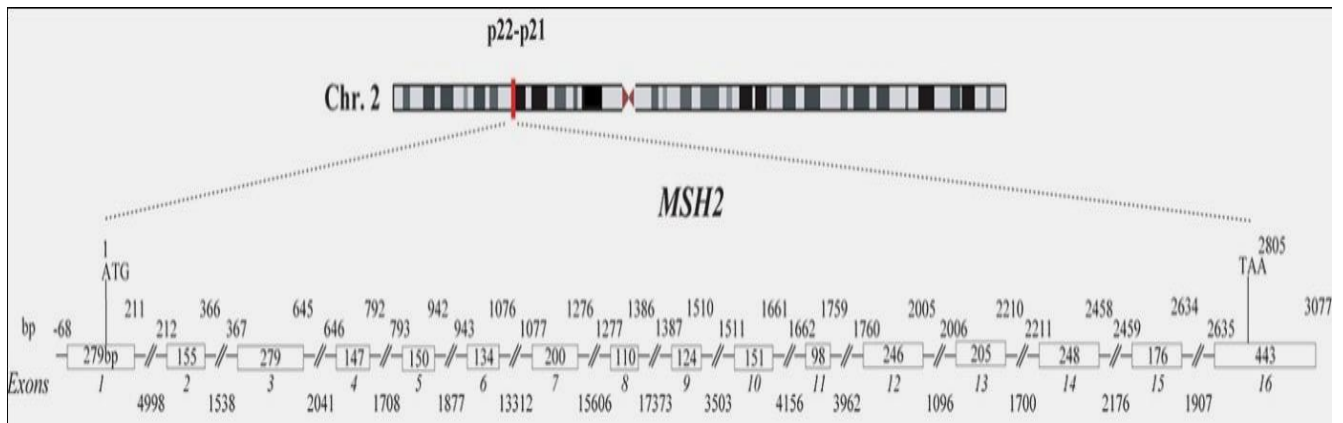


Figure 20 : Représentation schématique du gène MSH2.
(<http://www.med.mun.ca/MMRvariants/thegenes.aspx>)

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 (Fig. 21).

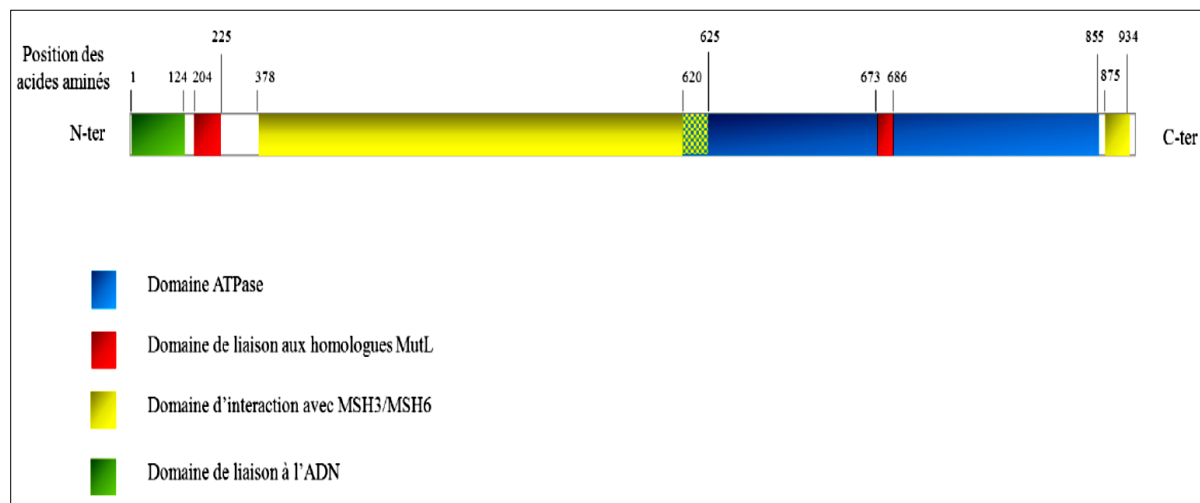


Figure 21 : Représentation schématique de la protéine MSH2 (Martín-López et Fishel, 2013).

- **Gènes MSH6**

Le gène *MSH6* (MIM# 600678) est situé sur le chromosome 2 en position 2p16. Il comprend 10 exons (Fig. 22), codant pour une protéine de 1360 acides aminés. Celle-ci est constituée d'un domaine ATPase, un domaine de liaison à la protéine PNCA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), un domaine de liaison aux mésappariements et un domaine d'interaction avec la protéine MSH2.

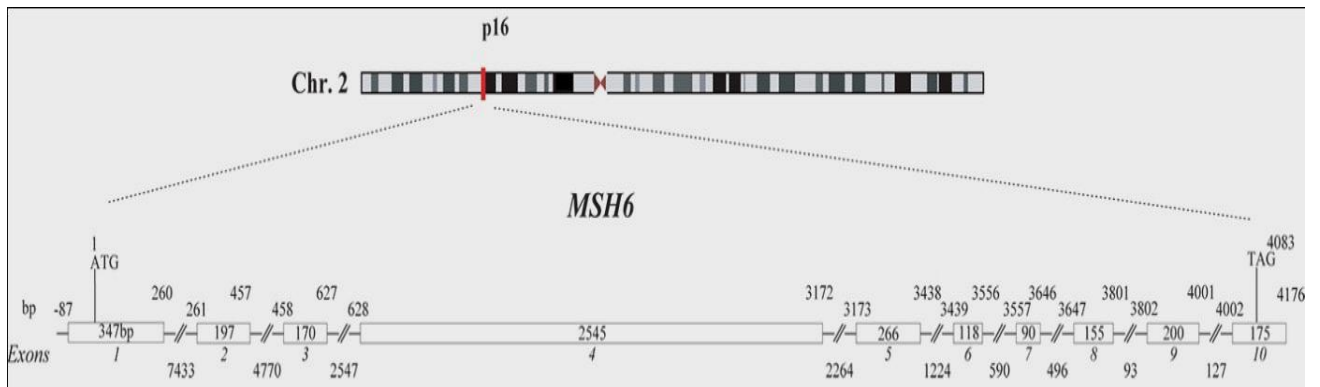


Figure 22 : Représentation schématique du gène *MSH6*.
(<http://www.med.mun.ca/MMRvariants/thegenes.aspx>)

- ***PMS2***

Le gène *PMS2* (MIM# 600259), situé en position 7p22, comprend 15 exons (Fig.23) codant pour une protéine de 862 acides aminés. Le gène *PMS2* comporte de nombreux pseudogènes (environ 15 sur le même chromosome), dont le pseudogène *PMS2CL* très proche du gène fonctionnel, qui possède des exons quasi identiques aux exons 9 et 11 à 15 du gène *PMS2*, avec des conversions géniques fréquentes entre les deux (De Vos et al., 2004 ; Niessen et al., 2007).

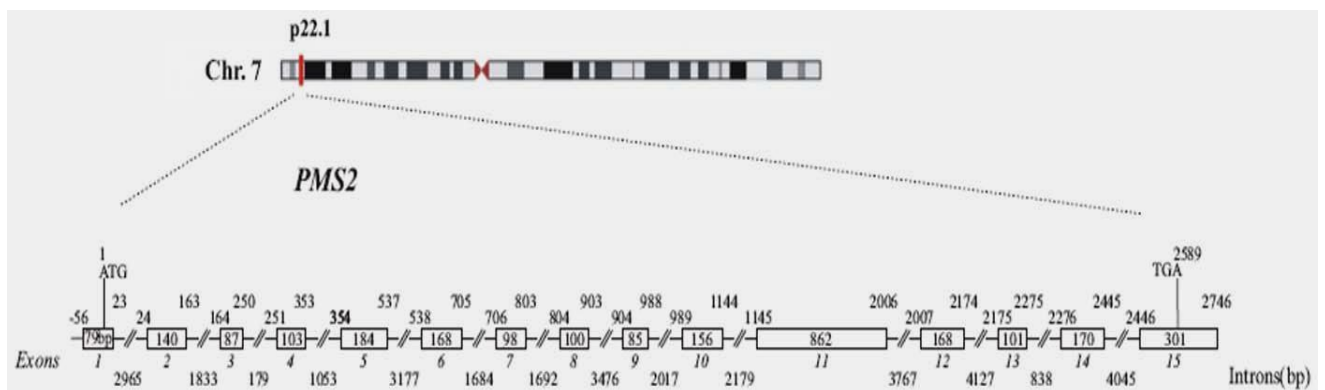


Figure 23 : Représentation schématique du gène *PMS2*.
(<http://www.med.mun.ca/MMRvariants/thegenes.aspx>)

- ***PMS1***

Le gène *PMS1* (MIM# 600258), situé en position 2q32.2, sur une région de 93056 pb, réparti en 13 exons codant pour une protéine de 932 acides aminés.

Bien que les gènes *PMS1*, *MLH3*, et *MSH3* soient membres du système MMR, jusqu'à ce jour, ils n'ont pas encore une implication très claire dans le SL, même si dans de rares cas des mutations causales ont pu être identifiées (Talseth-Palmer et al., 2016).

4.3.3 Mutations germinales dans les gènes MMR

D'après la base de données établie par l'International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours (InSiGHT) (Thompson et al., 2014) (<http://www.insight-group.org/> date

d'accès Decembre 2015, 19h), 3000 mutations germinales dans les gènes MMR ont été associées au syndrome de Lynch dont *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* et *PMS2* en représentent 40, 34, 18, et 8%, respectivement (Peltomäki, 2016).

La déficience dans le système MMR est le résultat de l'inactivation des deux allèles d'un gène MMR. Dans les cancers sporadiques, une inactivation biallélique d'un gène MMR se produit de façon aléatoire au sein d'une cellule d'un tissu cible. Dans le SL, une inactivation constitutionnelle d'un allèle dans toutes les cellules de l'organisme (par mutation ponctuelle inactivatrice, réarrangement génomique ou épimutation) est suivie d'une mutation somatique du second allèle dans une cellule d'un tissu cible (par perte d'allèle, mutation ponctuelle inactivatrice ou hyperméthylation du promoteur).

Les mutations des gènes MMR sont distribuées tout au long du gène ce qui exclut la présence de points chauds précis. Ces mutations identifiées dans le SL 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 24.

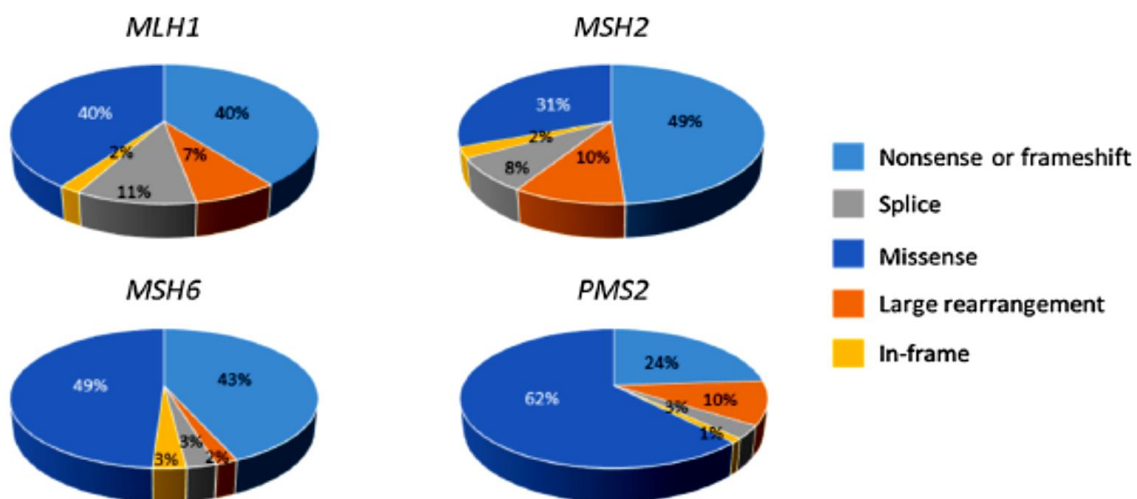


Figure 24 : Répartition des mutations des gènes MMR dans le syndrome de Lynch. D'après les analyses déposées à la base de données InSiGHT (Plazzer et al., 2013). Le nombre total de variants par gène inclus dans l'analyse sont 1104 *MLH1*, 883 pour *MSH2*, 414 pour *MSH6* et 197 *PMS2*.

La plupart des mutations sur les gènes *MLH1*, *MSH2* et *MSH6* sont de type tronquant (essentiellement non-sens ou des mutations de décalage du cadre de lecture).

Des analyses de SL sur plusieurs cohortes de différentes origines géographiques ont montré que dans 15% des cas, il a été noté la présence de grands réarrangements génomiques, affectent les gènes *MSH2*, *MLH1*, *MSH6* et *PMS2* (Klift et al., 2005). Ces grands réarrangements, sont essentiellement de type délétionnel. Le gène *MSH2*, en raison de sa richesse particulière en séquences *Alu*, est plus sensible aux recombinaisons intragéniques inégales favorisant les délétions (Li et al., 2006).

Le gène *PMS2* présente un grand nombre de mutations ponctuelles (Fig. 24).

En outre, la fréquence des changements faux-sens conduisant aux substitutions d'acides aminés est significative (30-60%) pour les quatre gènes. L'abondance de ce type de mutations a incité l'InSiGHT à entreprendre de grands efforts pour classer les variants des gènes MMR selon leur pathogénéicité. Cette classification est basée sur les caractéristiques du variant et de la famille d'une part et les résultats des différents tests fonctionnels d'autre part (Thompson et al., 2014).

L'Agence internationale de recherche sur le Cancer a adopté 5 niveaux de classification liés aux recommandations cliniques (Tableau 4). En se basant sur les caractéristiques cliniques de sévérité et de relation avec les variants, il a été noté que les mutations nonsense et frameshift constituent la majorité (59 %) des variants de la classe 5 de pathogénéicité établie et 4 de pathogénéicité probable ; cependant les variants introniques (42%), ainsi que les variants non synonymiques (29%) et les faux-sens synonymes (18%) sont les principaux types de changements représentés parmi les mutations de la classe 2 et 1. Enfin les changements faux-sens non-synonymes sont abondants (68%) parmi les variants de la classe 3 ; ceux-ci nécessitent plus de tests afin de les caractériser (Thompson et al., 2014).

Tableau 4 : Classification des variants MMR selon les critères InSiGHT (Thompson et al., 2014).

Classe de variant MMR	5	4	3	2	1
Signification clinique	Pathogène	Problement pathogène	Inconnue (incertaine)	Probablement non pathogène	Non pathogène

4.3.4 Polymorphismes et variants des gènes MMR impliqués

Les SNP (Single Nucleotide Polymorphism) sont des variations du code génétique fréquentes dans la population générale (>5%). Elles sont les cibles d'études des GWAS (Genome-Wide Association Study), plus de 600 études de GWAS recherchant des associations entre des SNP et 150 pathologies différentes ont été publiées (Manolio, 2010). Plusieurs variants des gènes du système MMR sont identifiés comme augmentant le risque de CCR sans pour autant être responsables d'un syndrome de Lynch (Allan et al., 2008 ; Tulupova et al., 2008). Dans une étude portant sur 1518 CCR, le variant *MLH1* -93G>A (*rs1800734*) augmentait d'un facteur 1,68 (IC95% (1-2,83), p=0,05) le risque de CCR. Contrairement aux mutations germinales responsables du syndrome de Lynch, ce variant n'entraînait pas obligatoirement de perte d'expression de la protéine MLH1 ou de phénotype MSI. Il était cependant significativement associé avec ces deux anomalies (Allan et al., 2008).

Deux autres polymorphismes du gène *MSH6* (-556G>T (rs3136228) et -145G>A (rs1042821)) modifient significativement le risque de CCR. Les porteurs d'un haplotype GT ou TT avaient un risque augmenté de 1,29 (IC95%=(1,02-1,62) ; p=0,04) et les porteurs de l'haplotype GA ou AA étaient au contraire protégés (OR=0,76, IC95%= (0,6-0,98) ; p=0,03) (Tulupova et al., 2008).

4.3.5 Inactivation épigénétique du système MMR

Outre les anomalies génétiques, des anomalies épigénétiques peuvent également être responsables du SL.

- **Implication du gène *EpCAM***

Un nouveau mécanisme d'inactivation du gène *MSH2* a été détecté chez plusieurs patients suspectés d'avoir un SL, sans mutation germinale trouvée dans les gènes MMR, il s'agit de délétions germinales hétérozygotes englobant le site de polyadénylation (l'extrémité 3') situé dans les derniers exons du gène *EpCAM* (epithelial Cell Adhesion Molecule) (MIM#185535) ou *TACSTD1* (tumor-associated calcium signal transducer1) (Ligtenberg et al., 2009 ; Guarinos et al., 2010). Le gène est situé à 16 kb en amont du *MSH2* (Fig. 25).

Il code pour une molécule d'adhésion de la cellule épithéliale, CD326, cette dernière est exprimée aussi bien dans les cellules normales que dans les tumeurs carcinomes (Went et al., 2004).

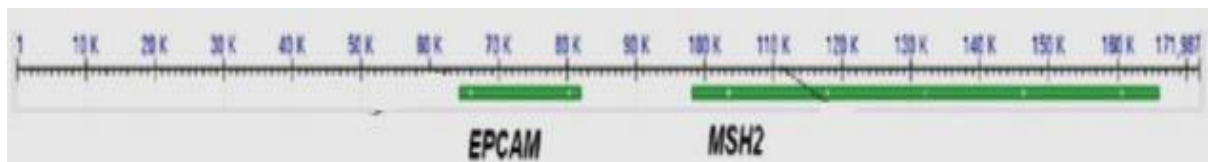


Figure 25 : Organisation structurale de locus *EpCAM-MSH2* (Guarinos et al., 2010).

Ces délétions représentent en moyenne entre 1 et 3% des anomalies responsables du syndrome de Lynch (Tutlewska et al., 2013) et jusqu'à 4% dans une autre étude (Tomita et al., 2013). Le mécanisme d'inactivation du gène *MSH2* lié à la délétion de la portion terminale du gène *EpCAM*, englobe le signal de terminaison de la transcription. Celle-ci se poursuit alors jusqu'au gène *MSH2*, situé en aval. Cette délétion provoque la formation d'un transcrit de fusion *EpCAM-MSH2* qui, par un mécanisme encore non élucidé, entraîne une hyperméthylation du promoteur du gène *MSH2* et donc sa répression transcriptionnelle (Ligtenberg et al., 2013).

Ce mécanisme est retrouvé chez 30% des patients avec syndrome de Lynch dont les tumeurs affichent une perte d'expression de la protéine *MSH2* (Kovacs et al., 2009) ou 20% des familles sans mutation dans les gènes MMR (Niessen et al., 2009).

Dans la population Espagnole, une étude de P.Mur et collaborateurs (2014) a révélé la présence d'un mosaïcisme dans la méthylation du *MSH2* chez les porteurs de délétion *EpCAM*. Les niveaux de méthylation étant moyennement plus élevés dans le côlon normal et les tumeurs colorectales (27,6% et 31,1%). Le risque de cancer de l'endomètre chez les personnes avec une délétion du gène *EpCAM* est moins fréquent que chez les patientes ayant une mutation du gène *MSH2* (Ligtenberg et al., 2013). Cet effet délétère semble être étroitement lié à la taille de la délétion (Kempers et al., 2011)

- **Hyperméthylation du promoteur *MLH1***

L'hyperméthylation constitutionnelle du promoteur du gène *MLH1* conduit à sa répression dans toutes les cellules somatiques. Elle se produit dans 2 à 3% des familles ayant SL sans mutation dans les gènes MMR (Gylling et al., 2009) et dans 10% des cas de SL avec perte de l'expression de la protéine MLH1 au niveau tumoral (Hitchins, 2013).

Cette modification épigénétique représente 0,6 à 1% de l'ensemble des anomalies responsables du SL. La plupart des épimutations surviennent *de novo* et sont réversibles lors de la méiose (Hitchins et al., 2007), elles ségrègent de manière non mendélienne et sont rarement associées à des antécédents familiaux de cancer (Peltomäki, 2016). Cependant les épimutations secondaires aux mutations génétiques constituent une exception et peuvent survenir sur les haplotypes ancestrales (Kwok et al., 2014).

4.4 Syndrome X

Le syndrome HNPCC correspond à deux entités : le SL (avec une mutation germinale prouvée sur un des gènes du système MMR) et le syndrome X (familles remplissant les critères d'Amsterdam mais n'ayant pas de mutation identifiée). En effet entre 1 et 2% des patients avec un CCR remplissent les critères d'Amsterdam II (Kerber et al., 2005). Cependant au sein de ce groupe, plus de la moitié des tumeurs avec une déficience de système MMR ne sont pas expliquées par des mutations germinales ou d'hyperméthylations des promoteurs.

Cette inactivation du système MMR a été récemment démontrée comme la conséquence de mutations somatiques des gènes MMR (Haraldsdottir et al., 2014 ; Mensenkamp et al., 2014 ; Geurts-Giele et al., 2014) et semble être occasionnellement liée à une altération de POLE/POLD1 (Polymerase DNA- directed sigma1) (Jansen et al., 2016).

Cette forme familiale de cancer colorectal type X avec une stabilité des microsatellites entraîne un risque de CCR plus faible que les syndromes de Lynch prouvés et est diagnostiquée en moyenne 10 ans plus tard. Il n'est pas encore décrit de cancers extra-coliques.

La base génétique de ce syndrome X semble être hétérogène et les gènes prédisposants restent inconnus. Il n'a pas été trouvée pour le moment une explication de cette forme d'apparence autosomique dominante avec une pénétrance incomplète (*Dominguez-Valentin et al., 2015*).

4.5 Stratégies de diagnostic de Syndrome HNPCC

Initialement, le SL était identifié exclusivement sur la base de l'âge de découverte du cancer et sur les caractéristiques de l'histoire familiale (Critères d'Amsterdam et de Bethesda). La manière d'aborder le diagnostic du SL a beaucoup évolué ces 15 dernières années. Les outils actuels permettent, par l'analyse de la tumeur, d'améliorer le dépistage de ce syndrome et de guider les investigations pour l'identification de la mutation constitutionnelle responsable du syndrome. Finalement, l'identification d'une mutation délétère d'un gène MMR conduit au diagnostic formel de la maladie et amène à adapter la prise en charge du patient et de sa famille.

- **Phénotype tumoral**

L'objectif de l'étude du phénotype tumoral est de dépister un SL et d'aider à l'identification du gène impliqué dans la maladie. Deux techniques complémentaires sont utilisées :

- la recherche d'instabilité microsatellitaire (*MSI*) (*autrefois appelé RER*) : La recherche dans les tumeurs du spectre d'une MSI est très utile pour le dépistage du SL, car elle constitue un excellent marqueur de déficience des gènes MMR ;
- l'immunohistochimie (IHC) des protéines MMR : Ces analyses sont réalisées le plus souvent à partir de tissus fixés au formol et inclus dans la paraffine. Il est indispensable, pour garantir la fiabilité de l'examen, de sélectionner une zone riche en cellules tumorales.

4.5.1 Recherche d'une instabilité microsatellitaire

Pour rappel l'instabilité microsatellitaire se traduit par une accumulation de mutations survenant préférentiellement au sein de microsatellites. La recherche de MSI consiste à détecter la présence de longueurs de répétition différentes dans les cellules tumorales par rapport au tissu normal. En 1997, le National Cancer Institute a proposé un panel de références pour la détection de MSI, constitué de 2 marqueurs mononucléotidiques et de trois marqueurs dinucléotidiques. Cependant, ce panel n'étant pas très sensible, d'autres panels ont été proposés afin d'optimiser la détection de MSI, à l'aide notamment de marqueurs mononucléotidiques, plus sensibles que les marqueurs dinucléotidiques (*Goel et al., 2010 ; Pagin et al., 2013*).

L'étude porte actuellement sur 5 marqueurs mononucléotidiques :

- BAT-25 localisé dans l'intron 16 du gène *c-kit* ;
- BAT-26 localisé dans l'intron 5 du gène *MSH2* ;
- NR-21 localisé dans la région 5' non traduite du gène *SLC7AB* ;
- NR-24 localisé dans la région 5' non traduite du gène *ZNF-2* ;
- NR-27 (*MONO-27*) localisé dans la région 5' non traduite du gène *IAP-1*.

La technique correspond à une amplification par PCR multiplex des 5 marqueurs testés. L'étude des amplicons est réalisée par migration en électrophorèse capillaire sur un séquenceur qui permet une discrimination au nucléotide près. Les profils obtenus correspondent, pour chaque marqueur, à plusieurs pics autour d'un pic principal. Le pic principal est caractérisé par la plus forte intensité, qui est utilisée pour évaluer la taille du marqueur.

L'instabilité est définie, pour un marqueur donné, par la présence de deux pics principaux voire de deux groupes de pics bien séparés après amplification à partir de l'ADN extrait du tissu tumoral. L'existence d'une instabilité des microsatellites (phénotype MSI ou déficience MMR) au niveau d'une tumeur est définie par l'existence d'un profil instable pour au moins 3 marqueurs (sur les 5 amplifiés) (Fig. 26).

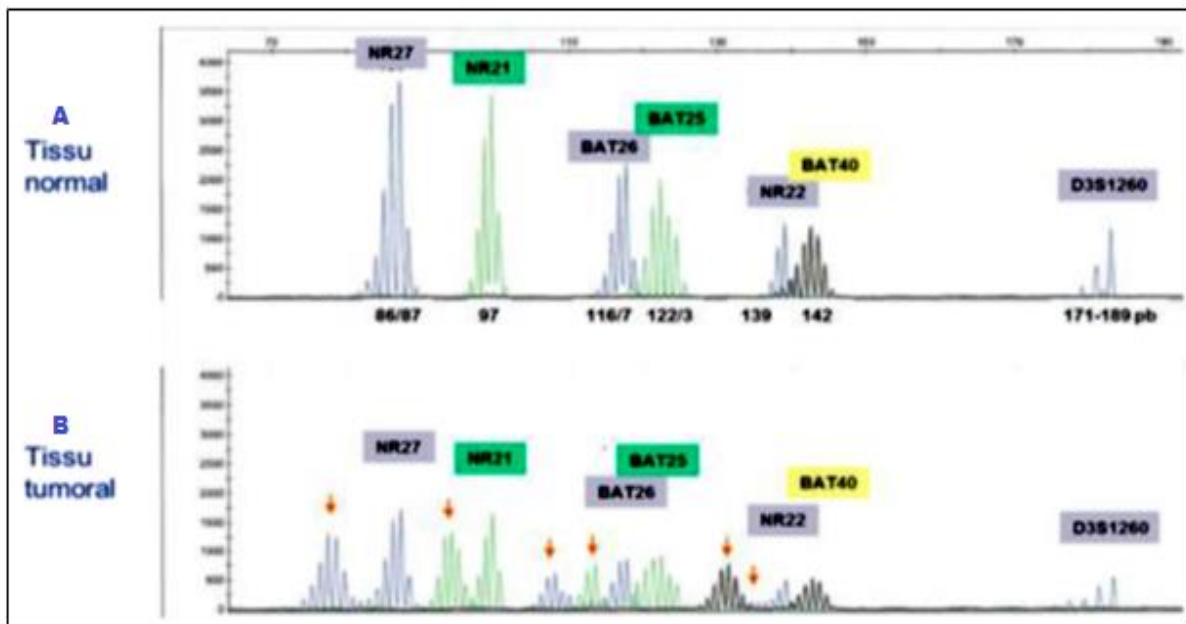


Figure 26 : Exemple d'un profil d'une tumeur MSI (Pagin et al., 2013).

La recherche d'une MSI est basée sur la comparaison de taille des produits des amplicons obtenus à partir de l'ADN tumoral (en B) et de l'ADN non tumoral (en A) du même patient (ou un tissu sain de référence). Le phénotype MSI se traduit par l'apparition dans la tumeur d'allèles différents (flèches oranges) n'existant pas dans le tissu non tumoral du patient (généralement de taille plus petite traduisant la présence de délétions).

Il est à noter qu'outre le dépistage du SL, la recherche d'instabilité microsatellitaire est également réalisée chez les personnes avec un CCR de stade II pour orienter la prise en

charge thérapeutique. D'un point de vue clinique, il est acquis que les CCR de phénotype MSI ont un meilleur pronostic et une moindre sensibilité à la chimiothérapie par 5-fluorouracile (5-FU) que les cancers de phénotype MSS (Buecher, 2011).

L'instabilité microsatellitaire n'est pas spécifique des tumeurs survenant dans le cadre d'un SL puisqu'elle est observée dans environ 15 % des cancers sporadiques (Umar et al., 2004). Ceci est liée, dans la plupart des cas, à l'acquisition d'une hyperméthylation somatique biallélique du promoteur du gène *MLH1* entraînant l'inactivation et la perte d'expression du gène *MLH1*, de manière analogue à ce qui a été observé dans le SL (Veigl et al., 1998).

4.5.2 Analyse en immunohistochimie des protéines MMR

La sensibilité et la spécificité de l'analyse immunohistochimique sont jugées nécessaires. Cette technique permet d'identifier la protéine défectueuse et d'orienter ainsi les analyses génétiques. L'inactivation des protéines MSH2 ou MLH1 entraîne fréquemment l'absence des deux protéines de l'hétérodimère correspondant, à savoir MSH2/MSH6 ou MLH1/PMS2, à l'inverse de la protéine MSH6 ou PMS2, dont l'absence peut être isolée, en raison de la redondance du système MMR. L'analyse immunohistochimique a pour but de détecter une perte d'expression des protéines altérées du système MMR dans les cellules tumorales.

L'utilisation d'anticorps commerciaux reconnaissant les quatre protéines MMR est nécessaire pour identifier la/les protéine(s) non fonctionnelle(s) (Fig. 27).

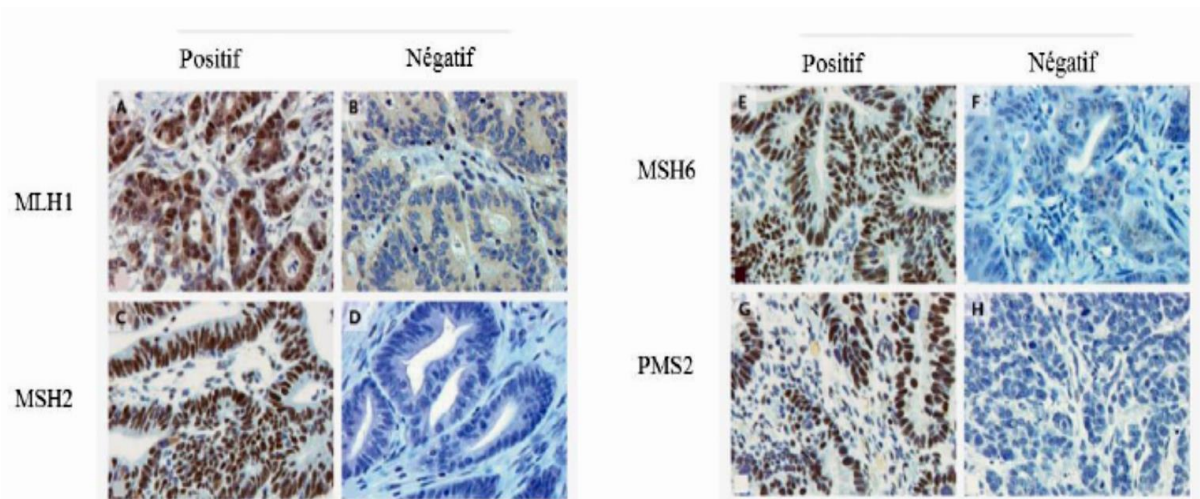


Figure 27 : Exemple de résultats d'immunohistochimie des protéines MMR. Des coupes histologiques d'adénocarcinome colorectal montrent la présence (gauche) ou l'absence (droite) d'expression des protéines MMR (Mojtahed et al., 2011).

N'ayant pas utilisé les deux techniques, il faut argumenter dans les deux sens : mise en place de stratégies de diagnostic et inconvénient du coût. Les avantages et les inconvénients des deux méthodes sont résumés dans le tableau D de l'annexe I.

4.6 Prise en charge de syndrome de Lynch

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

- **Recommandations de l'INCa**

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

La surveillance coloscopique repose sur une coloscopie totale, réalisée dans des conditions optimales, avec chromoendoscopie à l'indigo-carmin avec résection des polypes précancéreux. Elle doit être renouvelée tous les deux ans, dès l'âge de 20-25 ans, le risque de développer un CCR avant 25 ans étant très faible (*Vasen et al., 2007*). La surveillance endométriale est basée sur l'échographie endovaginale à réaliser tous les deux ans, à partir de l'âge de 30 ans. De plus, il est préconisé de surveiller les ovaires lors de cette échographie. En cas de dysplasie avérée, l'hystérectomie doit être réalisée.

Compte tenu des niveaux de risque et de l'absence de modalités consensuelles, aucune prise en charge n'est actuellement proposée pour les autres cancers du spectre. Il est néanmoins préconisé de coupler à la première coloscopie une fibroscopie, afin de rechercher une éventuelle infection à *H.Pylori*, et de procéder le cas échéant à son éradication.

Une surveillance coloscopique adaptée prévient la survenue de la moitié des CCR et réduit le taux de mortalité globale de 65%, grâce à un traitement précoce des lésions précancéreuses (*Järvinen et al., 2000*).

Les recommandations spécifiques de prise en charge ont fait preuve d'une réduction quasi complète de la mortalité liée au syndrome de Lynch (*Järvinen et al., 2009*). Ainsi, le dépistage du syndrome de Lynch, puis l'établissement du diagnostic par l'identification d'une mutation délétère d'un gène MMR sont primordiaux afin de pouvoir proposer une surveillance adaptée.

Diverses stratégies intégrant les critères cliniques et le phénotype tumoral ont été développées et évaluées afin d'améliorer la probabilité d'identifier une mutation constitutionnelle. Un exemple de stratégie recommandé par l'INCa (2011) est résumé dans la figure 28.

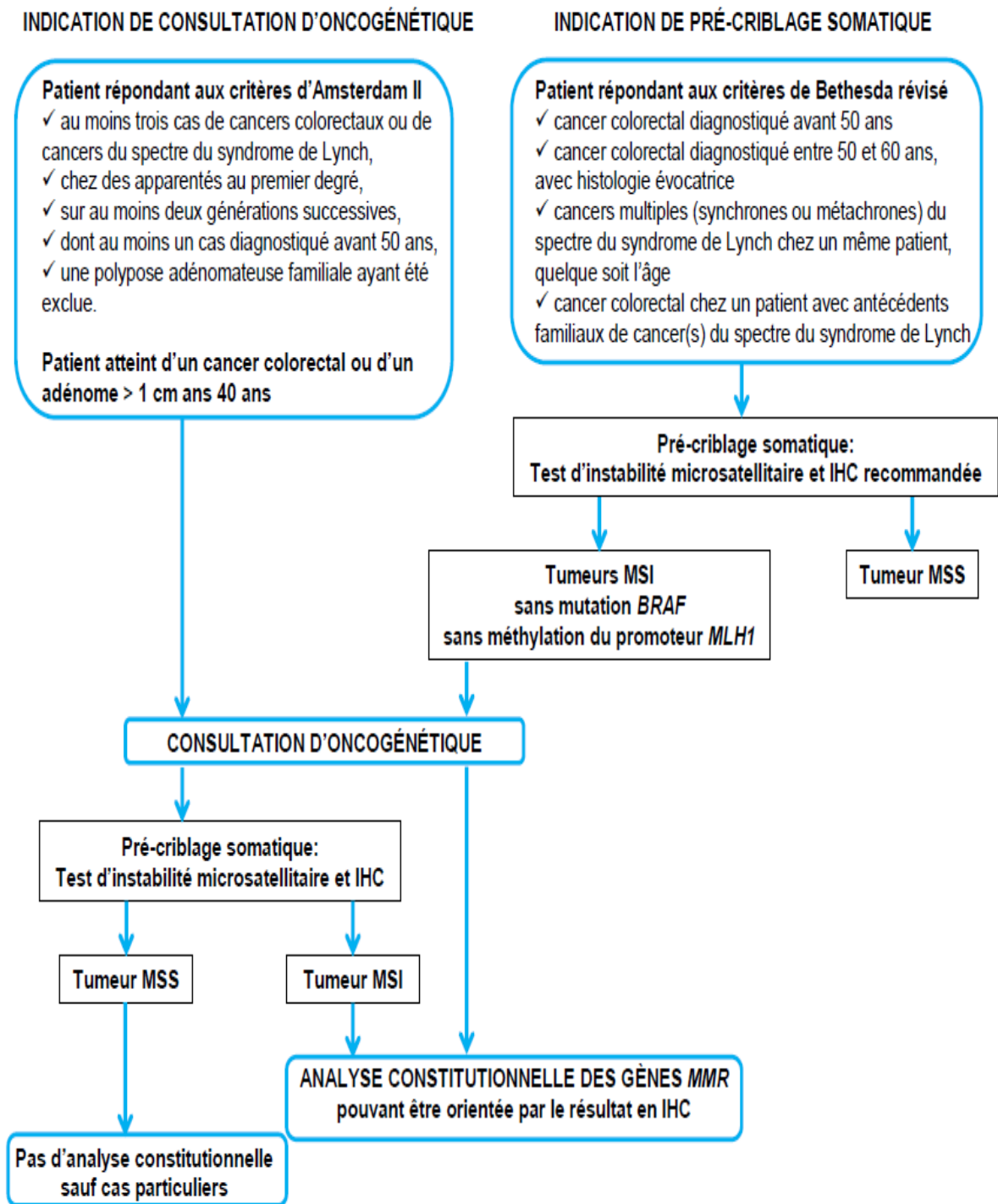


Figure 28 : Indications de consultation d'oncogénétique dédiée au syndrome de Lynch et d'analyse constitutionnelle des gènes MMR faisant appel à des critères cliniques et biologiques (La synthèse d'activité d'oncogénétique de l'INCa en 2011).

CHAPITRE II :
ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

1. Patients et Méthodes

1.1 Patients

L'étude que nous avons entreprise est descriptive dont son principal objectif est la recherche de mutations constitutionnelles sur les gènes de réparation de l'ADN (MMR) : *MLH1*, *MSH2* et *MSH6* dans les familles suspectées d' avoir un Cancer Colorectal (cas index et apparentés) de type HNPCC ou Syndrome de Lynch.

1.1.1 Recrutement des sujets (patient ou cas index et apparentés) :

Le recrutement des cas intéressants pour cette étude a duré 4 ans (2008-2012). Notre étude a porté sur 46 patients des deux sexes dont 27 cas index de Cancer colorectal et 19 apparentés au 1^{er} degré. Les patients sont inclus à la base de la mise en évidence du cancer colorectal en endoscopie avec la confirmation histologique. Ces patients sont admis aux services d'oncologie médicale (pour chimiothérapie et/ ou radiothérapie) et d'enterogastrologie du CHU de Constantine.

Les patients retenus dans cette étude génétique ont été sélectionnés selon les critères d'Amsterdam I (1991) (*Vasen et al., 1991*), II en (1999) (*Vasen et al., 1999*) et ceux de Bethesda (*Umar et al., 2004*) (Tableaux B, C Annexe I). Ces critères réunissent des informations individuelles et généalogiques qui définissent cliniquement un syndrome HNPCC.

➤ Critères d'inclusion :

Les critères typiques de syndrome HNPCC sont rarement présents en pratique clinique. Pour cela, ont été inclus les sujets des deux sexes et classés selon les groupes de patients :

- 1- Répondants aux critères complets d'Amsterdam I ou II (1999).
- 2- Répondants aux critères de Bethesda (2004) avec antécédents familiaux (comprennant les critères 4 et/ou 5) .
- 3- Répondants aux critères de Bethesda (2004) sans histoire familiale tumorale mais le diagnostic établi avant l'âge de 45 ans (comprennant le critère 1).

➤ Critères d'exclusion :

Tous les patients affectés d'un cancer du colon sporadique et au delà de l'âge de 50 ans ou présentant une polypose adénomateuse familiale sont exclus de cette étude.

1.1.2 Questionnaire, enquête familiale et consentement

- Le recueil des renseignements cliniques a été effectué à l'aide d'un questionnaire qui est soit réalisé directement avec le patient présentant un cancer du colon et/ou rectum ou indirectement à partir de son dossier médical.

- L'enquête familiale a été effectuée au travers d'un interrogatoire du patient ou d'un de ses parents. Pour tous les malades, nous avons précisé l'âge, le sexe, les antécédents personnels et familiaux du cancer colorectal, d'autres cancers, de consanguinité, d'agrégation familiale de cancer ainsi pour élaboration des arbres généalogiques les plus complets possible à partir de l'histoire familiale avec la maladie (Annexe II).
- Les consentements éclairés de tous les patients ainsi que tous leurs apparentés ont été obtenus soit des adultes eux-mêmes soit de leurs tuteurs pour les sujets mineurs (inférieur à 18 ans) (AnnexeII).

1.1.3 Prélèvement sanguin

➤ Mode de prélèvement

Le prélèvement sanguin préconisé pour l'étude génétique dont l'extraction de l'ADN est recueilli stérilement dans un tube de type Vacutainer à EDTA (*anticoagulant et un inhibiteur des nucléases*) en quantité de 6 à 10 ml. Les prélèvements du sang ont été réalisés au niveau du pli du coude après la pose d'un garrot.

➤ Conservation

L'extraction de l'ADN est réalisée normalement sur du sang frais. Il arrive dans certains cas de non possibilité technique, que l'échantillon sanguin soit stocké pendant une semaine à +4°C. Nous n'avons pas été contraint à congeler nos échantillons.

1.2 Méthodes

➤ Résumé des différentes étapes méthodologiques de l'étude :

La recherche d'altérations dans les gènes *MLH1*, *MSH2* et *MSH6* a été réalisée par une Polymerase Chain Reaction (*PCR*) suivie d'un séquençage pour la détection de mutations ponctuelles d'une part et par Multiplex Ligation Probe Amplification (*MLPA*) (*ou* amplification multiplex de sondes dépendant d'une ligation) pour étudier les grands réarrangements d'autre part selon les étapes suivantes de travail :

- 1- Extraction de l'ADN à partir du sang total par la méthode au NaCl :
 - Evaluation de la pureté et quantification de la concentration d'ADN ;
 - Evaluation de la qualité d'ADN extrait ;
 - Conservation des ADN purifiés.
- 2- Amplification par PCR de tous les exons ainsi que les séquences introniques adjacentes des gènes *MLH1* (19 exons), *MSH2* (16 exons+le promoteur) et enfin si nécessaire *MSH6* (10 exons).

- Contrôle des produits de PCR des différents exons par électrophorèse sur gel d'agarose.
- 3- Séquençage Direct.
 - Purification des produits de PCR ;
 - Réalisation des réactions de séquençage ;
 - Purification des produits de séquences ;
 - Réalisation de séquençage ;
 - Alignement des séquences obtenues et comparaison par rapport aux séquences de référence pour identification des variations retrouvées.
- 4- Bioinformatique.
- 5- Utilisation des ressources Software sur internet.
 - Etudes fonctionnelles *in silico* des différentes variations sur les gènes d'intérêt.
- 6- Statistiques.
- 7- Réalisation de la MLPA par utilisation des kits (*MRC HOLLAND*).
 - Kit P003 ;
 - Kit P248 ;
 - Kit P072.

1.2.1 Extraction de l'ADN

L'ADN est extrait à partir des leucocytes sanguins. Ce que nous avons employé comme technique d'extraction dans notre étude est une méthode utilisant un solvant inorganique NaCl (*Miller et al., 1988*).

Principe : L'extraction de l'ADN consiste en:

- L'isolement de leucocytes du sang total par une lyse hypotonique des globules rouges ;
- Le traitement par un détergent (*SDS*) et une protéinase K dans le lysat ;
- L'ADN nucléaire ainsi libéré est associé aux différentes protéines qui seront digérées et éliminées par précipitation au NaCl ;
- Le surnageant récupéré est traité par de l'éthanol pur dans lequel une pelote d'ADN se forme par précipitation ;
- L'ADN est solubilisé en phase aqueuse (*Tris-EDTA 10 :1*) (*Annexe II Protocole*).

➤ **Evaluation de la pureté et quantification de la concentration d'ADN**

La pureté de l'ADN et sa concentration sont estimées par spectrophotométrie à UV.

Principe: La pureté de l'ADN est déterminée par le rapport de DO_{260nm}/DO_{280nm} . La densité optique ou DO à 260 nm des solutions diluées au 1/100 est utilisée également pour le dosage de l'ADN, ce qui permet de calculer sa concentration, sachant que 1 unité DO correspond à 50 µg/ml d'ADN (Bienvenu et al., 1999) (Annexe II).

La pureté de l'ADN est essentielle. Dans le cas où l'ADN est contaminé (par des protéines ou de l'ARN) (Annexe II), ce dernier ne laisserait pas aboutir à un bon résultat dans les étapes suivantes de son analyse par PCR. Il est donc indispensable de procéder à une réextraction de la pelote de l'ADN afin d'obtenir la pureté souhaitée.

Dans notre étude, nous avons procédé à un dosage de l'ADN et préparé une dilution de travail à 100 µg/ml.

- Evaluation de la qualité d'ADN extrait

La qualité de l'ADN peut être vérifiée par un contrôle de taille des molécules d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% soumis sous tension d'un courant électrique de 100 volt pendant 2h. Cette analyse permet, par ailleurs, d'observer une éventuelle dégradation de l'ADN survenue au cours de l'extraction (Bienvenu et al., 1999). L'ADN génomique doit donc être manipulé en évitant toute action mécanique violente.

- Conservation des ADNs purifiés

Dans une boîte identifiée « ADN CCR » pour cancers colorectaux, les tubes d'ADN sont rangés et classés selon le numéro et la date du premier jusqu'au dernier échantillon. Ils sont conservés à +4°C jusqu'à utilisation (moins de 6 mois).

La conservation des ADNs purs lorsque les analyses sont terminées, se fait à -20°C pendant 7 ans ou encore à -80°C jusqu'à 30 ans (Madisen et al., 1987).

Les dilutions de travail (100 µg/ml) à partir de nos ADN purifiés sont conservés à +4°C dans une boîte identifiée, « ADNs dilués » où la durée de conservation va jusqu'à 1 an.

1.2.2 Amplification par PCR des exons de gènes *MLH1*, *MSH2* et *MSH6*

Les étapes d'amplification par PCR sont réalisées en deux temps sur les cas index :

- Amplification de tous les exons et les séquences introniques adjacentes des gènes *MLH1* (19 exons) et *MSH2* (16 exons + le promoteur) pour le séquençage.

- Si le séquençage *MLH1* et *MSH2* est négatif on procède à la PCR du gène *MSH6* (10 exons).

D'après les résultats obtenus après détermination des mutations identifiées chez le cas index, nous procédons à la sélection des exons mutés pour les séquencer chez les apparentés, ces exons sont amplifiés et traités en parallèle avec le cas index.

Principe: La technique «Polymerase Chain Reaction» ou PCR (ou encore ACP pour Amplification en Chaîne par Polymérase), est une technique de répllication ciblée in vitro (K.Mullis en 1985, Prix Nobel 1993).

L'amplification de séquences d'ADN à partir d'un échantillon complexe est réalisée par une succession de réactions de répllication d'une matrice double brin d'ADN.

Les amorces utilisées définissent, en la bornant, la séquence à amplifier. L'amplification obtenue est exponentielle en employant une ADN polymérase résistante aux températures élevées (la *Taq* polymérase).

Dans un milieu réactionnel (*Mix*), en plus de l'ADN à « amplifier » (*la matrice*) il faut un couple d'amorces oligonucléotidiques spécifiques, les précurseurs nucléotidiques (*dATP, dCTP, dGTP et dTTP*), le cation Mg^{2+} indispensable pour le bon fonctionnement de l'enzyme et à la polymérisation correcte des précurseurs et la *Taq* polymérase.

Les trois étapes, constituant un cycle de PCR, sont effectuées à des températures différentes permettant de contrôler l'activité enzymatique, de dénaturation, d'hybridation et d'élongation permettent de synthétiser les brins complémentaires d'ADN à partir des extrémités 3'OH libres des amorces hybridées. L'étape d'hybridation est spécifique et déterminée pour chaque brin à amplifier de chaque gène.

➤ **Préparation des PCR :**

- **Amorces utilisées pour les gènes *MLH1, MSH2* et *MSH6* :**

Les amorces utilisées dans notre étude pour l'amplification de gènes *MLH1* et *MSH2* (Tableaux 5 et 6) sont commandées dessalées à la concentration de 100 µM (Invitrogen, et Biomatik) réparties à la livraison en 3 aliquots 100 µM et 1 aliquot 5µM (solution de travail). Elles sont conservées à -20°C.

Tableau 5 :Séquences des amorces et tailles d'amplimers du gène *MLH1*

Nom	Séquence 5'-3'	Taille produit (pb)
MLH1-exon1F MLH1-exon1R	GGG AGG GAC GAA GAG ACC GCC CGT TAA GTC GTA GCC	373
MLH1-exon2F MLH1-exon2R	TTT TCT GTT TGA TTT GCC AAA GGT CCT GAC TCT TCC	171
MLH1-exon3F MLH1-exon3R	TTA CTC ATC TTT TTG GTA TC ACA ATG TCA TCA CAG GAG	177
MLH1-exon4F MLH1-exon4R	AAC CTT TCC CTT TGG TGA GG GAT TAC TCT GAG ACC TAG GC	226
MLH1-exon5F MLH1-exon5R	AGT AGT GGA GAA ATA AAC AG ACC CTG AAA ACT TAG AAG	318

MLH1-exon6F MLH1-exon6R	TAA GAC CTC GCT TTT GCC TCA GAG ACC CAC TCC CAG	309
MLH1-exon7F MLH1-exon7R	ACT AAA AGG GGG CTC TGA CAT CAA ACA GCA GAA GAC ACA AGG	257
MLH1-exon8F MLH1-exon8R	GAT GTT TCA GTC TCA GCC CAA AAT AAT GTG ATG GAA TG	223
MLH1-exon9F MLH1-exon9R	TAG TTT ATG GGA AGG AAC TGA GCA CAG ACT TAG GAC	386
MLH1-exon10F MLH1-exon10R	CTT TCC TGA GGT GAT TTC GTT CCT TGT GAG TCT TGG	233
MLH1-exon11F MLH1-exon11R	CCC CTC CCA CTA TCT AAG GCA AAG AAA GTT CCT AAA TAA C	304
MLH1-exon12SF MLH1-exon12F MLH1-exon12R	TTT TTA ATA CAG ACT TTG CTA CCA GGA CGG GCA GAA TTG CTT CTA TAA C GCA AGT CAG GCA GAG AGA AGA	645
MLH1-exon13F MLH1-exon13R	AGA GAA GTT GCT TGC TCC TCC ATT TCC AAA ACC TTG	312
MLH1-exon14F MLH1-exon14R	TCA GGC TTC TTT GCT TAC TTG G TAC CTC ATG CTG CTC TCC TTA	249
MLH1-exon15F MLH1-exon15R	CAA CTG GTT GTATCT CAA G ATT TTC AGA AAC GAT CAG	319
MLH1-exon16F MLH1-exon16R	GTT TCT CAC CTG CCA TTC TGA T TTG AAC TCC TGA CCC CAA GTT A	396
MLH1-exon17F MLH1-exon17R	TGA CAG CAT TAT TTC TTG CTT ATC ATC TTT ATC ATT CC	239
MLH1-exon18F MLH1-exon18R	CAC ATT TCG TTT TTT AGC ATT TTA GAG ATG GGC AAG	301
MLH1-exon19F MLH1-exon19R	AAC AGG GAG GCT TAT GAC TTT GGC ATC TGA ACT GAC	447

Tableau 6 : Séquences des amorces et tailles d'amplimers du gène MSH2

Nom	Séquence 5'-3'	Taille produit (pb)
MSH2-exon1F MSH2-exon1R	GCG TCT GCT TAT GAT TGG TTG CGC ACT GGA GAG GCT GCT	314
MSH2-exon2SF MSH2-exon2F MSH2-exon2R	TTT TTA AGG AGC AAA GAA TCT GC TTT TCT TCC CAG TCT CGG GTA T TTG CTA TTA AAG TGT CTC AAA CCA TTC	394
MSH2-exon3F MSH2-exon3R	CAT AGA GTT TGG ATT TTT C ACT AGA CTC AAT TTG CTT AC	388
MSH2-exon4F MSH2-exon4R	ATG TAG GTG AAT CTG TTA TC ATC CTT CTA AAA AGT CAC TA	347

MSH2-exon5F MSH2-exon5R MSH2-exon5SR	CAG TGG TAT AGA AAT CTT C CAA TCA ACA TTT TTA ACC TGA AAA AGG TTA AGG GCT CTG AC	239
MSH2-exon6F MSH2-exon6R	TCA CTA ATG AGC TTG CCA TT TAA TCA TGT GGG TAA CTG CA	241
MSH2-exon7F MSH2-exon7R	CGA CTT AGT TGA GAC TTA CG TAT GAG GAC AGC ACA TTG	360
MSH2-exon8F MSH2-exon8R	GAT CTT TTT ATT TGT TTG TTT TA? TCT TAA AGT GGC CTT TGC	210
MSH2-exon9F MSH2-exon9R	GTC ACT TTG TTC TGT TTG C AGT CAT CAT CTT GGG GAC	255
MSH2-exon10F MSH2-exon10R	CTG GTT AGA TAA TAA TTG TG CAT GTT AGA GCA TTT AGG	347
MSH2-exon11F MSH2-exon11R	ACA TTT GTC CCT AAG GAG CCA TAG ATG ACC CAA GAC	557
MSH2-exon12F MSH2-exon12R MSH2-exon12SR	AAT GGG AAA GGA TGT AGC CTG GGA ATT TTC TCC ATC AAA CAA AAC GTT ACC CCC ACA	575
MSH2-exon13F MSH2-exon13R	CTT CTC TTG ATG AAA GGC AGT CCA CAG GAA AAC AAC	584
MSH2-exon14F MSH2-exon14R	TGA TCC ATT ATG TTT GTG CCA AGT TCT GAA TTT AGA G	400
MSH2-exon15F MSH2-exon15R	CAA GGT GAG AAG GAT AAA TTC CA AAA CAC AGA GGA AAA CAA ACA ACA	301
MSH2-exon16F MSH2-exon16R	TGA AAC AAT TTG TCA CTG TCT AAC AT CAT GGG CAC TGA CAG TTA ACC A	377

Le séquençage de *MSH6* a été réalisé au laboratoire de Génétique Moléculaire (*Hopital Eurapéen Georges Pompidou, Paris*) avec le bigDye Terminator v3.1 et un séquenceur ABI 3730 XL en utilisant la batterie d'amorces qui concerne les 10 exons et les bornes intro-exons de ce gène. Ces amorces sont citées au niveau des databases de Pub Med.

- **Dilution des ADNs :**

À partir de nos tubes d'ADN conservés on réalise une dilution à 100µg/ml, les tubes sont marqués. Un plan de plaque est tracé (*Fiche de Suivi Techniques PCR*) (Annexe II), ensuite la plaque est orientée et identifiée.

➤ **Réalisation pratique de PCR des gènes *MLH1* et *MSH2*:**

Le tableau 7 résume l'ensemble des compositions pour la préparation du milieu réactionnel des PCR.

Tableau 7. Composition du milieu réactionnel des PCR.

Produit	Conc. finale	µl par tube
H ₂ O (<i>Eau ultrapure</i>)		10.4
Tampon II 10X (<i>Applied Biosystems</i>)	1x	2.5
MgCl ₂ 25mM (<i>Applied Biosystems</i>)	1,5mM	1.5
DNTPs 10mM, 2.5 mM chaque (<i>Applied Biosystems</i>)	200µM	2
Taq GOLD (<i>Applied Biosystems</i>)	0,625U/µl	0,125
Distribuer 16.5µl par tube, et ajouter dans l'ordre		
Am. F 5µM	0.6µM	3
Am. R 5µM	0.6µM	3
ADN 100µg/ml	250ng	2.5

Le programme sur thermocycleur (*Ref. Applied Biosystems Gene Amp PCR System 9700*) donne la succession des étapes d'amplification. Ce programme est identique pour l'ensemble des PCR des gènes étudiés (Fig.29).

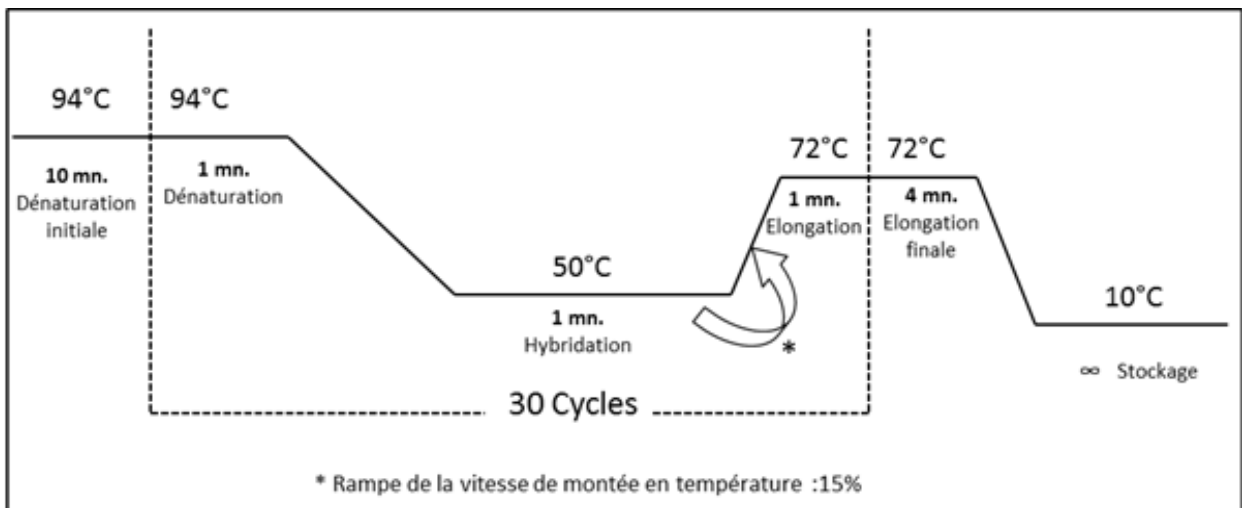


Figure 29 : Programme PCR des gènes *MLH1* et *MSH2*

➤ **Contrôle de la qualité et évaluation de la quantité de produits de PCR sur gel d'agarose**

Le contrôle de la qualité de l'ADN amplifié par migration se fait sur gel d'agarose à 2 % (électrophorèse sur cuve horizontale). La quantification de sa taille est estimée à partir de l'intensité émise par chaque bande.

- **Préparation des gels d'agarose et migration**

Pour 100 ml de Tris-Borate-EDTA (TBE) 1X + 2µl de Bromure d'Ethidium (BET) 10mg/ml 2g d'agarose (*EUROMEDEX type D5*) sont pesés.

3 µl de chaque amplicon sont déposés sur le gel d'agarose + 3µl de tampon de dépôt (*Bleu de bromophénol*) par puits et 5 µl de marqueur de poids moléculaire 100 pb (*Réf. EUROMEDEX M-214*). L'électrophorèse est réalisée à 120 Volts pendant 45 minutes dans du tampon TBE 1X. L'ADN amplifié est visualisé sous les rayons UV.

- **Contrôle de la taille, qualité et évaluation de la concentration des amplimers :**

L'évaluation de l'intensité de la bande cible est effectuée à partir du marqueur 100 pb contenant la bande 500 pb qui contient 75 ng d'ADN dans 3 µl.

Le calcul de la concentration de la bande cible : X fois 75ng dans 3µl. Soit X fois 75/3 conc. ng/µl.

A titre indicatif, les résultats de migrations de certains amplicons de la figure 30 sont présentés dans les figures 31 et 32. Les lettres L et S sont employées pour désigner les gènes *MLH1* et *MSH2* respectivement suivis par le numéro de l'exon amplifié correspondant.

Désignation	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12
F3.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F10.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F3.1	L13 +	L14 +	L15 +	L16 +	L17 +	L18 +	L19 +					
F10.1	+	+	+	+	+	+	+					
F1	+	+	+	+	+	+	+					
F2	+	+	+	+	+	+	+					

Figure 30 : Plaque d'amplification PCR du gène *MLH1* : chaque ligne contient l'ADN du patient mentionné par son code à gauche et chaque demi-colonne comporte le couple d'amorce de l'exon mentionné en haut.

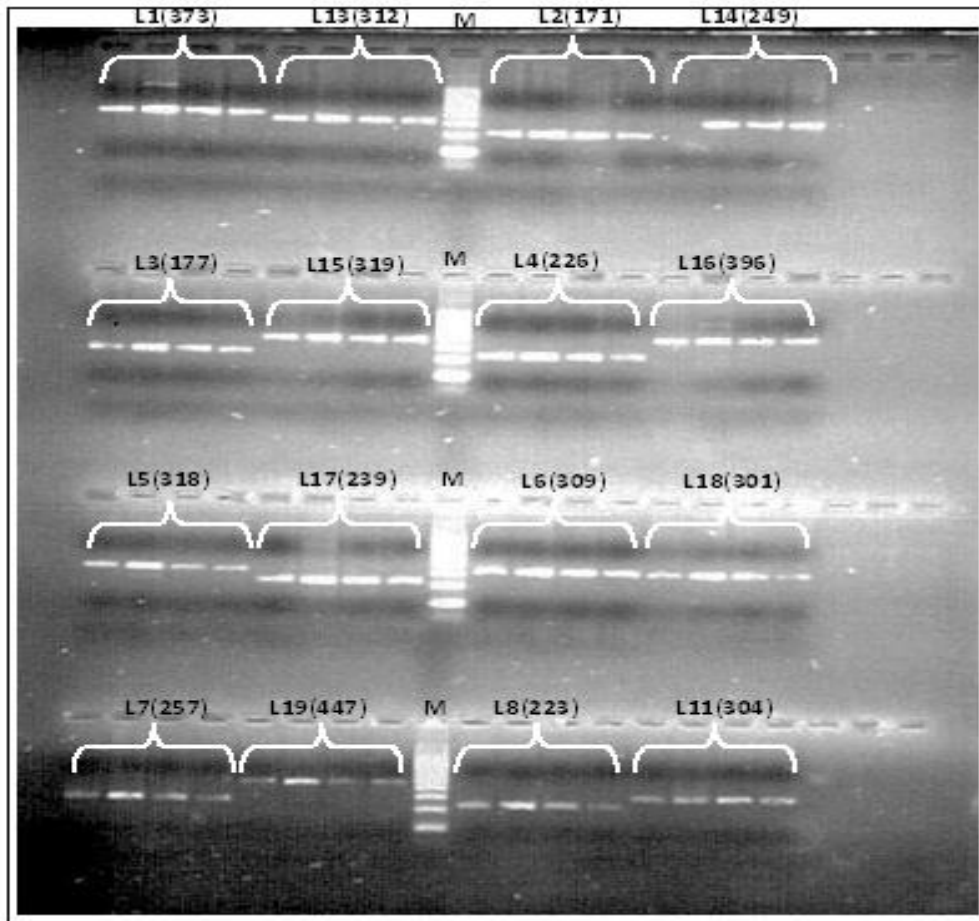


Figure 31 : Profil de migration (sur un gel d'agarose à 2%) des amplicons des exons de *MLH1* résultats d'amplification de la plaque PCR de la figure précédente (*M* :marqueur de tailles, *Ln* (taille de l'amplicon en pb où *n* est numero de l'exon).

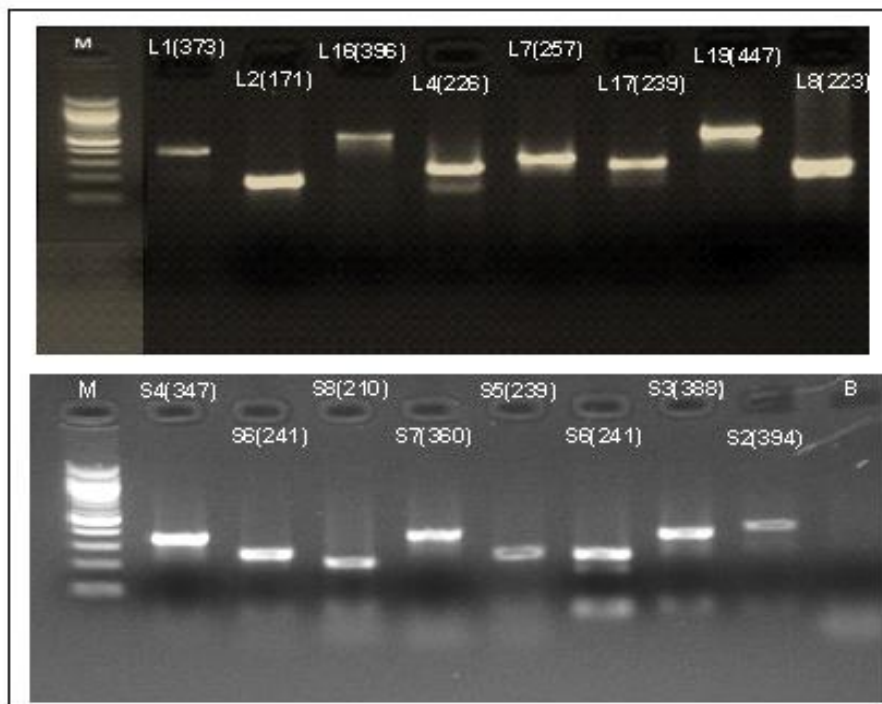


Figure 32 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose 2 % de certains exons amplifiés par PCR des gènes *MLH1*(*L*) et *MSH2* (*S*) du même patient (*F10.1*) (*M* :marqueur de tailles, *L/S* (taille de l'amplicon en pb).

1.2.3 Purification enzymatique du produit de PCR

Avant tout séquençage, il est impératif d'avoir des amplicons purs dans le tampon.

Ainsi nous procédons à une purification enzymatique.

Principe : il s'agit d'une activité exonucléasique de l'enzyme Exo Sap1 mise au contact des produits de PCR afin d'éliminer les dNTPs libres, les amorces non fixées et le MgCl₂ en excès et tous autres produits risquant de gêner les étapes suivantes de la manipulation.

8 µl ExoSap1 dilué au demi sont ajoutés aux 20 µl du produit PCR. La plaque est placée sur un thermocycleur (15 min 37°C puis 15 min 80 °C). Si nécessaire les produits sont dilués (de 8 à 12 ng/µl).

- Principe de séquençage

Le séquençage des gènes consiste en la détermination de l'ordre dans lequel les nucléotides sont incorporés dans une séquence d'ADN. La méthode la plus fréquemment utilisée pour ce fait a été mise en évidence par Fred Sanger (1970). Les nucléotides sont liés les uns aux autres grâce à des liaisons phosphodiester qui se forment entre le groupement OH en position C3' du ribose du premier nucléotide et le groupement phosphate en position C5' du ribose du deuxième nucléotide. La méthode de séquençage de Sanger utilise des nucléotides didésoxyribonucléotides (*ddNTP*) qui ont un atome d'hydrogène à la place du groupement OH sur le carbone 3' du ribose. L'allongement du brin d'ADN s'arrête donc au niveau ddNTP incorporé, d'où terminaison de la synthèse de l'ADN (*Sedivcová et al., 2013*). Ces ddNTP sont marqués chacun par un fluorochrome spécifique. Quatre fluorochromes différents qui émettent après excitation par un faisceau laser des fluorescences de couleurs différentes. Chacune de ces couleurs physiques est convertie en une couleur informatique par un logiciel dédié au traitement de ces différentes fluorescences (*Brandis, 1999*).

Un kit BigDye terminator v3.1 cycle sequencing. (*Applied Biosystem Ref 4337457*) est utilisé dans cette réaction qui permet l'amplification de chacun des brins des exons étudiés séparément en utilisant pour chaque exon, une fois l'amorce F (*forward*) et une autre fois l'amorce R (*reverse*). Ces brins sont placés dans des puits différents de la plaque et sont mis dans le thermocycleur suivant le programme adapté à cette étape.

1.2.4 Réaction de séquençage :

Toute expérience de séquençage est soumise à des conditions de travail strict avec des précautions de manipulation à respecter.

Dans la 1^{ère} partie du travail, la préparation du Mix est réalisée dans une chambre « pré-PCR » dans des conditions de stérilité, selon le protocole suivant :

- 13,4µl d'eau ;

- 2,6 µl Mix Bigdye ;
- 16µl de mix dans chaque puits sont distribués + 2 µl d'amorce à 5µM ;
- Par plaque : 2 puits sont laissés sans amorce pour l'orientation ;

La 2^{ème} partie du travail est effectuée dans une autre chambre « Pièce PCR » :

- La plaque recouverte d'un film autocollant est brièvement centrifugée ;
 - 2 µl de produit PCR purifié et dilué sont ajoutés dans chacun des puits de la plaque.
- La plaque est mise au thermocycler.

Programme thermocycler

- 96°C 30 sec
 - 96°C 20 sec
 - 50°C 5 sec
 - 60°C 4 min
 - 4° C infini
- } 30cycles.

A la fin de ces étapes, les deux brins d'ADN amplifiés en présence des chromophores sont soumis à une 2^{ème} étape de purification de séquence selon le principe ci-dessous.

1.2.5 Purification des produits de séquence

Cette procédure permet d'éliminer l'excès de nucléotides et d'amorces non incorporés dans la réaction ainsi que les sels. Cette étape est nécessaire pour avoir un échantillon pur pour un bon séquençage. Une purification des réactions des séquences est effectuée à l'aide de colonnes de gel d'exclusion d'une résine superfine.

La colonne de gel sephadex G50 est constituée de billes perforées dont les trous ont un diamètre déterminé (de 20 à 50 µm). Les petites particules de diamètre inférieur à ceux-ci entrent et sont piégées. A l'inverse, les grosses particules vont passer autour et être éluées très rapidement.

Mode opératoire :

Préparer la plaque de purification :

- Déposer la résine Sephadex G50 dans chaque puit (45µl) du chargeur de colonne ;
- Retirer l'excès de résine avec la raclette ;
- Placer la plaque MultiScreen HV à l'envers sur le chargeur jusqu'au butoir et retourner l'ensemble ;
- Taper sur le chargeur pour évacuer la résine vers la plaque ;
- Placer la plaque MultiScreen HV sur une plaque de microtitration ;
- Ajouter 290 µl d'eau ultrapure dans chaque puit ;
- Remettre le couvercle et laisser gonfler 2 heures à température ambiante ;

A ce stade les plaques peuvent être conservées à 4°C 2 jours.

Procéder à la purification :

- Centrifuger à 2450 tours/min pendant 5 min (à 18°C) l'ensemble du montage pour éliminer l'eau et compacter les mini colonnes ;
- Vider la plaque de microtitration ;
- Transférer délicatement les produits PCR au centre des colonnes sans toucher le gel. (*déposer goutte à goutte*) ;
- Centrifuger à 2450 tours/min pendant 5 min à 18°C ;
- Transférer le produit purifié sur une plaque adaptée à l'appareil du séquençage.

1.2.6 Électrophorèse capillaire :

Les produits de séquence purifiés sont analysés sur un séquenceur ABI Prism 3130XL (*Applied Biosystem*). Une électrophorèse capillaire en conditions dénaturantes va séparer les fragments d'ADN synthétisés en fonction de leur taille. L'enregistrement et l'analyse spectrale de la fluorescence spécifique du ddNTP permettra alors d'assigner la base correspondante et de déterminer la séquence nucléotidique du brin matrice.

Chaque base a donc un signal spécifique qui permet de l'identifier lors de son passage dans le faisceau d'un photomètre situé à la sortie du capillaire. L'analyse des signaux reçus est effectuée par un ordinateur permettant la reconstitution de la séquence d'ADN avec une grande précision.

Nous avons adapté ces étapes de séparation et d'analyse sur un analyseur à 4 capillaires dont la longueur est de 36 cm, comprenant un système électrophorèse, un laser et une caméra CCD (*Charge-Couple-Device*). Le support de migration est un polymère liquide (*pop7-ABI*) contenant le polymère de séparation, les sels nécessaires à la migration et l'urée (*conditions dénaturantes*). L'utilisation de capillaires permet d'appliquer une différence de potentiel plus importante (ddp de 12kV) que pour un appareil à plaques classique (ddp de 2,5kV) ; la migration des fragments d'ADN sera donc plus rapide (Annexe II, Fig.A) .

➤ **Analyses des séquences obtenues**

Les données brutes sont stockées sur l'unité informatique associée au système séquenceur et analysées par un logiciel (*Applied Biosystems*). L'analyse et l'interprétation des résultats du séquençage passent par les étapes suivantes (Annexe II) :

- 1) Validation de la qualité des séquences ;
- 2) Alignement des séquences sur une référence et corrections ;
- 3) Impression des graphes après corrections ;
- 4) Les graphes et les alignements sont placés dans le dossier-papier du patient ;

- 5) Les variations identifiées issues de la comparaison aux séquences de référence utilisées sont classées selon le type de chaque mutation entre polymorphismes, mutations pathogènes ou encore des variations de signification inconnue.

1.2.7 Bioinformatique

Les numéros d'accès aux bases de données internationales pour les séquences de référence sont énumérés comme suit (*gène, transcrit, protéine*) :

MLH1 (AC011816.17, NM_000249.2, NP_000240.1), *MSH2* (AC079775.6, NM_000251.1, NP_000242.1) et *MSH6* (AC006509.15, NM_000179.1, NP_000170.1).

Les changements d'acides aminés ont été déduits à partir des modifications de nucléotides par rapport à une séquence de référence de la protéine de base de données : UniProt, en utilisant ID: P40692 pour *MLH1* et ID: P43246 pour *MSH2*.

1.2.8 Ressources Web et Software utilisés pour études fonctionnelles *in Silico*

Tout variant de séquences d'ADN identifié a été confirmé par séquençage des deux brins d'ADN sur au moins deux produits de PCR indépendants. Les mutations retrouvées sont étudiées sur sites Web et logiciels spécifiques conformément aux bases de données internationales des mutations dans les gènes MMR tels que: The International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours (InSiGHT) <https://www.insight-group.org/>, Colon cancer gene variant databases (LOVD Leiden open variation database) (http://chromium.lovd.nl/LOVD2/colon_cancer/home) (Peltomäki and Vasen, 2004) et Universal Mutation Database (UMD® software) (Grandval et al., 2013) :

Les nomenclatures des mutations sont décrites en conformité aux dernières recommandations de nomenclatures des mutations sur le site (www.hgvs.org/mutnomen) et vérifiés à l'aide du programme Mutalyzer (<http://www.LOVD.nl/mutalyzer/>).

Des études fonctionnelles *In Silico* ont été menées pour certaines variations non répertoriées dans les bases de données citées ci-dessus. Les analyses de mésappariements faux sens sont réalisées afin de prédire les altérations sur la fonction des protéines par des outils informatiques tels que le SIFT, Polyphen2 (Adzhubei et al., 2010) et MAPP-MMR (Stone et Sidow, 2005)(Chao et al., 2008). Les Seuils <0.05 [SIFT], >2.0 [PolyPhen2] et >4.55 [MAPP-MMR] sont utilisés pour classer les variants délétères :

- Le logiciel SIFT (Sort Intolerant From Tolerant) (<http://sift.jcvi.org/>) utilise l'homologie de séquence entre les domaines et les gènes de la même famille pour déterminer le degré de conservation d'un résidu d'acide aminé, ainsi que les propriétés physiques des acides aminés pour prédire la pathogénicité d'un variant.

- PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2) (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) est un outil qui, en plus de la conservation des séquences, utilise l'information de la structure protéique et de la structure tridimensionnelle, lorsqu'elle est disponible, pour prédire les effets sur la structure secondaire et les sites fonctionnels de la protéine.
- MAPP-MMR (Multivariate Analysis of Protein Polymorphisms–Mismatch Repair) (<http://mappmmr.blueankh.com/>): quantifie la variation physico-chimique dans chaque colonne d'un alignement de séquences multiples et calcule l'écart des remplacements d'acides aminés candidats par rapport à cette variation (Stone et Sidow, 2005).

Les mutations dans les jonctions d'épissage GT-AG étaient considérés évidemment pathogènes (Houdayer et al., 2008). Les mutations introniques situées en dehors de la jonction d'épissage ont été analysées par trois logiciels différents, NNSPLICE version 0.9, Net-Gene2 et Human Splicing Finder (HFS) version 3.0 à l'aide des seuils de défaut qui leurs sont appropriés :

- NNSPLICE version 0.9 (Neural Network splice site predictor) (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) il sert à analyser la structure des sites donneurs et accepteurs d'épissage en utilisant un algorithme distinct qui reconnaît de façon optimale chaque site.
- Net-Gene2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2>) est appliqué pour la prédiction de l'emplacement du site d'épissage dans le pré-ARNm humain. Ce schéma de prédiction correspondant aux régions de transition entre les introns et les exons détecte les niveaux de coupure attribués aux sites d'épissage potentiellement présents sur une séquence.
- Human Splicing Finder (HFS) version 3.0 (<http://www.umd.be/HSF3/index.html>) est un outil destiné à l'étude de l'épissage de pré-ARNm, il utilise des algorithmes développés pour calculer les valeurs consensus des sites d'épissage potentiels et rechercher des points de branchements pour une séquence donnée.

La validation des résultats pour chaque test doit être effectuée avec au moins deux logiciels différents.

1.2.9 Statistique

Certains de nos résultats sont traités par des statistiques descriptives : calcul de la moyenne arithmétique, de l'écart type et les pourcentages.

1.2.10 Analyse des réarrangements par Multiplex Ligation dependent Probe Amplification (MLPA):

A la suite des résultats observés sur nos séquences, en cas d'absence de mutations ponctuelles, nous procédons à l'analyse par MLPA pour mettre en évidence d'éventuels réarrangements sur *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* et *EpCAM*. Cette technique permet la détection de remaniements génomiques de grande taille. La MLPA est utilisée pour la recherche de perte et/ou de duplication exonique (non visible lors du séquençage).

Principe : Il est basé sur une réaction de ligation de 2 oligonucléotides adjacents, formant une sonde après leur hybridation à des séquences cibles spécifiques, ce qui permet d'obtenir pour chaque locus un fragment amplifié de taille différente et de les quantifier par électrophorèse sur un séquenceur CEQ 8800. Chaque fragment peut alors être visualisé sous forme d'un pic qui selon son amplitude par rapport au témoin, permet la détection du nombre de copies en moins ou en plus, au niveau de ce locus (Fig. 33).

La MLPA comporte 4 étapes :

1. Hybridation

Après dénaturation, l'ADN des patients est mis en contact avec un Mix de sondes (amorces de ligation) pour une hybridation passive pendant 16 heures.

2. Ligation

La ligation ne se réalisera que si les 2 « amorces de ligation » se sont hybridées de façon spécifique et conjointe. La ligase raccordera donc la partie 3' à la partie 5' phosphorylée.

3. PCR

Après inactivation de la ligase par chauffage, on réalise une amplification des produits de ligation. L'amorce antisens est marquée en 5' par un fluorophore .

Durant le premier cycle de PCR, seul l'amorce Reverse s'hybride. Au moment du second cycle la deuxième amorce s'hybride également.

4. Étude de fragments

Migration des produits d'amplification sur le séquenceur CEQ 8800. Une étude de la perte ou amplification exonique est réalisée en comparant la hauteur des pics obtenue pour un patient avec celle des témoins supposés normaux, grâce à l'utilisation d'un programme de calcul informatique.

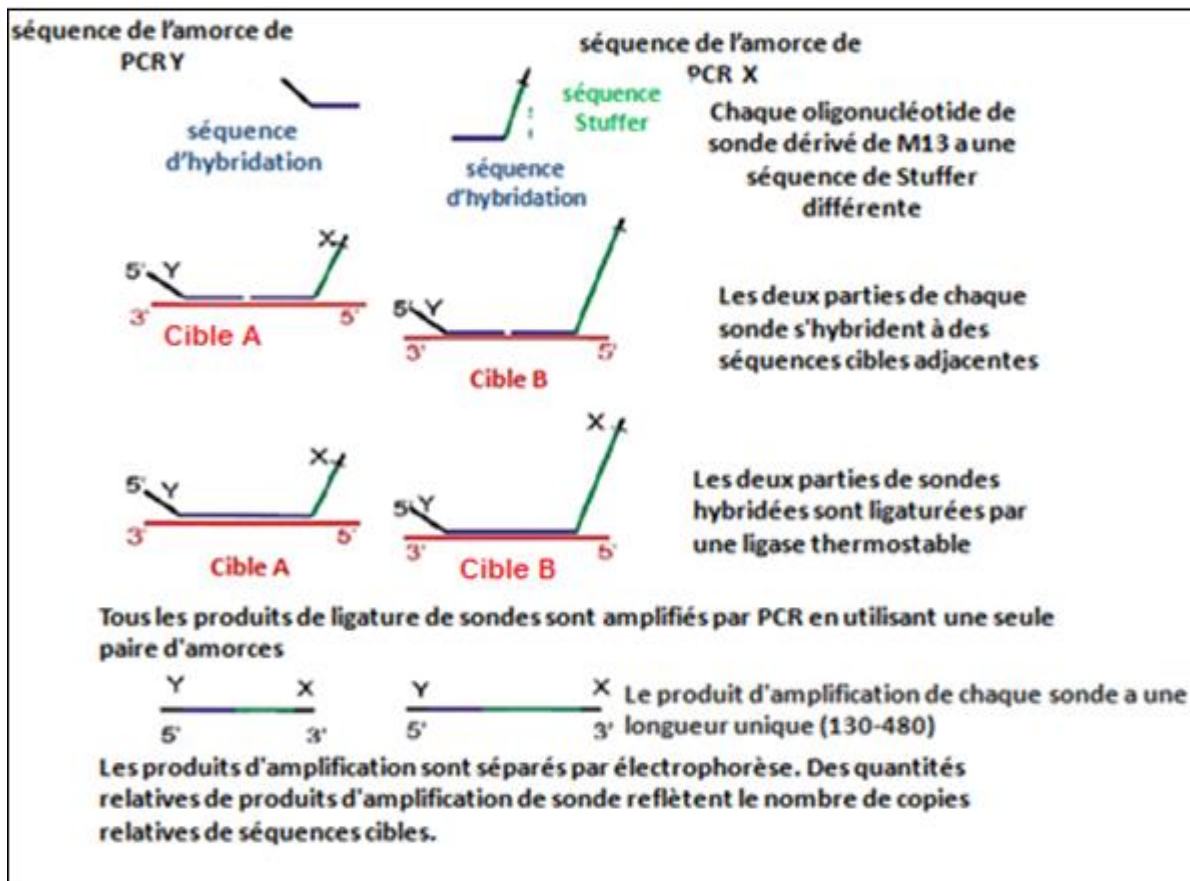


Figure 33 : Description de la réaction MLPA (Schouten et al., 2002).

➤ **Réalisation de la MLPA par utilisation des kits (MRC HOLLAND)**

Dans notre étude, nous avons utilisé trois kits spécifiques, commercialisés par MRC-Holland®, Netherlands (www.mrc-holland.com) selon les recommandations du fabricant.

- 1- Le kit SALSA MLPA P003 (ref : P003B1 MLH1/MSH2) est utilisé afin de rechercher des grands réarrangements sur un ou plusieurs exons de *MLH1* et *MSH2*. Le probemix contient 16 paires de sondes pour *MSH2*, 19 pour *MLH1* et 7 paires spécifiques de séquences à proximité de *MLH1* et *MSH2* y compris l'exon 9 du gène *EpCAM* (délétion entraînant la méthylation du promoteur *MSH2*).
- 2- Le kit SALSA MLPA P248 (ref : P248 MLH1/MSH2) est utilisé pour confirmation de l'étude des gènes *MLH1+MSH2*. Le probemix contient 16 paires de sondes pour *MSH2*, 19 pour *MLH1* et d'autres sondes spécifiques de séquences à proximité de *MLH1* tel que l'exon 26 de gène *LRRFIP 1* (*Leucine-Rich Repeat Flightless-Interacting Protein 1*) et exon 2 du gène *KCNK12* (*Potassium channel, subfamily K, member 12*) qui se retrouve juste en amont de *MSH2*.
- 3- Le kit SALSA MLPA P072 (Réf: P072B1MSH6) est utilisé pour rechercher d'éventuels remaniements sur les gènes *MSH6* et les exons 3,8 et 9 du gène *EpCAM*. Le probemix de ce kit renferme les sondes spécifiques aux 10 exons de *MSH6*, exons

3, 8, 9 de *EpCAM* ainsi que 7 paires de sondes correspondantes aux séquences à proximité des gènes étudiés comme : exon 1 du gène *MLH1*, promoteur et exon 1 de *MSH2*, exons 2, 3, 16 du gène *MUTYH (MutY Homolog)* et exon 2 de *KCNK12*.

Les produits de PCR de différente taille ont été analysés avec et les résultats étudiés à l'aide du logiciel GeneMapper® software, version 4.0 (*Applied Biosystems*).

Des échantillons d'ADN de témoins sains étaient utilisés comme contrôles à chaque manipulation. La hauteur de pic de chaque fragment était comparée à celles des contrôles. Une délétion ou une duplication était suspectée en cas de variation de taille supérieure à 50%.

Mode opératoire

1. Préparation des réactifs (Kit) : La composition des kits est mentionnée dans les fiches techniques du fabricant. Les sondes Probemix sont spécifiques du Kit, les autres réactifs (*MLPA buffer, Ligase- 65 buffer A, SALSA Ligase- 65, Ligase -65 buffer B, PCR buffer, PCR enzyme dilution buffer et PCR primers Mix*) sont communs à tous les kits.

Nous procédons à un aliquotage d'un kit lors de la première utilisation : 1 Kit contient 7 manipulations, chacune suffit pour 12 puits.

2. Etablissement de la liste des échantillons et des témoins

Pour une manipulation (12 puits), nous analysons les ADN de trois témoins normaux et ceux de 9 patients. Une feuille de travail est établie, sur laquelle sont tracés :

- Un plan de plaque pour l'hybridation/ligation nommée « année/ mois/ jour hybridation MLPA kit P xxx » ;
- Un plan de plaque pour la PCR nommée « année/ mois/ jour PCR MLPA kit P xxx ».

les plaques sont préparées et les puits sont fermés avec des barrettes jusqu'à utilisation.

3. Durée et déroulement de la manipulation :

➤ **Durée d'exécution :** la réalisation de cette technique est effectuée sur deux jours :

Jour 1 : préparation des dossiers patients + plan de travail + dilution des ADN et départ de l'hybridation en fin de journée (30 min + 16 heures d'hybridation) ;

Jour 2 : matin fin de l'hybridation suivie de la ligation puis réaction de PCR (3h) après midi : dépôt sur le Ceq 8800 (30 min + migration durant la nuit).

➤ **Le déroulement de la manipulation** est résumé dans la figure 34 alors que tout le protocole est bien expliqué en détail (Annexe II).

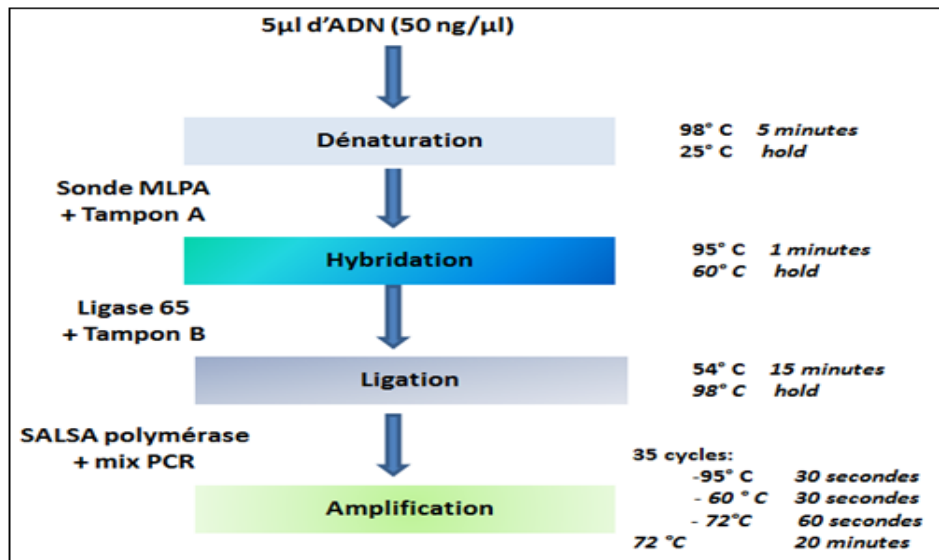


Figure 34 : Déroulement de la manipulation MLPA.

2. Programme du thermocycler :

Pour chaque kit MLPA Spécifique :

Hybridation - ligation : Programme A

- Etape 1 : 5 min à 98°C ;
- Etape 2 : 5 min à 25°C ;
- Etape 3 : 1 min à 95°C ;
- Etape 4 : 16 heures à 60°C (*hybridation*) ;
- Etape 5 : 15 min à 54°C ;
- Etape 6 : 15 min à 54°C (*ligation*) ;
- Etape 7 : 5 min à 98°C ;
- Etape 8 : ∞ à 4°.

PCR : Programme MLPA PCR

- 5 min à 95°C ;
- 30 sec. à 95°C ; 35 cycles ;
- 30 sec. A 60°C ;
- 1 min. à 72°C ;
- 20 min à 72°C ;
- ∞ à 4°C.

3. Etude de fragments : sur un séquenceur Ceq 8800 (Beckman Coulter)

Programme “frag 4 capillary” temperature 50°C.

- Dénaturation 90°C 120 sec ;
- Le temps d' injection (injection time) 30 sec ;
- Le temps de travail (run time) : 60 min.

Résultats et discussion

Dans cette partie expérimentale, nous avons procédé en la répartition et au classement des cas index ayant un CCR de type syndrome de Lynch, en fonction du sexe et de l'âge au moment du diagnostic. Ensuite, ont été prises en considération certaines caractéristiques cliniques : site tumoral, stade tumoral, existence d'autres localisations tumorales et antécédents personnels et familiaux de cancers. Puis nous nous sommes intéressés à décrire l'aspect génétique et héréditaire de cette pathologie chez les familles incluses dans l'étude (cas index + apparentés disponibles) en analysant les résultats de séquençage entier et de réarrangements génomiques par MLPA des gènes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* et le gène *EPCAM*.

2.1. Répartition de la population d'étude selon le sexe

Il a été inclus dans notre étude 46 sujets appartenant à 27 familles non apparentées (mentionnées F pour Famille suivie par le numéro d'enregistrement) répartis comme suit (Tableau 8) :

- 27 cas index présentant un CCR diagnostiqué et confirmé histologiquement.
- 19 apparentés au 1^{er} degrés (entre atteints et sains).

Tableau 8 : Répartition de la population d'étude selon le sexe (H : Homme et F : Femme).

cas index H	cas index F	apparenté H	apparentée F
13	14	9	10

Sur l'ensemble des probands de nos familles (27 cas), 52% sont de sexe féminin (soit 14 patientes) et 48% (13 cas) sont de sexe masculin, le sex ratio F/H montre un taux de 1,07.

2.2. Répartition des cas index selon le sexe et l'âge de diagnostic.

Les tranches d'âge de nos patients au moment de diagnostic pour les deux sexes sont représentées de la manière suivante dans la figure 35 :

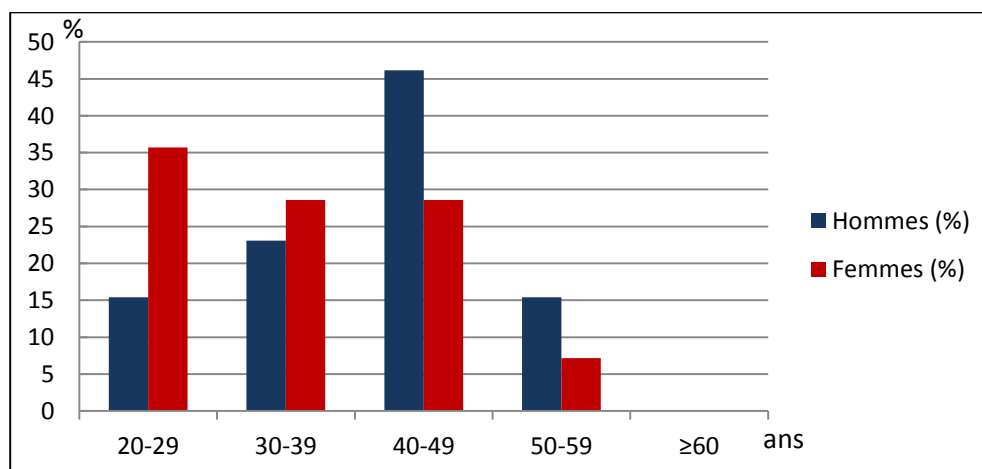


Figure 35 : Répartition de la population d'étude selon le sexe et l'âge de diagnostic.

La répartition des patients ayant le syndrome de Lynch selon le sexe indique que les deux populations féminine et masculine sont touchées de la même manière (13 hommes contre 14 femmes), cependant l'effectif de notre échantillon ne permet pas de tirer une conclusion. De fait, de nombreuses enquêtes ont observé une prédominance masculine pour ce cancer (Rougier P, 2004 ; Hamdi Cherif et al., 2014) et particulièrement pour le SL (Moussa et al., 2011) mais dans d'autres études algériennes similaires à la notre, cette prédominance n'est pas confirmée statistiquement (Meddah et al., 2009), Allem (2014) a observé que l'atteinte est voisine pour les deux sexes jusqu'à 60 ans.

Les résultats obtenus illustrent clairement que l'âge moyen de la survenue du CCR parmi nos cas probants est de 38,5 ans avec les deux extrêmes entre 20 et 57 ans. Puisque le syndrome de Lynch est caractérisé par une atteinte précoce du CCR, notre population d'étude paraît plus jeune avec les sujets âgés de moins de 50 ans qui représentent environ 89 % des cas. Ce résultat concorde avec les études de syndrome de Lynch dans plusieurs populations où l'âge median des patients ne dépasse pas 40 ans (Davidson 2007 ; Lynch et al.2008 ; Moussa et al., 2011). Cependant les travaux de Viguiet (2003), Rougier P.(2004) et Allem (2014) ont montré que l'atteinte par le cancer colorectal est rare avant l'âge de 50 ans où il ne représente que 6 %, alors qu'elle est 15 fois plus élevée chez les adultes plus de 50 ans que chez ceux de 20 à 49 ans, ceci peut être dû à l'accumulation croissante, avec le temps, de facteurs cancérogènes et la réduction, avec l'âge, des défenses de l'organisme.

Dans notre enquête, 38% des hommes et 64 % des femmes ont présenté ce cancer (SL) avant 40 ans, entre 40 et 50 ans, il est à noter une prédominance chez les hommes (46%), une nette régression est observée dans la tranche d'âge de 50 à 59 ans et aucun cas n'est retrouvé après 60 ans, Moussa et al. (2011) de Tunisie ont observé les mêmes concordances que dans notre échantillon pour cette forme de cancer.

Une des caractéristiques spécifique de notre population féminine est l'âge précoce de l'atteinte et de la morbidité avant 30 ans (Tableau 9, page 76).

2.3 Répartition des probants SL selon les caractéristiques cliniques

2.3.1. Répartition des patients SL selon le site primaire de la tumeur

Il est important de noter qu'un cancer du côlon proximal était défini comme siégeant au niveau du caecum, du côlon droit ou du côlon transverse ; un cancer du côlon distal était défini comme siégeant sur le côlon gauche et le côlon sigmoïde. Le rectum était considéré à part ainsi que les autres localisations extracoliques qui représentent le cancer de l'endomètre, de l'estomac et celui des ovaires. Dans notre étude, deux patientes ont présenté des atteintes extra-coliques : F16 et F18 ont eu un cancer de l'ovaire (Tableau 10, Fig. 36).

Tableau 10 : Distribution des cas de SL selon la localisation primaire de la tumeur.

Patients SL	Côlon proximal		Côlon distal		Rectum	Autres localisations SL
	Côlon droit	Côlon transverse	Côlon gauche	Côlon sigmoïde		Ovaire/ Endomètre /Estomac
Nombre	9	2	8	2	4	2
%	41		37		15	7

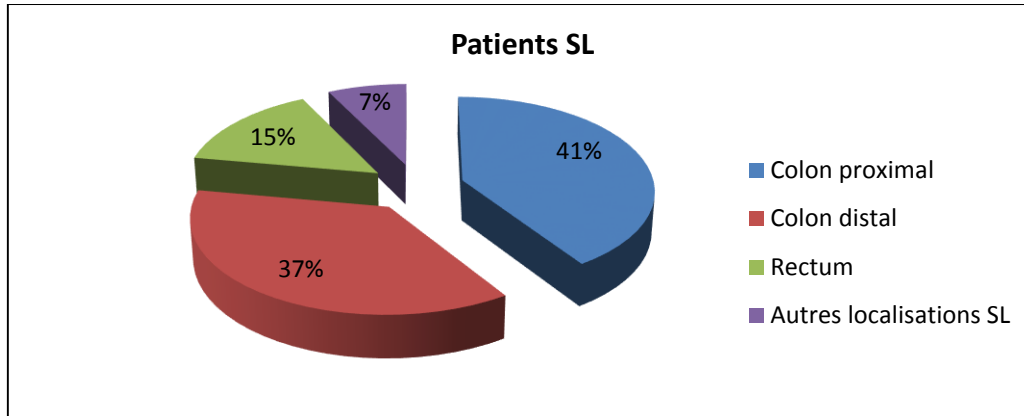


Figure 36 : Répartition des patients SL selon le site primaire de la tumeur.

Notre étude montre que l’atteinte maligne est plus marquée pour le côlon proximal (41%) ce qui est conforté par toutes les études qui ont démontré que les CCR dans le syndrome de Lynch ont tendance à avoir une localisation proximale avec une prédominance du colon droit (*Davies et al., 2005 ; Arriba et al., 2016 ; Bouguenouch et al., 2016*). Notre fréquence d’atteinte du colon proximal reste moins importante (41%) par rapport à la littérature qui atteint jusqu’à 70% (*Lynch et al., 2006*). Cette fréquence est suivie, par 37 % pour le côlon distal, inversement aux résultats d’autres études algériennes du CCR (*Meddah et al., 2009*) et certains registres occidentaux, qui ont montré que l’incidence du cancer du colon gauche est supérieure à celle du cancer colique droit (*Fabre et al., 2000 ; Jandova et al., 2015*).

Le cancer du rectum n’est présent que dans 15% de nos patients comme pour la quasi-totalité des études qui ont montré que l’atteinte colique prédomine souvent sur celle du rectum dans les CCR, nous citons :

- ✓ l’Institut National Du Cancer, le pourcentage des malades atteints d’un cancer colique est 73% alors que ceux qui avaient un cancer rectal est 27% (*La ligue contre le cancer, 2009*).
- ✓ l’Institut National de santé publique du QUÉBECTUT au Canada, montrant : 54% colon, 39% rectum chez les hommes et 62% colon, 29% rectum chez les femmes (*Perron and Ph, 2011*).

Les localisations extracoliques de SL (estomac et ovaire) présentes dans notre étude (7 %) (Fig. 36) sont diagnostiqués chez des femmes jeunes (moins de 30 ans) dans deux cas et une femme de 54 ans. Aucun homme ne présente de cancer extracolique (Tableau 9, page 76). Ces résultats sont similaires aux travaux de Bonadona et collaborateurs montrant que le risque du cancer de l’ovaire et celui de l’estomac dans un SL sont 8 % et 0,7 % respectivement (Bonadona et al.,2011).

Parmi nos résultats, une double localisation avait été notée chez deux cas (F3, F4) soit 7,4% des patients (Tableau 9, page 76). Il a été également observé la présence de tumeurs synchrones chez une patiente (F17) soit 3,70 % de nos cas, celle-ci a présenté un cancer de l’endomètre en plus de son atteinte primaire sur le côlon sigmoïde étendu. Les CCR ont la particularité d’être synchrones dans 45% des cas SL (Dionigi et al., 2007) et entre 1.1% à 8.1% parmi tous les cancers coloréctaux (Arriba et al., 2016), mais aussi métachrones après 10 ans dans 25 à 30% des cas (Lynch et al., 2008). La base moléculaire de ces tumeurs synchrones demeure encore mal connue jusqu’au nos jours (Arriba et al., 2016).

2.3.2. Répartition des patients SL selon le stade d’évolution de la tumeur

La classification TNM a fait l’objet d’un consensus international, le stade doit donc être donné selon la classification pTNM, qui distingue quatre stades notés de I à IV(Edge et Compton, 2010 ; Scoazec et Sabourin, 2010). La distribution de nos patients selon ces stades est illustrée dans la figure 37.

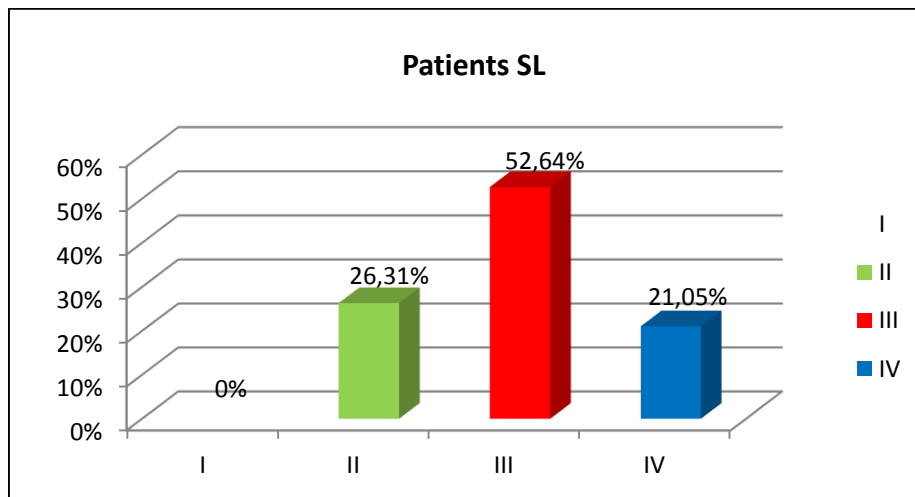


Figure 37 : Répartition des patients SL selon le stade de la tumeur.

D’après cette classification, la population étudiée présente une prédominance du stade III avec une fréquence de 52,64%, suivi du stade II à 26,31%, la fréquence du stade IV est de 21.05%, on note qu’aucun de nos patients étudiés n’appartient au stade I.

Cette distribution est proche de celle obtenue par Oukkal et Bouzid (2006) dans le centre Alger et celle retrouvée par l'étude épidémiologique effectuée sur l'Ouest algérien (Meddah et al., 2009).

Cependant le statut clinique dans nos résultats ne concorde pas avec certaines études de la littérature qui montrent que la proportion des malades CCR présentant les stades III et IV est moins fréquente (44.6%) que celle des stades I et II (55.4%) (Chan et al., 2010). Ces résultats s'expliquent par plusieurs causes :

- ✓ les patients arrivent aux centres cliniques à un stade tardif dû de l'absence de signes généraux de la maladie, par négligence, absence de douleur, manque de motivation, la peur du résultat, et une insuffisance d'informations.
- ✓ une survenue précoce du syndrome de Lynch dont le risque élevé de CCR n'est pas tant lié à l'initiation de la cancérogenèse qu'à une accélération de la séquence adénome-carcinome (Lynch et Chapelle, 1999). Dans le syndrome de Lynch, un adénome peut se transformer en adénocarcinome en l'espace de 2 à 3 ans, contre 8 à 10 ans chez une personne dans la population générale (Grady et Carethers, 2008).
- ✓ Les malades qui ne respectent pas une surveillance régulière, augmente pour eux le risque de récurrence.
- ✓ Il n'y a pas de compagnie médicale et sociale de dépistage et de prévention.

La survie des patients ayant un cancer colorectal dépend de différents facteurs pronostiques parmi lesquels, le stade du cancer, l'atteinte ganglionnaire et la présence de métastases (la classification TNM). Il est donc intéressant de connaître le stade d'évolution dans la mesure où le cancer colorectal est un cancer de bon pronostic lorsqu'il est diagnostiqué à un stade précoce. Le taux de survie relative à 5 ans varie en fonction de la classification TNM : 94 % pour les cancers diagnostiqués au stade I ; 80 % au stade II ; 47 % au stade III et 5 % au stade IV (Grosclaude et al., 2013).

2.4 Répartition des patients SL par rapport aux critères d'Amsterdam et de Bethesda.

Notre travail de tri des patients a porté sur l'analyse fine des questionnaires et du diagnostic. A partir des différentes données de ces enquêtes, nous n'avons recruté dans notre étude que ceux, chez qui les critères d'Amsterdam I/ II ou Bethesda sont réunis. Il faut noter que ces critères de reconnaissance du syndrome HNPCC ne sont pas pris en compte en pratique clinique du fait de leur rareté chez les patients atteints de CCR.

Nous avons réparti nos patients selon ces critères en trois groupes :

- 1- Patients répondants aux critères complets d'Amsterdam I ou II (1999).

- 2- Patients répondants aux critères de Bethesda (2004) avec antécédents familiaux (comprennant les critères 4 et/ou 5, tableau 9 page 76).
- 3- Patients répondants aux critères de Bethesda (2004) sans histoire familiale tumorale mais le diagnostic a été établi avant l'âge de 45 ans (comprennant le critère 1 tableau 9 page 76).

Les antécédents familiaux correspondent à l'atteinte d'au moins un apparenté jusqu'à l'agrégation familiale par un CCR ou d'autres tumeurs associées au SL (arbres généalogiques en annexe III). Les patients répondants aux critères d'Amsterdam I ou II comprennent obligatoirement des antécédents familiaux.

Il faut noter qu'un seul cas de nos patients (F17) s'est présenté avec une histoire personnelle et familiale et répondant aux critères de Bethesda (arbre généalogique en annexe III).

La répartition des cas SL selon les critères d'Amsterdam I/II et de Bethesda révisés avec ou sans antécédents familiaux est illustrée dans la figure 38.

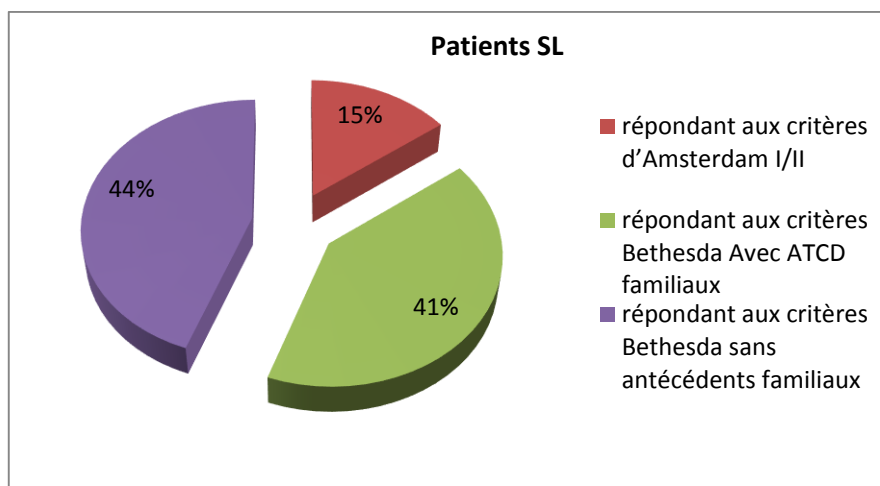


Figure 38 : Répartition des cas SL selon les critères d'Amsterdam I/II et de Bethesda avec ou sans antécédents familiaux.

D'après nos résultats, les critères d'Amsterdam I/II ne sont présents que chez 15 % (4 de 27) de nos familles ayant un SL, cette fréquence est moins importante par rapport à celle retrouvée dans les familles tunisiennes (38,7%) (Moussa et al., 2011). Les critères de Bethesda représentent la majeure partie de notre population d'étude avec une fréquence de 85% répartie en 44% sans antécédents et 41% correspondant aux jeunes patients moins de 40 ans sans histoire familiale de cancers. Ces critères se trouvent dans 58,1% des familles chez les tunisiens (Moussa et al., 2011). Nos résultats avec les critères de Bethesda sont corroborés par les travaux de Hampel et al. (2008) (72%) et Zahary et al. (2012) (100%).

Il apparaît que les critères d'Amsterdam II sont très spécifiques du syndrome de Lynch mais sont peu sensibles : un grand nombre de porteurs de mutations sur les gènes MMR ne répond

pas toujours à ces critères (*Olschwang et Eisinger, 2005*). Il ne faut donc pas se limiter à ces seuls critères pour l'accès à une consultation d'oncogénétique. Les critères de Bethesda établis en 1997 puis révisés en 2004 permettent d'identifier les familles à risque et de mutation du gène MMR (*Carneiro da Silva et al., 2015*). Ce qui pourra être recommandé dans le test d'instabilité de microsatellites sur les pièces de cancer colorectal. Bien que les critères de Bethesda sont plus sensibles que les critères d'Amsterdam pour identifier les familles à risques de SL, mais ils ne sont pas spécifiques parce que le statut MSI est présent sur 15 % des tumeurs sporadiques. Tout patient répondant aux critères d'Amsterdam ou Bethesda devrait avoir un test génétique pour confirmation (*INca 2011*).

2.5 Stratégie adoptée dans l'étude des gènes MMR impliqués dans la genèse du CCR

Pour l'étude moléculaire génétique, nous avons analysé les 27 cas index de départ suspectés d'avoir un syndrome de Lynch (13 hommes 14 femmes). Ensuite soumis au diagnostic clinique et analyses génétiques représentées dans le tableau **9**, page 76.

Tableau : Caractéristiques cliniques et Résultats des analyses moléculaires chez les familles HNPCC étudiées.

Cas index	sexe	âge de diagnostic (ans)	Critères remplis	site(s) de tumeur(s)	Gène	Mutation germinale			
						Changement nucléotidique	exon/intron	Conséquence	Classification des variants
F1	H	30	BETH (1)	CDis	MSH6	c.1-?_260 +?del c.[942+3A>T ; c.2210+11_2210+22del12]	exon 1 intron 5, intron 13	Défaut de splicing	5.Pathogène 5 .Pathogène 1.Non pathogène
F2	F	29	BETH (1)	CPro					
F3-1	F	46	AMS (II)	CPro					
F4	H	39	BETH (1)	R+CDis					
F5	H	40	BETH (1,4)	CPro					
F6	H	30	BETH (1)	CDis					
F7	F	30	BETH (1,5)	CDis					
F8	F	28	BETH (1)	CR					
F9	F	41	BETH (1,4)	CR					
F10-1	H	56	AMS (I)	CDis	MLH1	c.1020C>G	exon 11	p.(=)	3.probablement non pathogène
F12	H	41	BETH (1)	CPro	MLH1	c.881_884delTCAGinsCATTCT	exon 10	Défaut de splicing ?	5.Pathogène
F13	H	45	BETH (1,5)	CPro					
F14	F	43	BETH (1)	CPro					
F15	H	41	BETH (1)	CPro					
F16	F	20	BETH (2,5)	COV					
F17-1	F	46	BETH (1,2,4)	CDis+ CEN					
F18	F	53	BETH (2,4)	COV					
F19-1	F	30	BETH (1)	CDis					
F20	H	27	BETH (1,5)	CDis					
F21	H	25	BETH (1)	CDis					
F22	H	40	BETH (1)	CPro					
F23	F	26	AMS(1)	CDis					
F24	F	32	BETH(1)	CPro					
F25	F	31	BETH (1,5)	CPro					
F26	F	24	BETH (1,4)	CR					
F27	H	44	AMS(III)	CDis	MSH2	c.[1030C>T:c.728G>A]	exon 6, exon 4	p.Gln344X, p.Arg243Gln	5.Pathogène 2.Unconnue
F28	H	57	BETH (4)	CPro					

Sexe: F femme, H Homme, Ams critères d'Amsterdam I/II, Beth critères de Bethesda révisés (1–5) (Tableaux B-C Annexe I), Sites de la tumeur : CPro : Colon proximal (caecum, « ascendant » et transverse), CDIs: Colon distal (colon gauche « descendant » et sigmoïde), CR: Cancer du rectum, CEN: cancer d'endomètre, COV:Cancer de l'ovaire.

Etude des gènes MMR par séquençage

Nous avons identifié quatre variants pathogènes ; trois détectés par séquençage de *MLH1* et *MSH2* dans les familles HNPCC remplissant les critères d'Amsterdam I / II . le quatrième variant du gène *MSH6* est déterminé par MLPA chez une jeune femme CCR.

A. Variants pathogènes de *MSH2*, *MLH1* et *MSH6* et données cliniques des malades

1. Gène *MSH2*

Les mutations dans ce gène sont très fréquemment retrouvées et distribuées sur toute la longueur du locus. Dans nos analyses par séquençage de ce gène, nous avons observé principalement quatre variants c.942+3A>T, c.2210+11_2210+22del12, c.1030C> T et c.728G>A.

- Le variant c.942 + 3A> T

Ce variant de *MSH2* a révélé une transition A > T au niveau du nucléotide 3 du site d'épissage donneur 3' de l'exon 5 (Fig. 39), la conséquence en est une protéine tronquée de la partie codée par cet exon composée de 49 AA (val 265 à Gln 314), p.Val 265_Gln314del (Fig. 40), bien que cette portion déletée n'appartienne à aucun domaine d'interaction de la protéine avec l'ADN ou avec les autres facteurs du complexe MMR, elle a un effet délétère sur la fonction globale selon les travaux de *Chan et al. (1999)*.

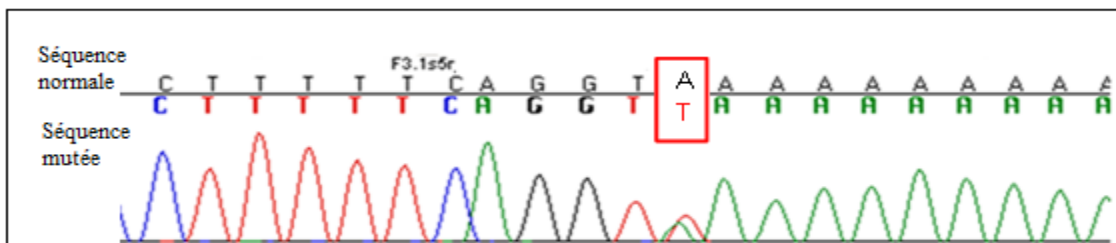


Figure 39 : Chromatogramme du séquençage au début de l'intron 5 de gène *MSH2* touchant le 3^{ème} nucléotide chez le cas index F 3.1 et 5 autres membres de la famille F3.

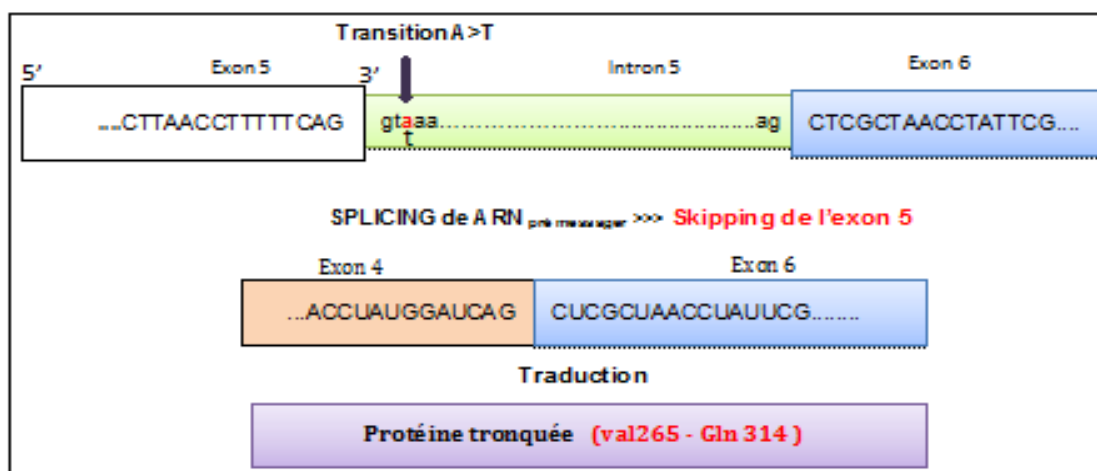


Figure 40 : La mutation c.942 + 3A> T touche un site donneur de l'épissage de l'exon 5. Il en résulte une délétion « skipping » de tout l'exon 5 et par conséquent la protéine sera tronquée de toute la partie codée par cet exon (49 AA) (val265 jusqu'au Gln 314).

Nous avons identifié cette substitution génomique, c.942 + 3A> T dans le gène *MSH2* du cas index de la famille F3, F3-1. Il s'agit d'une femme de 46 ans qui a présenté un cancer du côlon droit dont la colonoscopie indiquait un processus ulcero-bourgeonnant à double localisation angulaire droite et transverse droite. L'anatomopathologie a montré la présence d'un adénocarcinome (ADK) bien différencié infiltrant la paroi séreuse (stade III). La patiente n'avait aucun antécédent tumoral personnel, cependant l'histoire familiale révèle une atteinte chez deux parents au premier degré : la mère ayant présenté un carcinome du colon droit et la sœur un ADK de l'intestin grêle qui lui a été diagnostiqué à 38 ans. Cette agrégation tumorale dans cette famille de l'Est algérien donne un arbre généalogique qui répond typiquement aux critères d'Amsterdam II (Annexe I, Tableau A). Dans cette famille, parmi 8 membres examinés, 6 ont montré cette mutation familiale du gène *MSH2* (Fig. 42). Le sang de deux enfants du cas index (parent 5(III₈) et parent 6 (III₁₀)) a été prélevé et analysé pour le gène cible ; un résultat positif pour le variant pathogène a été détecté chez ces enfants et par la suite confirmation, après trois ans, du diagnostic clinique de l'atteinte tumorale. Ceci vérifie la relation cause à effet de ce variant avec la pathologie. Le diagnostic génétique au sein de cette famille a été utile pour la découverte précoce de la maladie. Ceci conduit au dépistage et à la prise en charge des membres porteurs de la mutation familiale. La présence de ce variant dans la famille F3 confirme sa corrélation avec le syndrome de Lynch déjà décrite dans l'étude de Liu et collaborateurs (Liu et al., 1994). Le variant c.942+3A>T est connu par son effet pathogène (Warden et al., 2013) vérifié par différents tests fonctionnels *in silico* et *in vitro* confirmant ainsi son implication directe dans le HNPCC à un âge jeune (moins de 45 ans) (Pensotti et al., 1997) et son association avec une haute instabilité des microsatellites (Chan et al., 1999)(Valentin et al., 2011).

Ce génotype muté a été identifié dans plusieurs populations à travers le monde : Japan (Miyaki et al., 1995 ; Miyaki et al., 2004), Italie (Viel et al., 1997), Colombe (Hampel et al., 2005), Chine (Sheng et al., 2008), et au Brésil (Carneiro da Silva et al., 2015) en association directe avec l'atteinte colorectale. Au Canada (Terre-Neuve-et-Labrador), cette mutation récurrente se caractérise par un effet fondateur dans la mesure où elle représente 27% de tous les HNPCC, ce variant peut survenir soit spontanément qui résulterait probablement d'une influence par l'environnement soit provenir de nature génétique ou les deux ensemble (Desai et al., 2000).

- Le variant c.2210+11_2210+22del12

Nous avons identifié un nouveau variant, c.2210 +11_2210 + 22del12 situé sur l'intron 13 du gène *MSH2* chez les membres de la même famille, F3. Il s'agit d'une

microdélétion de 12 nucléotides à proximité de la région 5' de l'intron 13 (Fig. 41). Sachant que la mutation délétère c.942+3A>T est retrouvée également chez les 6 membres, alors que ni la mutation familiale, ni le variant de l'intron 13 ne sont trouvés chez les deux autres membres (*II₄* et *II₆*) (Tableau 11) . La coségrégation de ces deux variants pourrait être expliquée par, leur probable localisation en cis sur le même allèle ce qui conduit à leur coségrégation lors de la méiose.

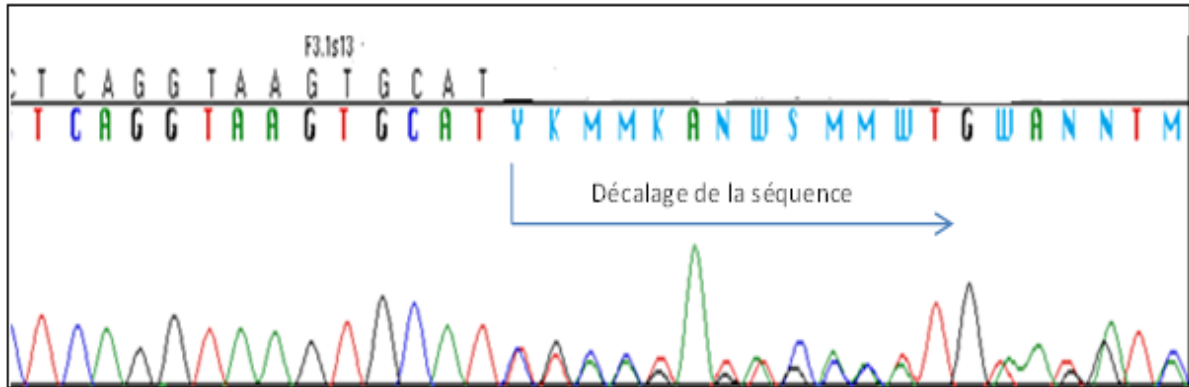


Figure 41 : Chromatogramme de séquençage du variant c.2210 +11_2210 + 22del12 sur *MSH2* chez 6 membres de la famille F3.

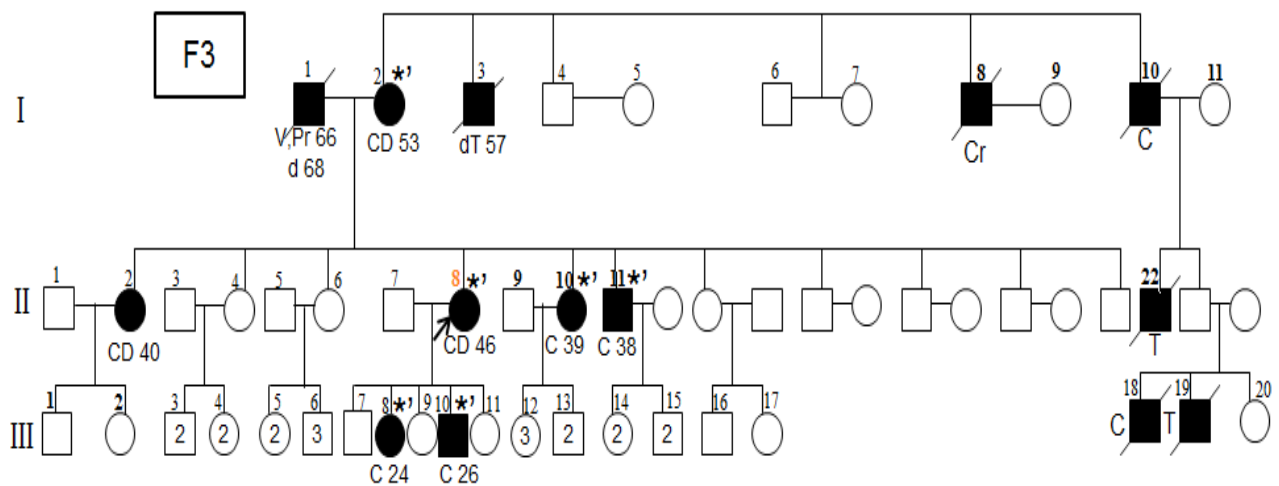


Figure 42 : Arbre généalogique de la famille F3 porteuse à la fois les variants c.942+3A>T désigné par (*) et c.2210 +11_2210 + 22del12 désigné par (') situés sur le gène *MSH2*. L'âge au moment de diagnostic est désigné par un chiffre, l'âge de décès par un chiffre précédé de la lettre « d ». Les types de cancer(s) sont désignés par les symboles suivants : C cancer du colon, CD cancer du colon droit, R cancer rectal, CG cancer du colon gauche, Cr cancer du cerveau, T tumeur d' origine incertaine, V cancer de la vessie, Pr cancer la prostate.

Tableau 11 : Corrélation génotype/phénotype de la présence ou l'absence des deux variants détectés chez les différents membres analysés de la famille F3.

Sujet analysé	c.942+3A>T	c.2210+11_2210+22 del12	Phénotype
Cas index (II ₈)	Présence	Présence	Atteint
Parent 1 (mère I ₂)	Présence	Présence	Atteint
parent 2 (sœur 1 II ₄)	Absence	Absence	Sain
Parent 3 (sœur 2 II ₆)	Absence	Absence	Sain
Parent 4 (sœur 3 II ₁₀)	Présence	Présence	Atteint
Parent 5 (la fille III ₈)	Présence	Présence	Atteint
Parent 6 (le fils III ₁₀)	Présence	Présence	Atteint
Parent 7 (frère II ₁₁)	Présence	Présence	Atteint

Nous avons essayé de caractériser davantage le variant de l'intron 13, c.2210+11_2210+22del12 par analyse *in silico* : bien que le logiciel Human Splice Finder (<http://www.umd.be/HSF3/HSF.html>) ait démontré une variation significative dans un site accepteur d'épissage entre le «type sauvage» et la séquence "mutée", mais il n'a présenté aucune variation significative dans le principal site donneur d'épissage. Ce résultat est confirmé par l'analyse avec les deux autres logiciels:

- Net-Gene2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2>).
- NNSPLICE (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html).

Le variant c.2210+11_2210+22del12 n'est pas répertorié dans les bases de données des variations sur le gène *MSH2*, ainsi il est détecté la première fois dans notre famille algérienne. D'après les résultats des tests fonctionnels effectués, on pourrait ignorer l'effet délétère du variant c.2210+11_2210+22del12 relié à cette pathologie. Pour illustrer ces résultats, ci-joint les fiches analytique détaillées (Fig.43, 44 et 45) :

Human Splicing Finder

GENETICS & BIOINFORMATICS TEAM

Home
Analyse Now!
What's New?
Help & Tutorials
Credits & Publications
Our Other Tools
Contact Us

Other Analysis

Results

▼ Sequences

The mutation is emphasized in red, and the wild-type nucleotide whose position is those of the mutation in green.

Reference sequence

1 Ggtaagtgca tctcctagtc ccttgaagat agaaatgtat gtctctgtcc tgtgagaagg aaaagtatat ttgcagattc tcatgtaaaa acatctgaga
 101 atgtttgtct tagttaaata gttgttttcc tgtggacttt atatac
 Total sequence length: 146 nucleotides

Mutant sequence

1 Ggtaagtgca t----- ---tgaagat agaaatgtat gtctctgtcc tgtgagaagg aaaagtatat ttgcagattc tcatgtaaaa acatctgaga
 101 atgtttgtct tagttaaata gttgttttcc tgtggacttt atatac
 Total sequence length: 146 nucleotides

The sequences analyzed in HSF are underlined.

Perform a quick mutation ?

Potential splice sites
Potential Branch Points
Enhancer motifs
Silencer motifs
Other motifs

▼ HSF Matrices

Sequence Position	cDNA Position	Splice site type	Motif	New splice site	Wild Type	Mutant	If cryptic site use, exon length variation	Variation (%)
5	+5	Acceptor	agtgcctcctag	agtgcattgaagAT	23.49	73.52	NA	New site +212.98
7	+7	Acceptor	tgcctcctagtc	tgcattgaagatAG	77.44	40.82	NA	Site broken -47.28
9	+9	Acceptor	catctcctagccc	cattgaagatagAA	19.29	70.54	NA	New site +265.68
17	+17	Acceptor	agtccttgaagat	tgaagatagaaaTG	78.01	36.75	NA	Site broken -52.89
21	+21	Acceptor	ccttgaagatagaa	tgaagatagaaaTG	72.6	36.75	NA	Site broken -49.38

▶ MaxEnt

▼ Interpreted Data

This table shows only relevant results related to the mutation position and context.
 The mutation occurs in the deep intronic positions, the following table show results of splicing and auxiliary sites that could be created by the mutation

Predicted signal	Prediction algorithm	cDNA Position	Interpretation
New ESE Site	1 - ESR Sequences from Goren et al.		Creation of an intronic ESE site. Probably no impact on splicing.
	2 - PESE Octamers from Zhang & Chasin		
	3 - EIEs from Zhang et al.		
	4 - RESCUE ESE Hexamers		

2013/2014 © Human Splicing Finder - Designed by Ghadi Rai - All rights reserved
 Inserm UMR_S910 - Aix Marseille Université, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 05

Figure 43 : Utilisation de logiciel Human Splice Finder (HSF) v3.0 pour le variant c.2210+11_2210+22del12 du gène *MSH2* chez la famille F3.


```

***** NetGene2 v. 2.4 *****

The sequence: intron has the following composition:

Length: 337 nucleotides.
27.6% A, 16.6% C, 24.9% G, 30.9% T, 0.0% X, 41.5% G+C

Donor splice sites, direct strand
-----
      pos 5'->3'  phase strand  confidence  5'      exon intron  3'
          16      -      +      0.00     AATATGGGAG^GTAAATCAAC
          85      1      +      0.00     TTTGTGCCAT^GTGAGTCAGC
         205      2      +      0.47     CTATCCTCAG^GTAAGTGCAT

Donor splice sites, complement strand
-----
      No donor site predictions above threshold.

Acceptor splice sites, direct strand
-----
      pos 5'->3'  phase strand  confidence  5'      intron exon  3'
         204      0      +      0.25     CTATCCTCAG^GTAAGTGCAT

Acceptor splice sites, complement strand
-----
      pos 3'->5'  pos 5'->3'  phase strand  confidence  5'      intron exon  3'
         241      97      0      -      0.54     CTTCTCACAG^GACAGAGACA

-----

CUTOFF values used for confidence:

Highly confident donor sites (H):      95.0 %
Nearly all true donor sites:          50.0 %

Highly confident acceptor sites (H):   95.0 %
Nearly all true acceptor sites:        20.0 %
    
```

Figure 44 : Utilisation de logiciel NetGene v 2.4 pour le variant c.2210+11_2210+22del12 du gène *MSH2* chez la famille F3.

```

NNSPLICE 0.9 version (January 1997) of the splice site predictor.

Splice site predictions for 1 sequence with donor score cutoff 0.40,
acceptor score cutoff 0.40 (exon/intron boundary shown in larger font):
Donor site predictions for 105.106.149.59.18884.0 :

Start  End  Score  Exon  Intron
   9   23   0.97  atgggagGtaaataca
  78   92   0.97  gtgccatGtgagtca
 198  212   1.00  tcctcagGtaagtgc
 221  235   0.83  tagaaatGtatgtct

-----

Acceptor site predictions for 105.106.149.59.18884.0 :

Start  End  Score  Intron  Exon
  184  224   0.68  ggaaactgcttctatcctcaGgtaagtgcattgaagataga
    
```

Figure 45 : Utilisation de logiciel NNSPLICE 0.9 pour le variant c.2210+11_2210+22del12 du gène *MSH2* chez la famille F3.

- Le variant : c.1030C> T

Chez le probant de la famille F27 qui a été diagnostiqué avec un adénocarcinome du côlon gauche à 44 ans, nous avons trouvé une mutation non-sens sur le gène *MSH2*, il s'agit d'une transition d'une C à une T dans l'exon 6 ainsi désignée : c.1030C> T (p.Gln344X). Cette mutation conduit au remplacement du codon 344 par un codon stop prématuré, ce qui donne une protéine tronquée .

L'évaluation du pedigree de la famille est conforme aux critères d'Amsterdam II utilisés pour le diagnostic du SL. L'histoire de la famille comporte deux membres de la même génération avec un cancer colorectal avant l'âge de 50 ans (Fig.46).

Le variant c.1030C> T (connu sous le code dpSNP : rs63750245) du gène *MSH2* conduisant à un signal d'arrêt de traduction au niveau du codon 344 se trouve dans la base de données internationale HNPCC, InSiGHT (Thompson et al., 2014) (<http://www.insight-group.org/mutations>) et la base française UMD®(Grandval et al., 2013). Il a été signalé, à plusieurs reprises, dans différentes populations associé à un statut MSI-H (Bartosova et al., 2003) (Rey et al., 2004).

Ce variant a été décrit comme une mutation pathogène selon la classification d' InSiGHT (Thompson et al., 2014). Peltomäki (2001) d'une part et Berginc et al. (2009) d'autre part ont indiqué que la plupart des défauts génétiques associés à l'HNPCC résultent de mutations non-sens, frameshift, ou de site d'épissage, engendrent la synthèse des protéines plus courtes et par conséquent inactives.

- Le variant c.728G>A

La variation faux sens sur l'exon 4, due à la transition G en A, c.728G> A est associée, sur le même allèle du gène *MSH2* de ce patient appartenant à la famille F27, à la mutation pathogène, c.1030C> T (Fig.46).

La mutation c.728G> A se manifeste phénotypiquement par une substitution de l'Arginine en Glutamine en position 243, p.Arg243Gln.

Du côté phylogénique, cette position de la Guanine est conservée au cours de l'évolution chez l'espèce humaine et la plupart des primates, ainsi il n'existe pas de différence physico-chimique entre l'Arg et la Gln.

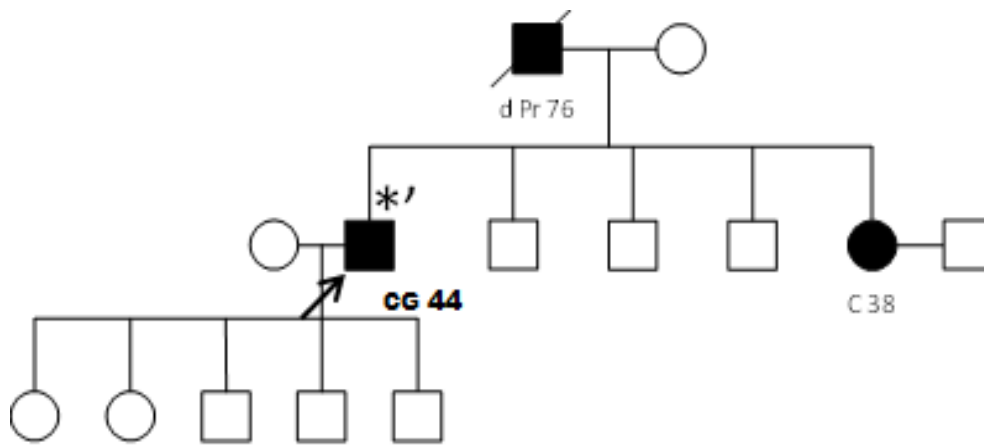


Figure 46 : Pedigree de la famille F27 porteuse à la fois les variants c.1030C> T désigné par (*) et c.728G>A désigné par (') situés sur le gène MSH2.

L'âge au moment de diagnostic est désigné par un chiffre, l'âge de décès par un chiffre précédé de la lettre « d ». Les types de cancer(s) sont désignés par les symboles suivants : C cancer du colon, CG cancer du colon gauche, Pr cancer la prostate.

L'étude *in silico* de l'influence de ce variant sur la fonction de la protéine était réalisée grâce aux logiciels disponibles sur internet : PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>), SIFT (<http://sift.jcvi.org/>) ont donné les scores respectifs de 1 et 0.01 (Fig. 47 et Fig. 48), prédisent une implication probablement délétère dans la maladie. Cependant, l'application du logiciel Mapp MMR (<http://mappmmr.blueankh.com/>) nous a donné un score de 2,130 ce qui contredit son effet délétère (Fig. 49). Le variant c.728G>A a été décrit comme non pathogène (Auclair *et al.*, 2006), sans aucun effet sur l'épissage testé par RT-PCR de l'ARN du patient (Chao *et al.*, 2008). Il a été retrouvé dans deux familles tunisiennes en association à une autre mutation délétère sur l'exon 9 de MSH2 (Moussa *et al.*, 2011). Ce variant a été décrit et classé comme variant de signification clinique inconnue dans les bases de données UMD (Grandval *et al.*, 2013) et InSiGHT (Thompson *et al.*, 2014).

Ainsi, Ce variant a été rapporté principalement au niveau du pourtour Méditerranéen (Auclair *et al.*, 2006). Il serait donc intéressant d'étudier un grand nombre de témoins afin de savoir s'il s'agit seulement d'un polymorphisme relatif à cette partie géographique ou une variation qui s'associe fortement à une autre mutation pathogène dans un syndrome de Lynch.

PolyPhen-2 prediction of functional effects of human nsSNPs

Home About Help Downloads Batch query VHS.db

PolyPhen-2 report for P43246 R243Q

Query

Protein Acc	Position	AA ₁	AA ₂	Description
P43246	243	R	Q	Canonical; RecName: Full=DNA mismatch repair protein Msh2; Short=hMSH2; AltName: Full=MutS protein homolog 2; Length: 934

Results

Prediction/Confidence PolyPhen-2 v2.2.2r398

HumDiv

This mutation is predicted to be **PROBABLY DAMAGING** with a score of 1.000 (sensitivity: 0.00, specificity: 1.00)

HumVar

Details

- Multiple sequence alignment UniProtKB/UniRef100 Release 2011_12 (14-Dec-2011)
- 3D Visualization PDB/DSSP Snapshot 03-Jan-2012 (78304 Structures)

software & web support: [Ivan Adzhubei](#) Web design & development: [biopython](#)

Figure 47: Utilisation de PolyPhen-2 sur le variant c.728G>A du gene MSH2

J. Craig Venter INSTITUTE

Search

JCVI Home About Research Sustainable Lab Publications Education Giving Press Careers Contact

SIFT: PREDICTIONS

User Input	ENSP	Pos	Ref	Subst	Prediction	SIFT Score	Median Information Content	# Seqs
ENST00000233146,c.728G>A,Arg243Gln	ENSP00000233146	728	E	G	DAMAGING	0	2.59	109

? - Indicates either ENSP or amino acid position not found.

*DAMAGING - Low confidence predictions with Median conservation above 3.25

Figure 48 : Utilisation de SIFT sur le variant c.728G>A du gene MSH2

MAPP-MMR

Select Values for Substitution

Gene: MSH2

Position: 243

Reference Sequence Amino Acid: Reference Sequence Amino Acid

Variant Amino Acid: Variant Amino Acid

MAPP-MMR Score

Results of Substitution

For Gene MSH2 Variant Amino Acid Q at position 243 has an **MAPP-MMR Score** of 2.130.

Figure 49 : Utilisation de Mapp MMR sur le variant c.728G>A du gene MSH2.

2. Gène *MLH1*

Le gène *MLH1* impliqué dans le système de réparation MMR est fortement incriminé dans le SL.

- Le nouveau variant c.881_884delTCAGinsCATTCCT

Notre étude a révélé la présence d'un variant du gène *MLH1*, c.881_884delTCAGinsCATTCCT. Ce variant a été détecté chez le probant de la famille F10, F10.1, ayant développé un cancer du côlon gauche à 56 ans, il s'agit d'un ADK liberckunien ulcéré et infiltrant. Cette mutation complexe, comprenant une insertion de « CATTCCT » et délétion de « TCAG », s'est produite au niveau du «GT» le dinucléotide conservé du site d'épissage donneur de l'exon 10 de *MLH1* (Fig. 50). Le variant c.881_884delTCAGinsCATTCCT n'a pas été identifié ou publié auparavant dans d'autres populations, ni signalé dans les bases de données InSiGHT et Human Gene Mutation et LOVD (Peltomäki et Vasen, 2004 ; Thompson et al., 2014)

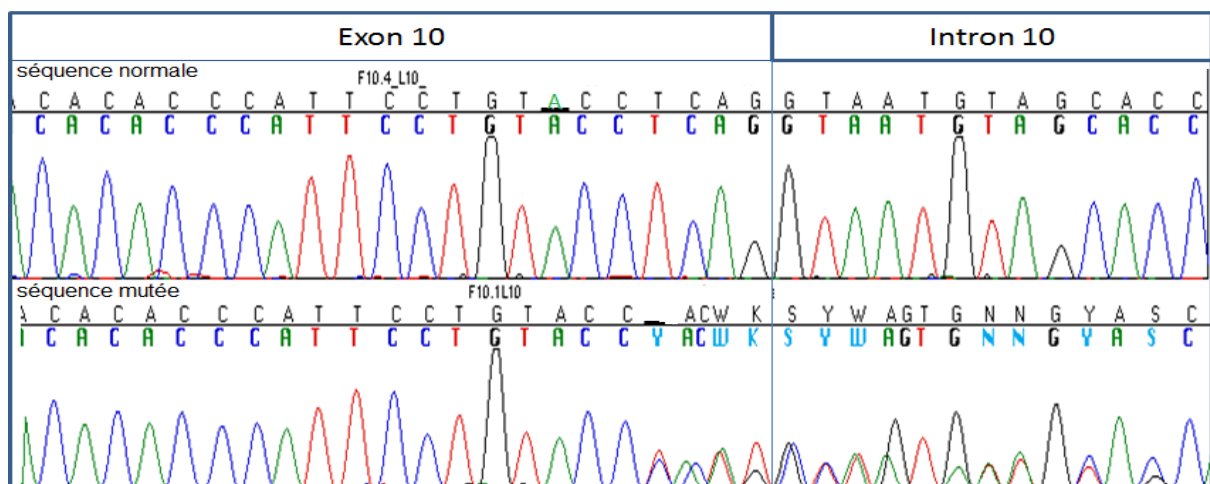


Figure 50 : Chromatogramme de séquençage de la mutation c.881_884delTCAGinsCATTCCT sur le gène *MLH1*.

La conséquence phénotypique probable de ce variant est un défaut d'épissage résultant dans le saut de l'exon 10. Nous avons alors essayé de caractériser la fonction de la protéine par le biais de l'analyse *in silico* de séquences introniques, basée sur l'utilisation de logiciels bioinformatiques disponibles sur internet : Human Finder (<http://www.umd.be/HSF/HSF.html>), Net-Gene2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2>) et NNSPLICE (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html), les résultats des trois tests effectués indiquent que cette variation confirme la défaillance du site d'épissage entre l'exon 10 et 11 du gène *MLH1* (Figs. 51, 52 et 53), ce qui a probablement conduit au phénotype délétère.

```

***** NetGene2 v. 2.4 *****

The sequence: sequencel has the following composition:

Length: 253 nucleotides.
32.0% A, 26.1% C, 17.0% G, 24.9% T, 0.0% X, 43.1% G+C

Donor splice sites, direct strand
-----
No donor site predictions above threshold.

Donor splice sites, complement strand
-----
pos 3'->5'   pos 5'->3'   phase strand   confidence   5'       exon intron   3'
    138         116         0      -         0.45     TCTGTTCTT^GTGAGTCTG

Acceptor splice sites, direct strand
-----
                pos 5'->3'   phase strand   confidence   5'       intron exon   3'
                141         0      +         0.17     GACTCACAAG^GAACAGATGT
                147         0      +         0.18     CAAGGAACAG^ATGTTCTATC

Acceptor splice sites, complement strand
-----
No acceptor site predictions above threshold.

-----

CUTOFF values used for confidence:

Highly confident donor sites (H):      95.0 %
Nearly all true donor sites:           50.0 %

Highly confident acceptor sites (H):    95.0 %
Nearly all true acceptor sites:         20.0 %
    
```

Figure 51 : Utilisation de logiciel NetGene v 2.4 pour le variant c.881_884delTCAGinsCATTCT du gène *MLH1* chez la famille F10.

```

the NNSPLICE 0.9 version (January 1997) of the splice site predictor.

Splice site predictions for 1 sequence with donor score cutoff 0.40,
acceptor score cutoff 0.40 (exon/intron boundary shown in larger font):

Donor site predictions for 105.106.149.59.19103.0 :
Start  End  Score  Exon  Intron
  94   108   0.93  acctcagGtaatgta

Donor site predictions for 105.106.149.59.19193.0 :
Start  End  Score  Exon  Intron

-----

Acceptor site predictions for 105.106.149.59.19103.0 :
Start  End  Score  Intron      Exon
  80   120   0.82  acaccattctgtacctcGgtaatgtagcaccacaaactcc

Acceptor site predictions for 105.106.149.59.19193.0 :
Start  End  Score  Intron      Exon
    
```

Figure 52 : Utilisation de logiciel NNSPLICE 0.9 pour le variant c.881_884delTCAGinsCATTCT du gène *MLH1* chez la famille F10.

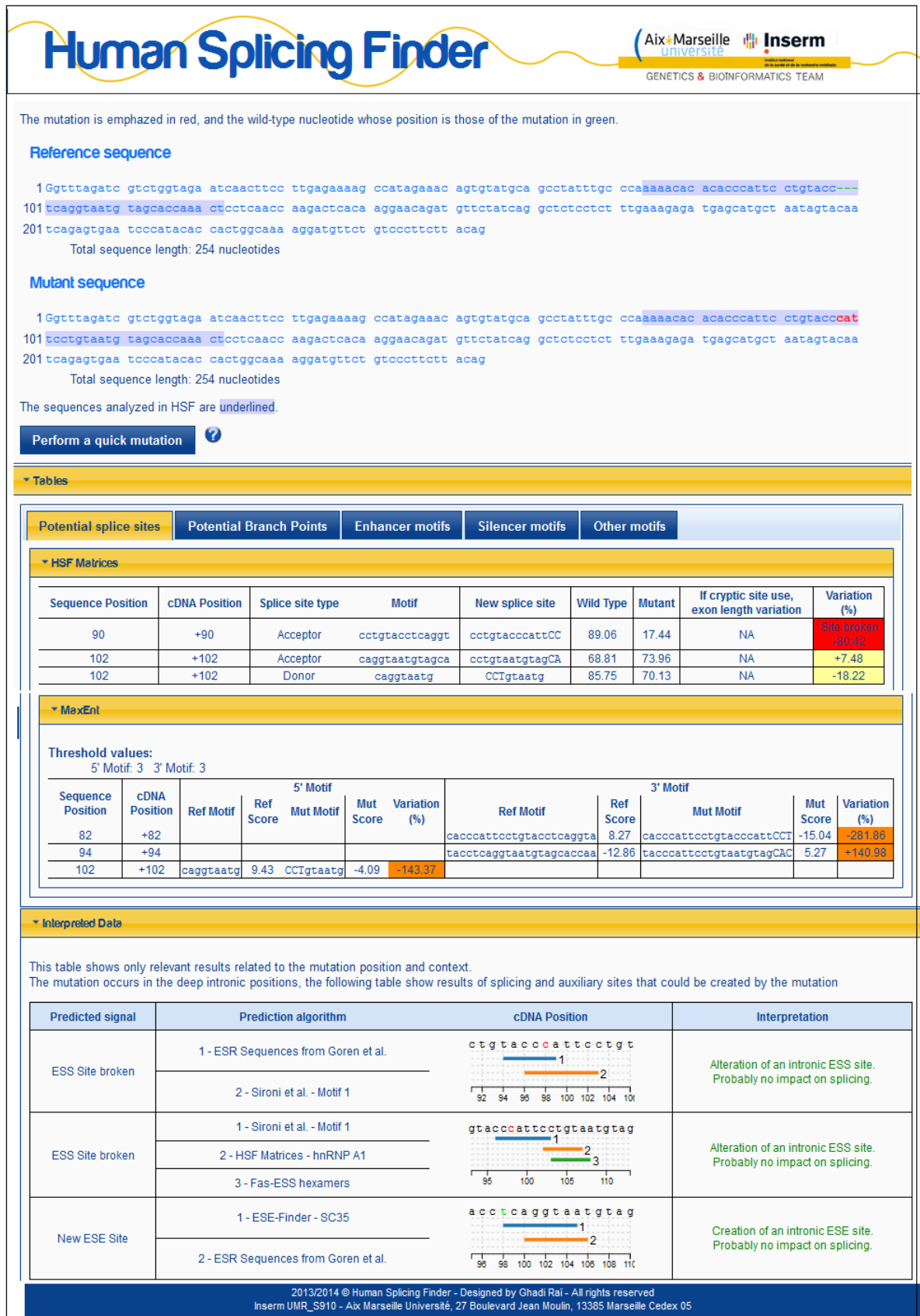


Figure 53 : Utilisation de logiciels HFS v 3.0 pour le variant c.881_884deITCAGinsCATTCT du gène *MLH1* chez la famille F10.

D'après notre enquête familiale, il a été constaté le décès, suite à un cancer du côlon, de deux filles à un âge jeune. Les premiers prélèvements ont été réalisés chez les fils IV₅ et IV₆ puis élargis aux autres garçons de la même fratrie. L'arbre généalogique de la figure 54 présente l'histoire de cette famille. La mutation est détectée chez les trois fils IV₁, IV₃ et IV₅. A la suite de ce résultat, ils ont tous les trois, bénéficié d'une coloscopie dans le cadre de dépistage : IV₁ et IV₅ présentaient des polypes, le frère IV₃ avait, dans l'intervalle de temps, développé le cancer. Les deux filles IV₂ et IV₄ décédées à l'âge de 25 et 23 ans respectivement par CCR, avaient certainement cette mutation dans leur génome bien que nous n'avions pas la possibilité de le vérifier. Notre étude a été étendue à certains membres de la fratrie du cas index, III₅. Aucune mutation n'a été détectée, aucun cas de CCR n'a été mentionné. Ainsi à partir de ces données, il apparait clairement que ce variant co-ségrége avec la maladie dans cette famille qui répond typiquement aux critères d'Amsterdam I.

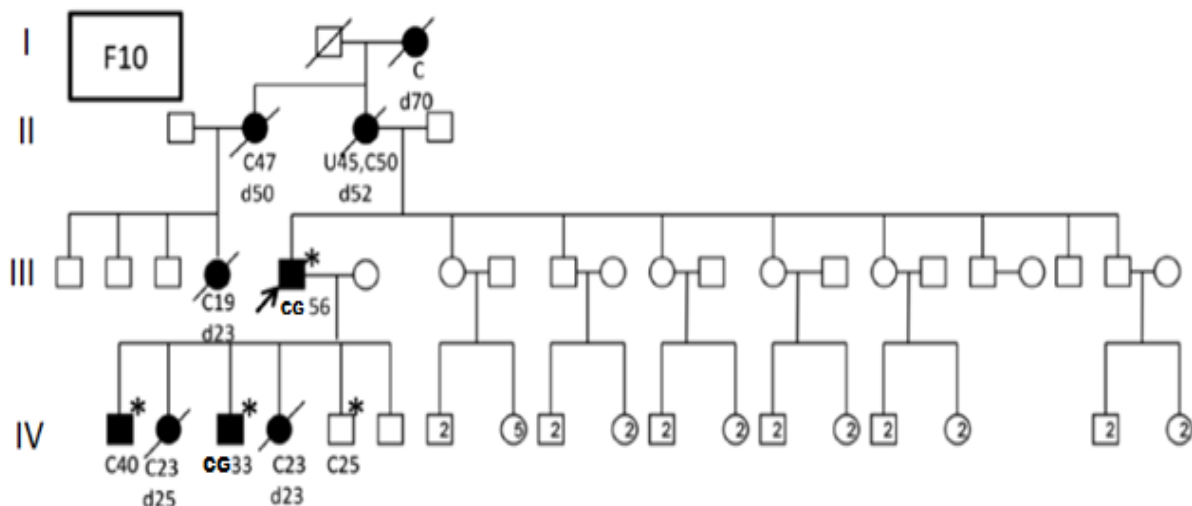


Figure 54 : Arbre généalogique de la famille F10 porteuse de la mutation c.881_884delTCAGinsCATTCCT et répondant aux critères d'Amsterdam I.

L'âge au moment de diagnostic est désigné par un chiffre, l'âge de décès par un chiffre précédé de la lettre « d ». Les types de cancer(s) sont désignés par les symboles suivants : **C** cancer du côlon, **CG** cancer du côlon gauche, **U** cancer de l'utérus.

Par ailleurs, il a été noté que, dans la famille F10, l'âge de survenue et de décès du cancer est plus précoce et plus grave chez les membres de sexe féminin (< 25 ans) par rapport aux hommes (> 30 ans) d'une part ; d'autre part, certains patients, bien que présentant la mutation familiale, auront la chance de ne pas développer de cancer comme le membre IV₅.

D'un point de vue génétique, une explication d'importance cruciale, est donnée par rapport au fait que la pénétrance n'est pas de 100% malgré la présence du gène *MMR* muté, par conséquent il existe des différences dans la pénétrance entre porteurs de la mutation familiale car le nombre requis de cellules mutées n'est pas atteint. Cependant ces suggestions devraient attendre la confirmation par des études approfondies et avec un grand effectif de cas de

cancer colorectal. Cette observation pourrait avoir des implications importantes dans la gestion et la surveillance médicales du patient et ses apparentés (Dowty *et al.*, 2013).

- Le variant c.1020C> G

Nous avons identifié un variant c.1020C> G (p.Ser340Ser) sur les deux allèles du gène *MLH1* (Fig. 55) chez la patiente F9, une femme qui a développé un cancer du rectum à 41 ans. L'anatomopathologie a révélé un ADK bien différencié infiltrant la séreuse avec de multiples polypes et une dysplasie sévère. La transversion de C à G affecte la position 1020 sur l'exon 11 du gène *MLH1*. Cette mutation silencieuse se montre sans effet sur la fonction de la protéine. Ce résultat est basé sur les études *in Silico* (SIFT (1,00), Polyphen et MAPP-MMR (1.400) que nous avons effectuées.

Le variant (p.Ser340Ser) a été mentionné comme non pathogène dans la base de donnée française UMD® (Grandval *et al.*, 2013).

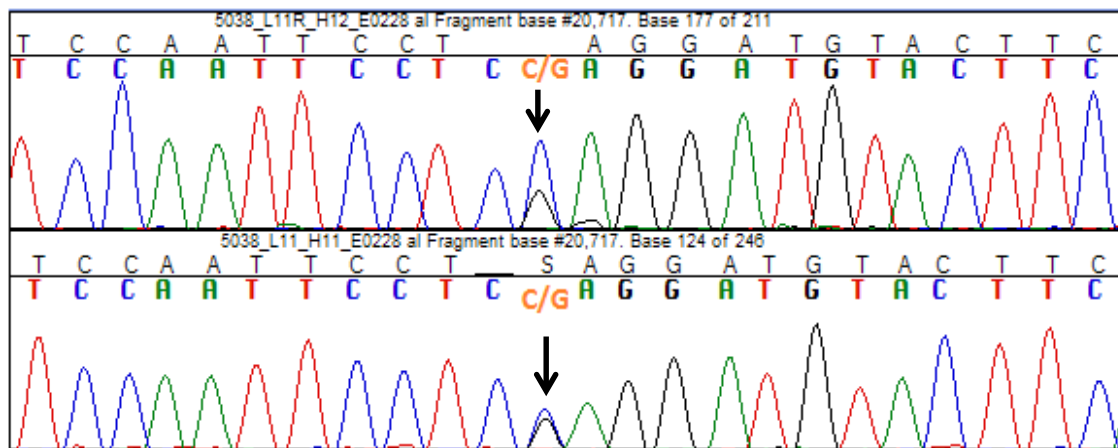


Figure 55 : Chromatogramme montrant la transversion c.1020C> G homozygote du gène *MLH1* chez la patiente F9.

3. Gène *MSH6*

Nous avons réalisé le séquençage du gène *MSH6* sur les 10 exons et les parties introniques, les résultats n'ont montré aucune mutation dans cette prospection.

4. Corrélation génotype-phénotype

L'observation de l'hétérogénéité dans l'expression clinique (spectre étroit et large) du SL a permis, dans différentes études, d'établir une corrélation génotype-phénotype. L'effectif limité de notre population d'étude ainsi que le taux de mutations identifiées n'ont pas permis d'évaluer cette corrélation. En effet, le risque cumulé chez les patients porteurs de mutations *MLH1* ou *MSH2* est de l'ordre de 50 %, alors qu'il est d'environ 22 % pour *MSH6* et compris entre 15 et 20 % pour le gène *PMS2* (Senter *et al.*, 2008 ; Bonadona *et al.*, 2011).

Il est probable que le risque de cancers «extra-colorectaux», et notamment de cancers des voies excrétrices urinaires, soit plus élevé en cas de mutation constitutionnelle du gène *MSH2*

par rapport aux mutations du gène *MLH1*. Les mutations du gène *MSH2* sont souvent impliquées dans le **cancer urothélial**, de même pour le **cancer de l'ovaire** (Bonadona et al., 2011). Les mutations constitutionnelles du gène *MSH6* sont associées à un moindre risque de cancers colorectaux et rarement au cancer de **l'intestin grêle**, il représente un risque majeur de cancer de **l'endomètre** ainsi que des **cancers rectaux** (Akiyama et al., 1997; Kolodner et al., 1999 ;Watson et al., 2008). Les études sur le risque de **cancer du sein** sont généralement rétrospectives et discordantes. Une seule étude prospective a montré une incidence plus élevée de **cancer du sein** chez les patientes atteintes du SL, notamment après l'âge de 40 ans (Win et al., 2012), elle montre que 50% des cas, la tumeur présentait une instabilité microsatellitaire, ainsi que des caractéristiques histologiques similaires au CCR et des récepteurs hormonaux négatifs (Win et al., 2013).

D'autre part, des études ont mis en évidence la présence de **cancer de la prostate** chez les patients atteints du SL, notamment chez des patients porteurs d'une mutation du gène *MSH2*. La présence d'une instabilité microsatellitaire était aléatoire et l'âge au diagnostic était supérieur à 60 ans (Barrow et al., 2013 ; Ryan et al., 2014).

Ces tumeurs (*de sein, de la prostate et du pancréas*) font l'objet controversé et justifient qu'elles ne fassent pas partie du spectre classique (Dominguez-Valentin et al., 2016). Des études prospectives indépendantes sont nécessaires afin de déterminer l'implication de ces types tumoraux dans le SL.

Le syndrome de Muir-Torre (OMIM #158320) est un variant rare du SL caractérisée par l'association des lésions dermatologiques de type adénomes sébacés, carcinomes sébacés (Muir et al., 1967 ; Torre, 1968), kératoacanthomes et tumeurs viscérales avec des CCR. Les mutations des gènes *MSH2* et *MSH6* sont les plus rencontrées (90% des patients atteints du syndrome de Muir-Torre) et 10% des patients sont porteurs d'une mutation germinale de *MLH1*(Mercader, 2010).

La recherche d'une déficience du système MMR de manière systématique au niveau de ces lésions dermatologiques peut permettre de détecter un SL (Plocharczyk et al., 2013).

Le syndrome de Turcot (OMIM #276300) est un autre variant du SL défini par l'association d'un CCR ou d'adénomes colorectaux avec une tumeur cérébrale dans une même famille (Turcot et al., 1959). Il est lié à une mutation d'un gène MMR, notamment du gène *PMS2*. La tumeur du système nerveux central la plus fréquemment rencontrée est le glioblastome à cellules géantes et astrocytomes anaplasiques, de pronostic sombre et diagnostiqué précocement. Il peut être inaugural ou être mis en évidence en même temps que les signes digestifs (Dipro et al., 2012).

Il est à montrer que le système MMR est également impliqué dans un autre syndrome, appelé syndrome de déficit constitutionnel du système MMR ou *Constitutional Mismatch Repair Deficiency* (CMMR-D), secondaire à des mutations bialléliques (*PMS2* dans 60% des cas, *MSH6* 20%). Le spectre des cancers observés diffère du SL, ainsi que l'âge de diagnostic (*Vasen et al., 2014*). En effet, ce syndrome est principalement caractérisé par le développement de cancers pédiatriques à type de *tumeurs cérébrales* (glioblastome, médulloblastome, moyenne d'âge comprise entre 7 et 9 ans, principale cause de mortalité), de *tumeurs du tractus digestifs* et de *tumeurs hématologiques* (lymphome non hodgkin à cellules T, leucémie aiguë lymphoblastique).

B. Polymorphismes des gènes *MLH1*, *MSH2* identifiés chez les patients SL

Plusieurs études d'association pangénomique ont identifié des polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) dans de très nombreux loci indépendants associés ou non à un risque CCR (*Tenesa and Dunlop, 2009 ; Houlston et al., 2010 ; Zamani et al., 2016*). Bien qu'il n'y ait aucune preuve que ces SNPs soient associés au CCR dans la population générale, ils sont des modificateurs du risque pour les porteurs de mutations sur les gènes MMR. Aucune implication clinique directe de ces polymorphismes dans le syndrome de Lynch n'a été prouvée (*Win et Jenkins, 2013*).

Nos résultats de séquençage des gènes MMR étudiés révèlent 18 polymorphismes nucléotidiques (Tableau 12). Ces SNP ont été identifiés dans les gènes *MLH1* (9 polymorphismes) et *MSH2* (9 polymorphismes) au sein de nos familles porteuses de la mutation pathogène ou non, mais leur rôles fonctionnels dans l'affectation du système MMR est inconnu.

Parmi un panel de SNP examiné sur les gènes MMR, les plus fréquemment étudiés dans les populations à travers le monde sont les variants : le c.-93G> A du gène *MLH1* (rs1800734) et le c. -118T> C (rs2303425) du gène *MSH2*, bien que le nombre de polymorphismes soit en nette progression dans les études de CCR.

Ainsi sur les 18 variants SNP que nous avons détectés, outre les deux variants cités précédemment, il y a 14 autres qui sont décrits dans les bases de données des variants MMR (InSiGHT, LOVD, UMD, MMR missens...). Nous décrivons également deux variants non encore répertoriés dans ces bases de données.

Tableau 12 : Description des polymorphismes identifiées dans les gènes *MLH1* et *MSH2* des familles HNPCC analysées.

Gène	Exon /intron	Localisation protéique	variant c.DNA	familles affectées	Classification InSiGHT (*)	dbSNP rs ID	Référence
<i>MLH1</i>	Promoteur		c.-93G>A	F2,F8	/	rs1800734	Allan 2008 ; Poplawski 2015.
	Exon 2	Codon 66 ACC66ACT p.Thr 66 Thr	c.198C>T	F6	/	rs61751642	Borràs 2012
	Intron 6		c.IVS6+20A>T (c.545+20A>T)	F12	/		Non encore décrit
	Exon 8	Codon 213 GTG213ATG p.Val213Met	c.637G>A	F23	/	rs2308317	Takahashi 2007
	Exon 12	Codon596 AAC596AGC p.Asn596Ser	c.1787A>G	F26.1 F26.2 F28	/	rs41295288	Betz 2010
	Intron 13		c.1558+14G>A	F10.1	/	rs41562513	Bujalkova 2008
	Intron 14		c.IVS14-19A>G (c.1668-19A>G)	F9,F4,F6,F5,F, F10.1	/		UMD Grandval 2013
	Intron 16		c. IVS16+20A>G c.1896+20A>G	F25	/		Non encore décrit
	3'UTR		c.*162_*165del GATT	F8	1	rs796807655	UMD Grandval 2013
<i>MSH2</i>	Promoteur	p.(=)	c.-118T>C	F1, F2,F3,	1	rs2303425	Mrkonjic 2007 ; Xiao, 2012. Hsieh 2016
	Intron 1	p.(=)	c.211+9C>G	F1, F2,F7,F8,	1	rs2303426	Bujalkova 2008
	Intron 9		c.1511-91T>G	F1, F2,F9, F10.1	/	rs3732182	UMD Grandval 2013
	Intron 9		c.1511-9A>T	F1, F3.1, F27	1	rs12998837	Bujalkova 2008
	Intron 10		c.1661+6C>T	F27	2	rs267607973	Roh 2003
	Intron 10	p.(=)	c.1661+12G>A	F1, F2, F3.1, F7,F8,F9,	1	rs3732183	Jung 2006
	Exon 11	TTG>CTG p.Leu556Leu p.(=)	c.1666T>C	F21	3	rs61756466	Hansen 2014
	Intron 11		c.1759+107A>G	F8	/	rs3764959	UMD Grandval 2013
	Intron 12		c.2006-6T>C	F7, F10.1	1	rs2303428	Zahary 2012.

(*) classification InSiGHT *Thompson et al., 2014*) : 1 = non pathogène, 2 = Probablement non pathogène, 3 = inconnue, 4 = Probablement pathogène, et 5 = pathogène. Les lettres de familles en gras correspondent aux familles porteuses de mutations pathogènes dans l'un des gènes MMR étudiés. Les (/) pour les classifications non disponibles.

1. Polymorphismes sur les parties régulatrices

- Le SNP c. -93G> A (rs1800734) du gène *MLH1*

Le polymorphisme c.-93G> A sur le promoteur du gène *MLH1* (rs1800734) n' a été retrouvé que chez deux patientes SL dans notre population d'étude dans deux familles différentes, toutes sans antécédents familiaux : la F2 avec cancer du colon droit, est porteuse de la grosse délétion sur *MSH6*, c.1 -?_260 + del et l'autre, F8 avec un cancer du rectum ayant le variant c* 162_*165delGATT situé sur l'extrémité 3' de *MLH1*. Ce SNP n'a pas été détecté chez aucun des autres patients n'ayant pas de variations sur les gènes MMR étudiés.

Allan et al. (2008) ont décrit une association statistiquement significative entre les homozygotes pour ce polymorphisme et la survenue de cancer du côlon proximal. D'autres auteurs ont démontré que ce SNP est connu pour être associé à un risque accru de susceptibilité aux CCR (Santibanez Koref et al., 2010), (Tomlinson et al., 2012) (Ma et al., 2014). Il a été démontré que ce polymorphisme est lié au CCR en présence de MSI-H (Campbell et al., 2009 ; Whiffin et al., 2011).

Le SNP c.-93G> A étant localisé au cœur du promoteur du gène *MLH1* dans une région régulatrice de l'activité maximale de transcription : ceci pourrait affecter le taux de la transcription par réduction transcriptionnelle ou par silencing (Allan et al., 2008). Ainsi cette mutation s'expliquerait par une perte somatique de l'expression de la protéine MLH1 qui se produit suite à une hyperméthylation des îlots CpG (Mrkonjic et al., 2010). A la suite du modèle proposé par Chen et al.(2007), Whiffin et al. (2011) ont montré une association entre le SNP rs1800734 et l'hyperméthylation du promoteur *MLH1* dans le cancer colorectal et de l'endomètre.

Cette découverte a eu un grand retentissement des études sur de nombreux groupes ethniques ont évalué l'association de ce polymorphisme rs1800734 avec différents types de cancers, autres que le CCR et le cancer de l'endometre (Poplawski et al., 2015). Ces travaux suggèrent que ce polymorphisme pourrait contribuer à l'étiologie du cancer gastrique (Niu et al., 2015), de l'ovaire (Harley et al., 2008) du poumon primaire, en particulier chez les non-fumeurs(Lo et al., 2011 ; Slováková et al., 2015). Alors que Zhi et al.(2012) a confirmé qu'il n'existe aucune association entre ce SNP et le cancer de la vessie.

- Le SNP c. -118 T>C (rs2303425) du gène *MSH2*

Le polymorphisme c. -118T> C sur le promoteur du gène *MSH2* (rs2303425) a été détecté au niveau de trois patients SL dans notre population d'étude, le patient F1 âgé de 30 ans ayant un cancer du colon gauche, la patiente F2 de 29 ans avec un cancer du colon droit qui est porteuse de la grosse délétion sur *MSH6*, c.1 -?_260 + del mais aussi du SNP c.-

93G> A et la patiente F3 (46 ans), ayant un cancer à double localisation au colon proximal, est le cas index de la famille répondant aux critères d'Amsterdam II, ayant la mutation pathogène c.942 + 3A> T ainsi que le variant c.2210+11_2210+22 del12 de l' intron 13 sur le même allèle du gène *MSH2*.

Mrkonjic et al.(2007) ont observé une très forte association entre le polymorphisme rs2303425 du gène *MSH2* et des antécédents familiaux de cancer colorectal, répondant aux critères d'Amsterdam I ($p = 0,005$), les critères Amsterdam I et II ($P = 0,036$) chez les patients de l'Ontario. Cette association était plus particulièrement évidente chez les femmes atteintes du cancer colorectal en Ontario (Mrkonjic et al., 2007), cette situation correspond au cas de notre patiente F3.

Bien que les étiologies de des cancers diffèrent, la plupart des études ont étudié la relation entre ce polymorphisme, rs2303425 sur le gène *MSH2* et la susceptibilité à ces types de cancers : Il a été constaté que ce SNP pourrait être associé à la susceptibilité au cancer colorectal (Mrkonjic et al., 2007), cancer de la vésicule biliaire (Srivastava et al., 2010), cancer gastrique (Xiao et al., 2012) et récemment au cancer du sein d'apparition précoce (Hsieh et al., 2016). Cependant aucune preuve ne conclut l'association entre le polymorphisme rs2303425 et le risque de cancer du poumon (Lo et al., 2011).

A partir des données concluantes des polymorphismes c.-93G> A du gène *MLH1* (rs1800734) et le c. -118T> C (rs2303425) du gène *MSH2*, il s'avère que toute modification au niveau d'un promoteur potentialise la régression de l'expression du gène considéré, voire éteint cette expression.

2. Polymorphismes dans les régions exoniques et introniques

Parmi les autres polymorphismes décrits dans notre population d'étude il existe deux types :

- Les SNP se produisant au niveau des exons mais qui ne semblent avoir aucun effet modulateur sur la fonction de la protéine tels :

- Le SNP c.198C>T, (p.Thr 66 Thr) (rs61751642) situé sur l'exon 2 du gène *MLH1* a été détecté chez un de nos patients non porteur de mutation pathogène dans les gènes étudiés. Ce polymorphisme portant une variation synonyme dans la position 66 de la protéine MLH1 a été considéré comme un variant probablement non pathogène (classe 2) selon la classification InSiGHT (www.insight-database.org).

Il a été pourtant décrit chez des patients présentant un CCR avec MSI ou un cancer du pancréas dans le cadre du SL (Ghimenti et al., 1999) (Borràs et al., 2012)

- Le SNP c.637G>A, (p.Val213Met) (*rs2308317*) sur l'exon 8 du gène *MLH1* est présent chez une patiente jeune et avec antécédents familiaux du CCR mais elle ne porte pas de mutation pathogène dans les gènes étudiés. Il a été classé comme variant non pathogène (classe 1) selon InSiGHT, il est rapporté par plusieurs études concernant le CCR et le cancer de l'endomètre parmi les sujets présentant un SL (*Cravo et al., 2002 ; Hampel et al., 2006 ; Takahashi et al., 2007*).
 - Le SNP c.1787A>G (p.Asn596Ser) (*rs41295288*) sur l'exon 12 du gène *MLH1*, a été retrouvé chez un patient F28 ayant présenté un cancer du colon transverse ainsi que chez deux patientes jumelles de la famille F26 qui avaient eu, l'une un cancer de l'estomac et l'autre un cancer du rectum toute les deux à l'âge de 24 ans. Ces patients qui ont eu ce même variant de l'exon, ont présenté également une pseudodélétion de l'exon 12 détectée par MLPA (*P248 MLH1/MSH2*). Le variant (*rs41295288*) a été décrit dans plusieurs populations (*Viel et al., 1997*) (*Mangold et al., 2005*) (*Betz et al., 2010*) et il a été classé comme un variant de signification inconnue (classe 3) selon InSiGHT (www.insight-database.org) et UMD (*Grandval et al., 2013*). Les tests des études fonctionnelles *in silico* (*Sift, Polyphen2 et Mapp-MMR*) concernant ce SNP indiquent des scores correspondant à un variant non pathogène (*Barnetson et al., 2008*) (*Betz et al., 2010*).
 - Le polymorphisme c.1666T>C (p.Leu556Leu) (*rs61756466*) sur l'exon 11 du gène *MSH2* a été détecté chez l'un de nos cas, F21. L'analyse fonctionnelle de l'ARNm a démontré que ce variant n'a eu aucun effet sur l'épissage (*Tournier et al., 2008*), il a été rapporté comme une variation de signification inconnue (classe 3) (*Hansen et al., 2014*).
- Les SNP se produisant au niveau des introns tels :
- Les variants c.1558+14G>A du *MLH1*, c.211+9C>G et c.1511-9A>T du *MSH2* ont été décrit comme étant des polymorphismes dans plusieurs études (*Bujalkova et al., 2008*) cependant d'autres auteurs les ont considérés comme des variants de signification inconnue (*Murata et al., 2002 ; Lee et al., 2005*). Ces polymorphismes ne semblent avoir aucune association avec l'atteinte coloréctale sporadique (*Christensen et al., 2008*). Le variant c.1668-19A>G du gène *MLH1* ainsi que le c.1759+107A>G sur le gène *MSH2* sont cités comme étant des variant neutres dans la base de donnée UMD.
 - Concernant le variant c.1661+6C>T du gène *MSH2*, Roh et al. (2003) ont suspecté qu'il est associé à une atteinte précoce de CCR, alors que Jung et al.

(2006) ont trouvé que le variant c.1661+12G>A du même gène pourrait avoir une association avec le cancer du poumon chez les sujets non fumeurs.

- En outre, nous avons identifié une variation sur un site d'épissage, le variant c.2006-6T>C (*rs2303428*), qui est adjacent à l'exon 13 du gène *MSH2* chez deux patients dont l'un appartenant à la famille Amsterdam I (F10.1). Ce patient est déjà porteur de la mutation pathogène de *MLH1*, c.881_884delTCAGinsCATTCCT.

L'emplacement de cette variation qui se trouvait dans la région du motif polypyrimidique incite à penser que celle-ci pourrait affecter l'épissage de l'ARNm du gène *MSH2* ; car ce motif polypyrimidique joue un rôle majeur dans la formation de complexe protéique de spliceosome (*Roscigno et al., 1993*), la mutation pourrait entraîner un épissage aberrant de l'ARNm au cours du processus de modification post-transcriptionnelle. La délétion de l'exon 13, qui englobe la région la plus conservée du gène *MSH2* peut se produire, conduisant à une diminution de la fonction de la protéine *MSH2*. Cependant, l'impact de ce variant, c.2006-6T> C, dans la pathogenèse du cancer est encore controversée en raison de preuves contradictoires. Quelques rapports ont montré que cette mutation a été associée à un sur-risque de CCR chez les patients atteints de rectocolite hémorragique (*Brentnall et al., 1995*), CCR sporadique (*Goessl et al., 1997*), les lymphomes non hodgkiniens (*Pazy-Miño et al., 2002 ; Hishida et al., 2003*) et le cancer de l'endometre (*Beiner et al., 2006*). Il est décrit par Krüger et al. (2004) comme un polymorphisme sans effet sur la survenue du CCR (*Krüger et al., 2004*) ; il est également possible que cette variation au site d'épissage est en déséquilibre de liaison avec une autre mutation pathogène qui reste à rechercher (*Zahary et al., 2012*). Ainsi le SNP c.2006-6T> C a été classé comme variant non pathogène (*classe 1*) selon InSiGHT (www.insight-database.org).

- Le cas index de la famille F8, est une jeune femme de 25 ans avec CCR sans antécédent familial de cancer du côlon. Chez laquelle nous avons identifié un variant c. *162_*165delGATT (*rs796807655*) du gène *MLH1* (Fig. 56). Cette délétion de GATT est située sur l'extrémité 3' du gène, juste en amont du signal de polyadénylation AATAAA canonique. Ce polymorphisme sans signification clinique se trouve dans 4% des populations africaines et dans 1% des populations américaines alors qu' il est totalement absent chez les

européens selon les bases de données InSiGHT (www.insight-database.org) et Génome browser (<http://www.ensembl.org>).

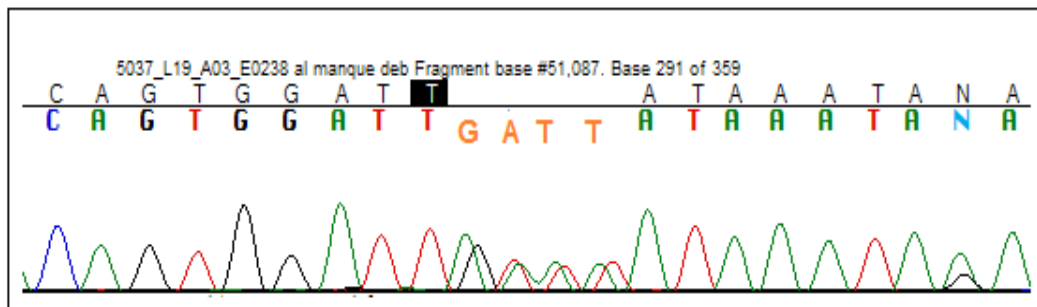


Figure 56: Chromatogramme de la délétion GATT sur *MLH1* identifiée chez la patiente F8.

- Nous avons obtenu deux variations introniques c.1896+20A>G et c.545+20A>T sur *MLH1* identifiés chez deux patients appartenant à deux familles différentes, répondant aux critères de Bethesda. Ces variants ne sont décrit ni cités auparavant dans aucune base de données des variants du *MLH1*. Le travail sur ces nouveaux variants doit être poursuivi afin de pouvoir les introduire dans les bases de données

2.5.2 Etude des gènes MMR par Multiplex Ligation dependent Probe Amplification

A partir des différents résultats observés avec les gènes MMR retenus, nous avons entrepris de compléter nos analyses en développant la technique MLPA pour étudier d'éventuels remaniements génomiques de grande taille. Tous les patients inclus dans cette étude ont bénéficié d'une analyse MLPA. De même dans les échantillons où des mutations ponctuelles ont été identifiées par séquençage, nous avons appliqué cette méthode pour d'autres modifications sur les séquences bien que selon la littérature ce sont des événements très rarement associés (*Hanna et al., 2005*).

Ainsi à travers le « screening » des gènes *MLH1* et *MSH2* (*kits SALSA MLPA P003 et P248*) ne présentaient aucune altération pour les 27 cas index examinés, cependant dans le cas de *MSH6*, le séquençage n'a révélé aucune mutation ponctuelle pathogène chez notre population d'étude, mais par MLPA (*kit SALSA MLPA P072*) a révélé un seul cas dans lequel une grande délétion a été trouvée. Nous avons obtenu un profil MLPA qui montre un chromatogramme anormal correspondant à cette délétion dans la figure 57, page 102.

La délétion (c.1-?_260+ ?del) a été détectée chez une femme F2 atteinte d'un cancer du côlon à l'âge de 29 ans, sans antécédent familial. Cette mutation de grande ampleur a eu lieu entre les gènes *MSH6* et *MSH2*, comprenant l'exon 1 de *MSH6* et l'ensemble du gène

KCNK12 (Potassium channel, subfamily K, member 12) en amont, montrant qu'ils sont situés sur le même chromosome 2 (Fig . 58). Le gène *KCNK12* code pour l'un des membres de la superfamille des protéines de canal potassique mais, à ce jour, son activité n'a pas été démontrée pour être impliquée dans le syndrome de Lynch.

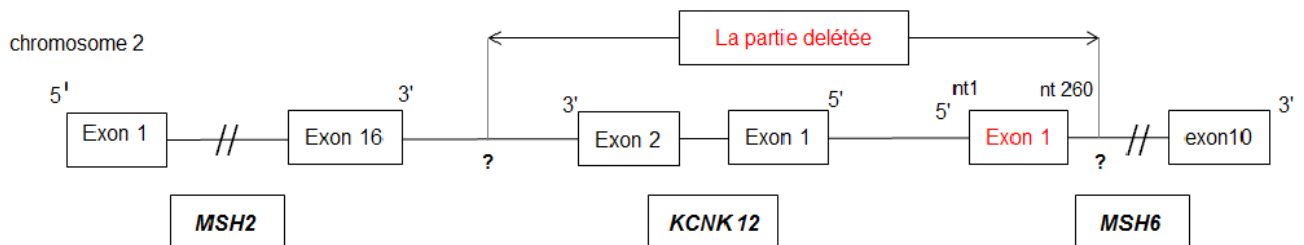


Figure 58 : Description schématique de la délétion c.1 -? _ 260 + ?del affectant l'exon 1 du gène *MSH6* de la patiente F2 (Sachant que les gènes *MSH2*, *KCNK12*, et *MSH6* sont localisés sur le même chromosome 2 (5' > 3') alors que *KCNK12* est exprimé sur l'autre brin (3' > 5') cette large délétion détectée chez la patiente F2 couvre exon 1 du gène *MSH6* et l'ensemble du gène *KCNK12*).

Ce variant n'a pas été auparavant identifié ou publié dans d'autres populations ni mentionné à travers les bases de données françaises (*Grandval et al., 2013*) et InSiGHT (*Thompson et al., 2014*), il est nouveau de fait détecté pour la première fois dans notre population d'étude. Afin de pouvoir l'inclure dans une base de donnée, il est impératif de caractérisation de points de cassure précis de cette grosse délétion. L'exploration des séquences exactes au niveau des extrémités de la portion déletée pourrait apporter des éléments de compréhension du mécanisme moléculaire et de sa production. Il est connu que la plupart des points de cassures se situent dans des séquences répétitives, principalement se sont les séquences Alu riches dans cette région du chromosome 2 et correspondent le plus souvent à une incidence plus élevée de réarrangements génomiques selon plusieurs études qui montraient leur implication dans la plupart des remaniement de grandes tailles provoquant le SL (*Pérez-Cabornero et al., 2011*) (*Hitchins and Burn, 2011*). Cette perte génique supprimant l'exon 1 du gène *MSH6* chez ce sujet semble avoir un rôle clairement pathogène en raison de son effet très probablement délétère sur la protéine.

En faite sur le plan phénotypique, les protéines MSH2 et MSH6 forment un hétérodimère, MutS, qui est impliqué dans la reconnaissance de mésappariement d'ADN et l'activation des étapes consécutives dans le processus de la réparation, alors que MLH1 est très probablement impliquée dans l'assemblage du complexe MMR (*Zhang et al., 2005*). Les protéines MSH2 et MLH1 sont irremplaçables dans le système MMR, mais la protéine MSH6 a été montrée comme étant fonctionnellement redondante avec une autre protéine, MSH3, pour la reconnaissance de petites insertions et délétions (*Kariola et al., 2002*).

Les réarrangements génomiques représentent une proportion importante de toutes les mutations pathogènes dans les gènes MMR des patients atteints d'un cancer du côlon. Ils semblent former de 15 à 55% des mutations dans les gènes MMR (*Bunyan et al., 2004 ; Baudhuin et al., 2005 ; Pistorius et al., 2007 ; Martínez-Bouzas et al., 2007*). D'autres études, en revanche, ont rapporté des fréquences plus basses (10%), en fonction des critères cliniques et moléculaires utilisés dans la sélection des patients (*Klift et al., 2005*). Dans notre étude, la délétion c.1 -?_260 + ? del représente 25% de toutes les mutations pathogènes identifiés chez nos patients.

Le nombre de mutations signalées dans le gène *MSH6* est continuellement grandissant (*Peltomäki, 2001*). Ces dernières années, plusieurs recherches ont démontré l'implication de ces mutations *MSH6* dans de nombreux cancers qui sont les suivants :

- ❖ Cancer colorectal sporadique et héréditaire (*Graham et al., 2015*) ;
- ❖ Cancer de l'endomètre (*Kato et al., 2015*) ;
- ❖ Cancer de la prostate (*Pritchard et al., 2014*) ;
- ❖ Cancers gastro-intestinaux (*Connor et al., 2014*) ;
- ❖ Les hémopathies malignes chez les enfants, glioblastome (*Nguyen et al., 2014*) (*Stark et al., 2015*), Oligodendrogliome anaplasique et le mélanome (*Alvino et al., 2014 ; Castellsagué et al., 2015*).

A travers l'histoire de la famille de la patiente F2, il n'existe pas d'antécédents de cancers. Elle répond aux critères de Bethesda ; étant donné que les critères révisés de Bethesda sont considérés comme plus précis pour identifier les patients à risque (*Rodriguez-Bigas et al., 1997 ; Umar et al., 2004 ; Piñol et al., 2005*). Ceci peut être pris en considération dans les enquêtes préventives du SL. Il est possible de détecter des mutations *MSH6* chez les patients avec peu ou pas d'agrégation de cancer, en particulier, mais pas exclusivement, chez les personnes atteintes d'un cancer d'apparition précoce (*Roncari et al., 2007 ; Kolodner et al., 1999*). Ce cas index est diagnostiqué à l'âge de 29 ans, âge relativement jeune en regard des données épidémiologiques de certains auteurs, pour lesquels l'âge moyen au moment du diagnostic de CCR était presque identique dans les familles portant des mutations dans *MLH1* et *MSH2*, mais cet âge peut augmenter de près de 10 ans pour les porteurs de la mutation *MSH6* (*Pérez-Cabornero et al., 2013*). Cependant, dans notre étude, le cas porteur de l'altération *MSH6* avait un âge inférieur à 30 ans. En accord avec nos résultats, l'étude des Pays-Bas (*Berends et al., 2002*) a montré que par rapport aux mutations dans les gènes *MLH1* et *MSH2*, les mutations du gène *MSH6* peuvent également contribuer, au développement, à un âge précoce, du CCR et du cancer de l'endomètre.

Il est important d'indiquer que nous avons également été confronté à un résultat assez remarquable au cours de l'investigation du gène *MSH2* par MLPA (*P248 MLH1/MSH2*). Un aspect de pseudodélétion a été découvert fortuitement en étudiant le SNP c.1787A>G, ce variant ponctuel qui donne souvent en MLPA, un aspect de délétion de l'exon 12 car il est situé à l'emplacement des sondes de MLPA, mais cela ne semble être qu'un artefact.

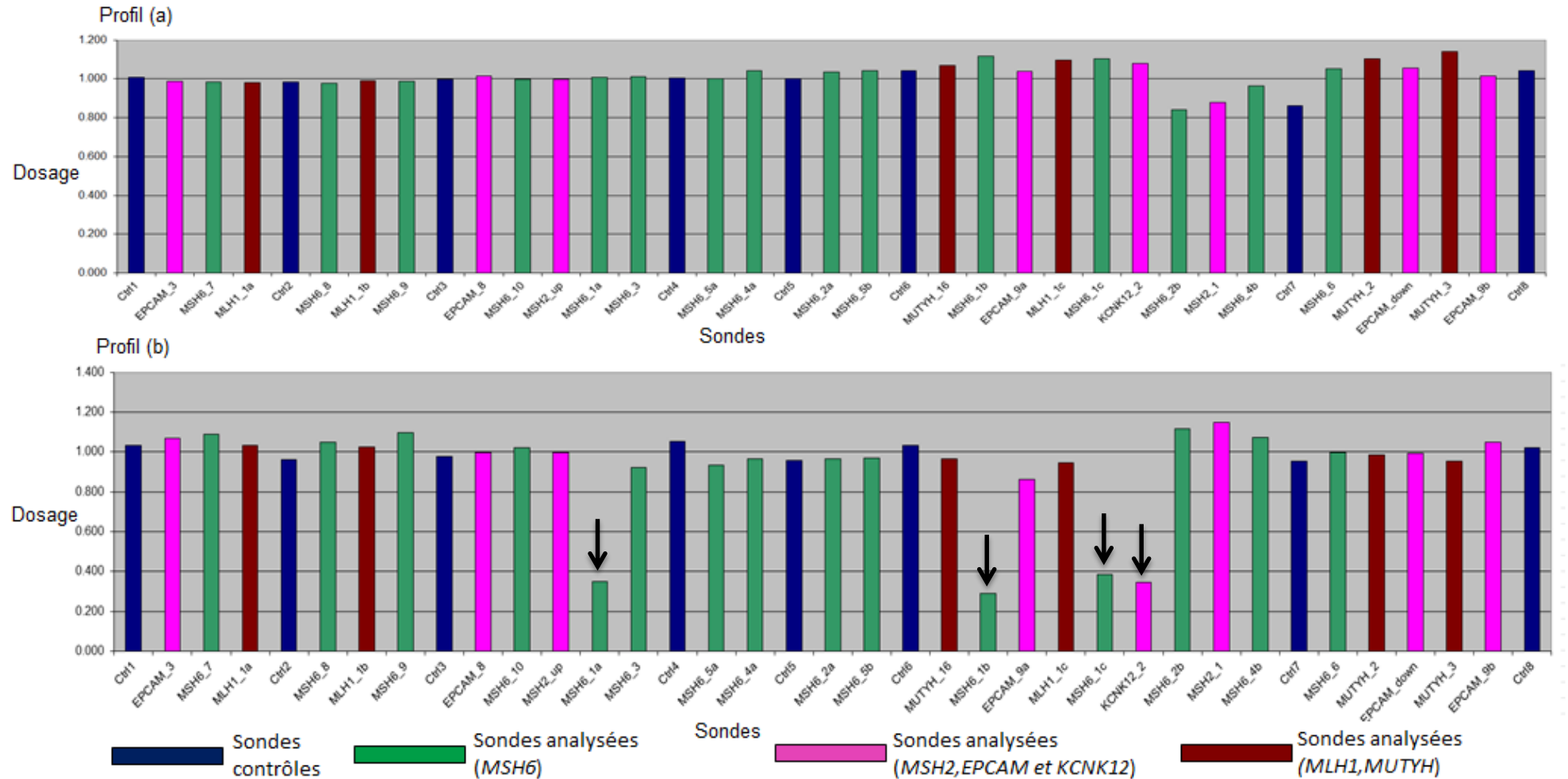


Figure 57 : Profils MLPA obtenus chez un sujet sain témoin pour (a) et chez la patiente F2 (b) avec la délétion c.1-?_260 + del. Chaque pic correspond au signal émis par une sonde spécifique d'une région d'intérêt, par exemple un exon. Dans le spectre, on distingue les sondes dites contrôles (en bleu) ou de références, spécifiques de régions réputées constantes dans le génome humain et qui permettront de normaliser les signaux obtenus en fin d'analyse. Le profil (b) montre la délétion de l'exon 1 du gène *MSH6* et le gène *KCNK12* entier ce qui explique la réduction importante des tailles de pics (pics surmontés de flèches) correspondant aux sondes (*MSH6*1a, 1b, 1c et *KCNK12* 2) analysé par le test du kit SALSA MLPA P072 (la feuille de calcul Excel utilisée est représentée par la Fig. B en Annexe III

Discussion générale et perspectives

Nous rapportons dans cette étude un dépistage systématique de *MLH1*, *MSH2* et *MSH6*, les gènes les plus fréquemment impliqués dans la prédisposition héréditaire au cancer colorectal de type syndrome de Lynch. Notre prospection a concerné 27 familles algériennes non apparentées et suspectées d'avoir un syndrome de Lynch, dont quatre répondaient aux critères d'Amsterdam I/II.

Dans 15% des cas, des mutations germinales pathogènes ont été identifiés au niveau des gènes *MSH2*, *MLH1* et *MSH6*, les variants *MLH1/MSH2* représentent environ 90% des variations trouvées dans notre étude, ce qui confirme le rôle délétère de certains variants des gènes *MSH2*, *MLH1* et indique que l'HNPC est associé à des mutations germinales dans les gènes MMR en accord avec la littérature (*Silva et al., 2009 ; NAKAMURA et al., 2014*).

Le deuxième point fondamental est la détection du réarrangement génomique **c.1 -?_260 + ? del** découvert dans le gène *MHS6* chez une patiente ayant un CCR à un âge précoce.

L'implication d'un variant dans sa fonction est également une étape indispensable pour valider les résultats d'association génotype/phénotype. Cette grande variété de phénotypes cliniques complique le diagnostic de SL. Une des raisons de phénotypes différents au sein de nos familles, qui portent des mutations dans différents gènes MMR, peut accomplir les différents rôles fonctionnels des trois protéines *MLH1*, *MSH2* et *MSH6* dans la réaction de réparation. En outre, notre étude serait plus rentable si les outils de dépistage de la tumeur pour la détection de SL étaient disponibles.

La majorité des mutations dans les gènes MMR est héritée des parents, les mutations de novo sont rares (2,3 %) (*Win et al., 2011*). Les mutations héréditaires sont uniques dans la plupart des cas, c'est-à-dire spécifiques à une seule famille. Cependant, en se basant sur des analyses des haplotypes, il existe certaines mutations fréquentes connues et survenues de novo ou alternativement peuvent être fondatrices (*Ponti et al., 2015*) telle la mutation affectant le splicing dans l'intron 5 du gène *MSH2* qui a été retrouvée chez la famille F3 dans notre étude. Elle peut représenter jusqu'à 20 % des mutations dans certaines populations (*Jacob et Praz, 2002*).

En se basant sur ces premières observations de l'aspect mutationnel des gènes MMR dans la population algérienne, nous constatons que toutes les familles ayant une mutation germinale identifiée dans l'un des gènes MMR étudié, répondaient aux critères d'Amsterdam I ou II, ceci confirmant pratiquement la spécificité de ces critères pour la bonne sélection de cas SL.

Sur 23 patients Bethesda, un seul cas, avait une mutation pathogène ce qui rejoint de nombreuses études (*Rodriguez-Bigas et al., 1997 ; Umar et al., 2004*) qui ont démontré que les critères révisés de Bethesda étaient moins spécifiques, expliquant l'absence de mutations pathogènes dans les gènes *MMR* chez la plupart de nos patients.

Les critères d'Amsterdam I ou II et Bethesda ne sont pas suffisants pour détecter tous les patients portant un syndrome de SL, 20 à 25 % restent non diagnostiqués, les tests moléculaires basés sur la recherche d'instabilité des microsatellites (*MSI*) ou analyses immunohistochimiques (*IHC*) dans un CCR, sont généralement recommandés comme outils pour sélectionner les patients à haut risque de SL : (tout cancer colorectal ou du spectre :endomètre, intestin grêle, urothélium, voies biliaires, estomac, ovaire) (*Vasen et al., 2009 ; Vindigni and Kaz, 2015 ; Kidambi et al., 2015*).

La recherche de *MSI* a une sensibilité légèrement supérieure à l'*IHC*, à l'exception des cas associés à une mutation du gène *MSH6*, pour lequel la sensibilité du test peut parfois être prise en défaut (*Barnetson et al., 2006*). Concernant l'*IHC*, l'anticorps peut parfois détecter un fragment d'une protéine *MMR* normalement exprimée, mais non fonctionnelle, augmentant le risque de faux négatif. Les deux techniques peuvent être biaisées sur des tumeurs autres que colorectales, dont le cancer de l'endomètre (*Funkhouser Jr. et al., 2012*). L'utilisation combinée de ces deux techniques permet d'obtenir une sensibilité proche de 100% (*Hampel H, et al., 2005*).

Il semble que les tumeurs *MSI* sporadiques dériveraient d'adénomes sessiles festonnés, qui affichent des caractéristiques moléculaires uniques incluant la mutation V600E (*c.1799A>T*) du gène *BRAF* (*Funkhouser Jr. et al., 2012*). La mutation du gène *BRAF* est présente dans environ 60 à 70 % des tumeurs sporadiques, alors qu'elle est absente dans le cas du syndrome de Lynch (*Wang et al., 2003*), ce qui peut conduire à un diagnostic différentiel.

Par ailleurs, Thiel et al. (2013) ont montré que la mutation V600E est souvent présente dans le groupe de CCR sporadique présentant *MSI-H* (77,8%) et moins fréquemment retrouvée dans le groupe des microsatellites stables (7,6%). Tous les cas du groupe *MSI-H* porteurs de la mutation V600E du gène *BRAF* ont présenté une méthylation du promoteur *MLH1* détecté par la technique *MLPA-MS* (*methylation-specific ; Thiel et al., 2013 ; Yamamoto and Imai, 2015*). En résumé, la présence d'une mutation du gène *BRAF* et d'une hyperméthylation somatique du gène *MLH1* est hautement prédictive de l'absence de syndrome de Lynch, même s'il existe des exceptions (*Crépin et al., 2012*).

A partir de nombreuses données de la recherche des marqueurs génétiques, dès 2011, les principales institutions de cancer et les organismes de santé publique ont créé le réseau de dépistage du SL (*LSSN pour Lynch Syndrome Screening Network*) afin de le promouvoir en analyse de routine, appliquée à tous les CCR et cancers de l'endomètre (*CE*) nouvellement diagnostiqués (*Mange et al., 2015*).

L'étape majeure pour l'identification des familles de SL se base sur le dépistage universel de tous les nouveaux cas de CCR et CE à un âge inférieur à 70 ans ou quelque soit l'âge au diagnostic chez un individu dont un apparenté au premier degré a été atteint d'un cancer colorectal ou du spectre SL par analyse MSI ou analyse IHC des protéines MMR. Cette approche permettrait à terme, la détection de tous les cas de SL (*Vasen et al., 2016*). Les efforts visant à identifier autant de personnes que possible avec un SL, permettra d'éviter plus de cancers et sauver des vies (*Hampel, 2016*). Les analyses Génétiques du risque CCR doivent être incluses dans notre pratique clinique ordinaire.

Une analyse détaillée de l'histoire de la famille est un élément fondamental de cette procédure, il est non seulement important pour l'identification des patients qui présentent un risque élevé de cancer du côlon et devraient recevoir un conseil génétique, mais aussi essentiel pour identifier les individus avec un risque modéré qui devraient bénéficier d'un dépistage plus approfondi.

Cependant suite aux progrès qui ont permis d'obtenir l'analyse génétique du patient suspecté d'être atteint du SL, il se pose un défi majeur de diagnostic qui est la difficulté d'évaluer la pathogénicité et interpréter l'impact de certaines mutations faux-sens ou des variations qui touchent la séquence intronique, variant de signification biologique et clinique Inconnu (*VSI*)(*Rasmussen et al., 2012*). Récemment, la bioinformatique a apporté une importante contribution à la biologie moléculaire par :

- l'exploitation textuelle de la littérature biologique ;
- l'analyse des gènes et l'expression des protéines ;
- la comparaison des données génétiques et génomiques.

L'utilisation des logiciels bioinformatiques permet d'analyser rapidement l'impact sur la protéine et par conséquent sur le phénotype et à classer chaque variant selon sa pathogénicité. Il serait intéressant dans le future d'adopter une certaine stratégie : ainsi, il est important de corréliser l'ensemble des données fonctionnelles obtenues par des méthodes variées :

- tests basés sur la connaissance de la biologie du système MMR, comme l'évaluation fonctionnelle des variants *in silico*.

- analyse de l'activité du variant VSI à l'aide de tests fonctionnels *in vitro* évaluant la fonction MMR.

Pour certains résultats qui peuvent toujours se révéler non contributifs, notamment lorsque les résultats de tests fonctionnels sont difficiles à interpréter, comme les résultats intermédiaires (Barnetson *et al.*, 2008 ; Rasmussen *et al.*, 2012), il est important d'inclure les données cliniques car les altérations biochimiques sévères peuvent se refléter sur les caractéristiques phénotypiques comme l'âge de découverte et la présence de MSI, alors que les variants avec peu ou pas d'altérations dans la fonctionnalité sont associés à un phénotype clinique variable (Raevaara *et al.*, 2005 ; Sijmons *et al.*, 2013).

L'approche combinée reste la meilleure stratégie pour évaluer soit la responsabilité d'un variant dans la maladie (Rasmussen *et al.*, 2012), soit éclaircir la compréhension de la conséquence sur la protéine dans le cas où le phénotype clinique est en faveur de la maladie. Seule une intégration fine de l'ensemble des données cliniques, génétiques, pathologiques, *in silico*, *in vitro* ou *ex vivo* et possiblement *in vivo* fourniront une évaluation fiable de l'impact des variants dans la prédisposition au cancer.

Chez 85% de nos patients, des altérations sur l'un des gènes MMR étudiés ne sont pas retrouvées. Pour cela il serait intéressant d'investiguer d'autres gènes MMR tel que *PMS2*, *MLH3* et *EXO1*. Une nouvelle stratégie a été commentée par Vindigni et Kaz portant sur le développement de technologies telles que le séquençage de haut débit (NGS : *next-generation sequencing*) qui permet le séquençage simultané de plusieurs gènes impliqués dans le SL et autres syndromes de cancer du côlon héréditaire (Vindigni et Kaz, 2015).

La susceptibilité héritée à cette affection serait due à l'addition d'effets provenant de variants appartenant à différents gènes, ayant une fréquence allélique faible, un effet dominant et une action indépendante. Chaque variant conférant un sur-risque modéré mais délectable de provoquer l'apparition de cancer (Bodmer, W *et al.* 2010). Cependant l'effet additif apporté par chaque variant au risque de maladie est extrêmement difficiles à explorer.

De plus, il est important d'étudier les mécanismes épigénétiques tel que l'hyperméthylation des promoteurs de certains gènes impliqués dans les voies intracellulaires impliqués dans la cancérogenèse colorectale, pourrait fournir des explications pour ces cas (Cheah, PY *et al.* 2009 ; Tuohy, TM *et al.* 2010). L'étude de ces gènes pourrait permettre la compréhension de mécanismes d'atteinte par le SL. Malgré ces avancées dans la génétique des CCR, il se pourrait qu'il reste des patients portant un SL sans mutation prouvée dans n'importe quel gène

étudié. Le mosaïcisme germinale pourrait expliquer une fraction mineure de mutation d'apparition *de novo* (Aretz, S et al. 2007; Hes, FJ et al. 2008) ou encore penser à la présence d'un syndrome X dont le mécanisme génétique est encore inconnu.

Il est important de noter que nous avons mis en évidence de nombreux SNP des gènes *MLH1* et *MSH2* dans la plupart de nos patients. Cependant, il s'agit seulement de leur description dans la population d'étude ; l'évaluation du degré d'association de ces SNP et le risque de CCR n'était pas possible. Pour cela, d'autres études approfondies de type cas-témoins seraient nécessaires pour préciser l'impact réel de ces polymorphismes dans la susceptibilité au CCR.

Nous avons confirmé à travers notre étude génétique que les gènes *MSH2*, *MLH1* et *MSH6* contribuent à la susceptibilité aux CCR de type HNPCC dans nos familles. Cependant des conclusions définitives concernant la prévalence du syndrome de Lynch dans la population algérienne ne sont pas possibles. Bien que la limite majeure dans notre travail est le nombre réduit de l'effectif des cas analysés peut être expliqué par : La rareté des cas de CCR héréditaires (1 à 5%) répondant aux critères de sélection (*critères d'AMS I/II et de Bethesda*), le manque de conscience et d'information concernant l'intérêt de dépistage et la prévention contre un CCR familial et le refus de certains patients de participer dans de telles études génétiques ; en outre la présence de certaines contraintes techniques (*manque et non disponibilité des moyens d'investigation moléculaire et histologique et le cout énorme des produits*) qui ont rendu difficile le dépistage de ce type de cancer.

Le bénéfice et les avantages de ces tests génétiques dépendent de la disponibilité et du degré d'acceptation de ces analyses par le patient et de ses apparentés. Une plus grande attention devrait être fournie à la sensibilisation de la population algérienne vis-à-vis de l'importance du dépistage de telles maladies héréditaires. Pour cela, une collaboration pluridisciplinaire entre cliniciens, généticiens et psychologues assurerait une efficacité avérée de cette opération de prévention et lutte contre le cancer.

L'exploration des gènes MMR par séquençage et MLPA, dans ce travail, a permis le développement des analyses génétiques et la mise en œuvre d'un algorithme de diagnostic pour l'identification du SL dans notre laboratoire de Biologie et Génétique Moléculaire à Constantine.

Cependant, il devrait être intéressant d'adopter un programme spécifique pour améliorer les stratégies de l'identification des personnes à risque élevé de CCR. Donc, d'autres tests de dépistage dans les tumeurs doivent être effectués comme les analyses IHC et/ou MSI de tous les CCR. Ceci peut être un outil efficace pour identifier plus de SL dans les familles algériennes. La surveillance des personnes à risque élevé pour le CCR empêche son développement avancé et la prise en charge clinique pourrait réduire la mortalité par cancer des malades et leurs familles.

Sur le plan recherche dans la génétique de CCR, Notre étude a permis l'identification de nouveaux variants d'origine algérienne ayant contribué à enrichir la base de données internationales des variations dans les gènes MMR (LOVD). Notre travail continue... .

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques :

- Adamowicz, K., Wrotkowska, M., and Zaucha, J.M. (2015). Body mass index as a predictor of colorectal cancer. *Przegląd Epidemiol.* 69, 779–785.
- Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V.E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A.S., and Sunyaev, S.R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* 7, 248–249.
- Akiyama, Y., Sato, H., Yamada, T., Nagasaki, H., Tsuchiya, A., Abe, R., and Yuasa, Y. (1997). Germ-Line Mutation of the hMSH6/GTBP Gene in an Atypical Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Kindred. *Cancer Res.* 57, 3920–3923.
- Al Hilal.M, (2005). Etude: Épidémiologie du Cancer (Malades de L'INO entre 1985-2002). *Cancer Au Maroc* 5. <http://www.cancer.ma/Publications/docs/bilan85-2002.aspx>.
- Allan, J.M., Shorto, J., Adlard, J., Bury, J., Coggins, R., George, R., Katory, M., Quirke, P., Richman, S., Scott, D., et al. (2008). MLH1 -93G\textgreaterA promoter polymorphism and risk of mismatch repair deficient colorectal cancer. *Int J Cancer* 123, 2456–2459.
- Allem, R. (2014). Épidémiologie des cancers digestifs dans la région de Chlef (Algérie). *J. Afr. Cancer Afr. J. Cancer* 6, 22–26.
- Al-Tassan, N., Chmiel, N.H., Maynard, J., Fleming, N., Livingston, A.L., Williams, G.T., Hodges, A.K., Davies, D.R., David, S.S., Sampson, J.R., et al. (2002). Inherited variants of MYH associated with somatic G:C->T:A mutations in colorectal tumors. *Nat. Genet.* 30, 227–232.
- Al-Tassan, N., Eisen, T., Maynard, J., Bridle, H., Shah, B., Fleischmann, C., Sampson, J.R., Cheadle, J.P., and Houlston, R.S. (2004). Inherited variants in MYH are unlikely to contribute to the risk of lung carcinoma. *Hum. Genet.* 114, 207–210.
- Alvino, E., Passarelli, F., Cannavò, E., Fortes, C., Mastroeni, S., Caporali, S., Jiricny, J., Cappellini, G.C.A., Scoppola, A., Marchetti, P., et al. (2014). High expression of the mismatch repair protein MSH6 is associated with poor patient survival in melanoma. *Am. J. Clin. Pathol.* 142, 121–132.
- Arriba, M., Sánchez, R., Rueda, D., Gómez, L., García, J.L., Rodríguez, Y., Pajares, J.A., Pérez, J., Urioste, M., Sarmiento, R.G., et al. (2016). Toward a Molecular Classification of Synchronous Colorectal Cancer: Clinical and Molecular Characterization. *Clin. Colorectal Cancer*.
- Arvelo, F., Sojo, F., and Cotte, C. (2015). Biology of colorectal cancer. *ecancermedicalscience* 9.
- Auclair, J., Busine, M.P., Navarro, C., Ruano, E., Montmain, G., Desseigne, F., Saurin, J.C., Lasset, C., Bonadona, V., Giraud, S., et al. (2006). Systematic mRNA analysis for the effect of MLH1 and MSH2 missense and silent mutations on aberrant splicing. *Hum Mutat* 27, 145–154.
- Baillet (2002). Les cancers colorectaux. In *Cancérologie Niveau DCEM3, cours* (France: Faculté de médecine), pp. 235–248.
- Balaguer, F., and Castells, A. (2007). Identification of Lynch syndrome: are we close to the best strategy? *Gastroenterology* 133, 353–355.
- Barnetson, R.A., Tenesa, A., Farrington, S.M., Nicholl, I.D., Cetnarskyj, R., Porteous, M.E., Campbell, H., and Dunlop, M.G. (2006). Identification and survival of carriers of mutations in DNA mismatch-repair genes in colon cancer. *N. Engl. J. Med.* 354, 2751–2763.

- Barnetson, R.A., Cartwright, N., van Vliet, A., Haq, N., Drew, K., Farrington, S., Williams, N., Warner, J., Campbell, H., Porteous, M.E., et al. (2008). Classification of ambiguous mutations in DNA mismatch repair genes identified in a population-based study of colorectal cancer. *Hum Mutat* 29, 367–374.
- Barrow, P.J., Ingham, S., O’Hara, C., Green, K., McIntyre, I., Lalloo, F., Hill, J., and Evans, D.G. (2013). The spectrum of urological malignancy in Lynch syndrome. *Fam. Cancer* 12, 57–63.
- Bartosova, Z., Fridrichova, I., Bujalkova, M., Wolf, B., Ilencikova, D., Krizan, P., Hlavcak, P., Palaj, J., Lukac, L., Lukacova, M., et al. (2003). Novel MLH1 and MSH2 germline mutations in the first HNPCC families identified in Slovakia. *Hum Mutat* 21, 449.
- Baudhuin, L.M., Ferber, M.J., Winters, J.L., Steenblock, K.J., Swanson, R.L., French, A.J., Butz, M.L., and Thibodeau, S.N. (2005). Characterization of hMLH1 and hMSH2 gene dosage alterations in Lynch syndrome patients. *Gastroenterology* 129, 846–854.
- Beauchemin, N. (2011). The colorectal tumor microenvironment: the next decade. *Cancer Microenviron. Off. J. Int. Cancer Microenviron. Soc.* 4, 181–185.
- Beiner, M.E., Rosen, B., Fyles, A., Harley, I., Pal, T., Siminovitch, K., Zhang, S., Sun, P., and Narod, S.A. (2006). Endometrial cancer risk is associated with variants of the mismatch repair genes MLH1 and MSH2. *Cancer Epidemiol Biomark. Prev* 15, 1636–1640.
- Berends, M.J.W., Wu, Y., Sijmons, R.H., Mensink, R.G.J., Sluis, T., Hordijk-Hos, J.M., Vries, E.G.E., Hollema, H., Karrenbeld, A., Buys, C.H.C.M., et al. (2002). Molecular and clinical characteristics of MSH6 variants: an analysis of 25 index carriers of a germline variant. *Am J Hum Genet* 70, 26–37.
- Berginc, G., Bracko, M., Ravnik-Glavac, M., and Glavac, D. (2009). Screening for germline mutations of MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 genes in Slovenian colorectal cancer patients: implications for a population specific detection strategy of Lynch syndrome. *Fam. Cancer* 8, 421–429.
- Betz, B., Theiss, S., Aktas, M., Konermann, C., Goecke, T.O., Möslein, G., Schaal, H., and Royer-Pokora, B. (2010). Comparative in silico analyses and experimental validation of novel splice site and missense mutations in the genes MLH1 and MSH2. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 136, 123–134.
- Bienvenu, T., Meunier, C., Bousquet, S., Chiron, S., Richard, L., Gautheret-Dejean, A., Rouselle, J.F., and Feldmann, D. (1999). [Different procedures for the isolation of DNA from blood samples]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 57, 77–84.
- Binder-Foucard F, Belot A, Delafosse P, Remontet L, Woronoff AS, and Bossard N Estimation nationale de l’incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012 / 2013 / Maladies chroniques et traumatismes / Rapports et synthèses / Publications et outils / Accueil.
- Boige, V., Malka, D., Taïeb, J., Pignon, J.-P., and Ducreux, M. (2004). [Colorectal cancer: prognostic molecular markers]. *Gastroentérologie Clin. Biol.* 28, 21–32.
- Boland, C.R. (2006). Decoding hereditary colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 354, 2815–2817.
- Boland, C.R., and Goel, A. (2010). Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 138, 2073–2087.e3.
- Boland, C.R., and Lynch, H.T. (2013). The History of Lynch Syndrome. *Fam. Cancer* 12, 145–157.
- Boland, C.R., Koi, M., Chang, D.K., and Carethers, J.M. (2007). The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch Syndrome: from bench to bedside. *Fam. Cancer* 7, 41–52.

- Bonadona, V., Bonaïti, B., Olschwang, S., Grandjouan, S., Huiart, L., Longy, M., Guimbaud, R., Buecher, B., Bignon, Y.-J., Caron, O., et al. (2011). Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome. *JAMA* *305*, 2304–2310.
- Borràs, E., Pineda, M., Brieger, A., Hinrichsen, I., Gómez, C., Navarro, M., Balmaña, J., Ramón y Cajal, T., Torres, A., Brunet, J., et al. (2012). Comprehensive functional assessment of MLH1 variants of unknown significance. *Hum. Mutat.* *33*, 1576–1588.
- Botteri, E., Iodice, S., Raimondi, S., Maisonneuve, P., and Lowenfels, A.B. (2008). Cigarette smoking and adenomatous polyps: a meta-analysis. *Gastroenterology* *134*, 388–395.
- Bouguenouch, L., Samri, I., Belhassan, K., Sayel, H., Abbassi, M., Bennis, S., Benajah, D.A., Ibrahim, A., Amarti, A., and Ouldin, K. (2016). Syndrome de Lynch: à propos d'un cas et revue de la littérature. *Pan Afr. Med. J.* *24*.
- Boutron, M.C., Faivre, J., Dop, M.C., Quipourt, V., and Senesse, P. (1995). Tobacco, alcohol, and colorectal tumors: a multistep process. *Am. J. Epidemiol.* *141*, 1038–1046.
- Bouvier, A.-M., Manfredi, S., and Lejeune, C. (2002). The natural history of colorectal cancer revisited. *Gastroentérologie Clin. Biol.* *26*, B56-61.
- Brandis, J.W. (1999). Dye structure affects Taq DNA polymerase terminator selectivity. *Nucleic Acids Res.* *27*, 1912–1918.
- Brentnall, T.A., Rubin, C.E., Crispin, D.A., Stevens, A., Batchelor, R.H., Haggitt, R.C., Bronner, M.P., Evans, J.P., McCahill, L.E., and Bilir, N. (1995). A germline substitution in the human MSH2 gene is associated with high-grade dysplasia and cancer in ulcerative colitis. *Gastroenterology* *109*, 151–155.
- Brosens, L.A.A., Offerhaus, G.J.A., and Giardiello, F.M. (2015). Hereditary Colorectal Cancer: Genetics and Screening. *Surg. Clin. North Am.* *95*, 1067–1080.
- Buecher, B. (2007). Les polyposes adénomateuses associées à MYH. *Gastroentérologie Clin. Biol.* *31*, 775–778.
- Buecher, B. (2011). La polypose associée aux mutations bi-alléliques du Gène MUTYH*. *Hépatogastro* *18*, 241–247.
- Buecher, B., Bonaïti, C., Buisine, M.-P., Colas, C., and Saurin, J.-C. (2012). French experts report on MUTYH-associated polyposis (MAP). *Fam. Cancer* *11*, 321–328.
- Bujalkova, M., Zavodna, K., Krivulcik, T., Ilencikova, D., Wolf, B., Kovac, M., Karner-Hanusch, J., Heinemann, K., Marra, G., Jiricny, J., et al. (2008). Multiplex SNaPshot genotyping for detecting loss of heterozygosity in the mismatch-repair genes MLH1 and MSH2 in microsatellite-unstable tumors. *Clin Chem* *54*, 1844–1854.
- Bunyan, D.J., Eccles, D.M., Sillibourne, J., Wilkins, E., Thomas, N.S., Shea-Simonds, J., Duncan, P.J., Curtis, C.E., Robinson, D.O., Harvey, J.F., et al. (2004). Dosage analysis of cancer predisposition genes by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Br J Cancer* *91*, 1155–1159.
- Burn, J., and Sheth, H. (2016). The role of aspirin in preventing colorectal cancer. *Br. Med. Bull.*
- Burrell, R.A., McClelland, S.E., Endesfelder, D., Groth, P., Weller, M.-C., Shaikh, N., Domingo, E., Kanu, N., Dewhurst, S.M., Gronroos, E., et al. (2013). Replication stress links structural and numerical cancer chromosomal instability. *Nature* *494*, 492–496.

- Campbell, P.T., Curtin, K., Ulrich, C.M., Samowitz, W.S., Bigler, J., Velicer, C.M., Caan, B., Potter, J.D., and Slattery, M.L. (2009). Mismatch repair polymorphisms and risk of colon cancer, tumour microsatellite instability and interactions with lifestyle factors. *Gut* 58, 661–667.
- Campo, E., de la Calle-Martin, O., Miquel, R., Palacin, A., Romero, M., Fabregat, V., Vives, J., Cardesa, A., and Yague, J. (1991). Loss of heterozygosity of p53 gene and p53 protein expression in human colorectal carcinomas. *Cancer Res.* 51, 4436–4442.
- Capocaccia, R., Gatta, G., and Dal Maso, L. (2015). Life expectancy of colon, breast, and testicular cancer patients: an analysis of US-SEER population-based data. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 26, 1263–1268.
- Carneiro da Silva, F., Ferreira, J.R. de O., Torrezan, G.T., Figueiredo, M.C.P., Santos, É.M.M., Nakagawa, W.T., Brianese, R.C., Petrolini de Oliveira, L., Begnani, M.D., Aguiar-Junior, S., et al. (2015). Clinical and Molecular Characterization of Brazilian Patients Suspected to Have Lynch Syndrome. *PloS One* 10, e0139753.
- Castellsagué, E., Liu, J., Volenik, A., Giroux, S., Gagné, R., Maranda, B., Roussel-Jobin, A., Latreille, J., Laframboise, R., Palma, L., et al. (2015). Characterization of a novel founder MSH6 mutation causing Lynch syndrome in the French Canadian population. *Clin. Genet.* 87, 536–542.
- Cebrat, M., and Strzadala, L. (2001). [Role of Wnt signaling and APC protein in the etiology of colorectal cancer]. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 55, 513–524.
- Chan, D.S.M., Lau, R., Aune, D., Vieira, R., Greenwood, D.C., Kampman, E., and Norat, T. (2011). Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. *PloS One* 6, e20456.
- Chan, K.K., Dassanayake, B., Deen, R., Wickramarachchi, R.E., Kumaraage, S.K., Samita, S., and Deen, K.I. (2010). Young patients with colorectal cancer have poor survival in the first twenty months after operation and predictable survival in the medium and long-term: analysis of survival and prognostic markers. *World J. Surg. Oncol.* 8, 82.
- Chan, T.L., Yuen, S.T., Chung, L.P., Ho, J.W., Kwan, K.Y., Chan, A.S., Ho, J.C., Leung, S.Y., and Wyllie, A.H. (1999). Frequent microsatellite instability and mismatch repair gene mutations in young Chinese patients with colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 91, 1221–1226.
- Chang, F., Syrjänen, S., Tervahauta, A., and Syrjänen, K. (1993). Tumourigenesis associated with the p53 tumour suppressor gene. *Br. J. Cancer* 68, 653–661.
- Chao, E.C., Velasquez, J.L., Witherspoon, M.S.L., Rozek, L.S., Peel, D., Ng, P., Gruber, S.B., Watson, P., Rennert, G., Anton-Culver, H., et al. (2008). Accurate classification of MLH1/MSH2 missense variants with multivariate analysis of protein polymorphisms-mismatch repair (MAPP-MMR). *Hum Mutat* 29, 852–860.
- Chapelle, A. de la, and Hampel, H. (2010). Clinical Relevance of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* 28, 3380–3387.
- de la Chapelle, A. (2004). Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer* 4, 769–780.
- de la Chapelle, A. (2005). The incidence of Lynch syndrome. *Fam. Cancer* 4, 233–237.
- Cheadle, J.P., Dolwani, S., and Sampson, J.R. (2003). Inherited defects in the DNA glycosylase MYH cause multiple colorectal adenoma and carcinoma. *Carcinogenesis* 24, 1281–1282; author reply 1283.

- Chen, H., Taylor, N.P., Sotamaa, K.M., Mutch, D.G., Powell, M.A., Schmidt, A.P., Feng, S., Hampel, H.L., de la Chapelle, A., and Goodfellow, P.J. (2007). Evidence for heritable predisposition to epigenetic silencing of MLH1. *Int J Cancer* 120, 1684–1688.
- Chin, Y.R., Yuan, X., Balk, S.P., and Toker, A. (2014). PTEN-deficient tumors depend on AKT2 for maintenance and survival. *Cancer Discov.* 4, 942–955.
- Chouhan, J., Batra, S., Gupta, R., and Guha, S. (2016). Gastrointestinal follicular lymphoma: using primary site as a predictor of survival. *Cancer Med.* 5, 2669–2677.
- Christensen, L.L., Madsen, B.E., Wikman, F.P., Wiuf, C., Koed, K., Tjønneland, A., Olsen, A., Syvänen, A.-C., Andersen, C.L., and Orntoft, T.F. (2008). The association between genetic variants in hMLH1 and hMSH2 and the development of sporadic colorectal cancer in the Danish population. *BMC Med Genet* 9, 52.
- Christie, M., Jorissen, R.N., Mouradov, D., Sakthianandeswaren, A., Li, S., Day, F., Tsui, C., Lipton, L., Desai, J., Jones, I.T., et al. (2013). Different APC genotypes in proximal and distal sporadic colorectal cancers suggest distinct WNT/ β -catenin signalling thresholds for tumorigenesis. *Oncogene* 32, 4675–4682.
- Cleary, S.P., Cotterchio, M., Jenkins, M.A., Kim, H., Bristow, R., Green, R., Haile, R., Hopper, J.L., LeMarchand, L., Lindor, N., et al. (2009). Germline MutY human homologue mutations and colorectal cancer: a multisite case-control study. *Gastroenterology* 136, 1251–1260.
- Clements, W.M., Lowy, A.M., and Groden, J. (2003). Adenomatous polyposis coli/beta-catenin interaction and downstream targets: altered gene expression in gastrointestinal tumors. *Clin. Colorectal Cancer* 3, 113–120.
- Cohen, S.A., and Leininger, A. (2014). The genetic basis of Lynch syndrome and its implications for clinical practice and risk management. *Appl. Clin. Genet.* 7, 147–158.
- Colebatch, A., Hitchins, M., Williams, R., Meagher, A., Hawkins, N.J., and Ward, R.L. (2006). The role of MYH and microsatellite instability in the development of sporadic colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 95, 1239–1243.
- Connor, A.A., Katzov-Eckert, H., Whelan, T., Aronson, M., Lau, L., Marshall, C., Charames, G.S., Pollett, A., Gallinger, S., and Lerner-Ellis, J. (2014). Identification of a novel MSH6 germline variant in a family with multiple gastro-intestinal malignancies by next generation sequencing. *Fam. Cancer* 14, 69–75.
- Cp, Penna, P., E, T., Ah, K., S, O., and R, P. (1991). [Value of screening of familial adenomatous polyposis for the prevention of colorectal cancer]. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 16, 210–214.
- Cravo, M., Afonso, A.J., Lage, P., Albuquerque, C., Maia, L., Lacerda, C., Fidalgo, P., Chaves, P., Cruz, C., and Nobre-Leitão, C. (2002). Pathogenicity of missense and splice site mutations in hMSH2 and hMLH1 mismatch repair genes: implications for genetic testing. *Gut* 50, 405–412.
- Crépin, M., Dieu, M.-C., Lejeune, S., Escande, F., Boidin, D., Porchet, N., Morin, G., Manouvrier, S., Mathieu, M., and Buisine, M.-P. (2012). Evidence of constitutional MLH1 epimutation associated to transgenerational inheritance of cancer susceptibility. *Hum. Mutat.* 33, 180–188.
- Cucina, A., Dinicola, S., Coluccia, P., Proietti, S., D'Anselmi, F., Pasqualato, A., and Bizzarri, M. (2012). Nicotine stimulates proliferation and inhibits apoptosis in colon cancer cell lines through activation of survival pathways. *J. Surg. Res.* 178, 233–241.

- Cui, H., Onyango, P., Brandenburg, S., Wu, Y., Hsieh, C.-L., and Feinberg, A.P. (2002). Loss of imprinting in colorectal cancer linked to hypomethylation of H19 and IGF2. *Cancer Res.* 62, 6442–6446.
- Davidson, N.O. (2007). Genetic testing in colorectal cancer: who, when, how and why. *Keio J. Med.* 56, 14–20.
- Davies, R.J., Miller, R., and Coleman, N. (2005). Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. *Nat. Rev. Cancer* 5, 199–209.
- De Jong, A.E., Morreau, H., Van Puijenbroek, M., Eilers, P.H. c, Wijnen, J., Nagengast, F.M., Griffioen, G., Cats, A., Menko, F.H., Kleibeuker, J.H., et al. (2004). The role of mismatch repair gene defects in the development of adenomas in patients with HNPCC. *Gastroenterology* 126, 42–48.
- De Roock, W., Claes, B., Bernasconi, D., De Schutter, J., Biesmans, B., Fountzilias, G., Kalogeras, K.T., Kotoula, V., Papamichael, D., Laurent-Puig, P., et al. (2010). Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol.* 11, 753–762.
- De Vos, M., Hayward, B.E., Picton, S., Sheridan, E., and Bonthron, D.T. (2004). Novel PMS2 Pseudogenes Can Conceal Recessive Mutations Causing a Distinctive Childhood Cancer Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 74, 954–964.
- Denoix, P. (1946). Enquête permanente dans les centres anticancéreux. *Bull. Inst. Natl. Hygiène Fr.* 1, 12–17.
- Desai, D., Lockman, J., Chadwick, R., Gao, X., Percesepe, A., Evans, D., Miyaki, M., Yuen, S.T., Radice, P., Maher, E., et al. (2000). Recurrent germline mutation in MSH2 arises frequently de novo. *J Med Genet* 37, 646–652.
- Dionigi, G., Bianchi, V., Rovera, F., Boni, L., Annoni, M., Castano, P., Villa, F., and Dionigi, R. (2007). Genetic alteration in hereditary colorectal cancer. *Surg. Oncol.* 16 Suppl 1, S11-15.
- Dipro, S., Al-Otaibi, F., Alzahrani, A., Ulhaq, A., and Al Shail, E. (2012). Turcot syndrome: a synchronous clinical presentation of glioblastoma multiforme and adenocarcinoma of the colon. *Case Rep. Oncol. Med.* 2012, 720273.
- Dominguez-Valentin, M., Therkildsen, C., Da Silva, S., and Nilbert, M. (2015). Familial colorectal cancer type X: genetic profiles and phenotypic features. *Mod. Pathol.* 28, 30–36.
- Dominguez-Valentin, M., Joost, P., Therkildsen, C., Jonsson, M., Rambech, E., and Nilbert, M. (2016). Frequent mismatch-repair defects link prostate cancer to Lynch syndrome. *BMC Urol.* 16, 15.
- Dowty, J.G., Win, A.K., Buchanan, D.D., Lindor, N.M., Macrae, F.A., Clendenning, M., Antill, Y.C., Thibodeau, S.N., Casey, G., Gallinger, S., et al. (2013). Cancer Risks for MLH1 and MSH2 Mutation Carriers. *Hum. Mutat.* 34, 490–497.
- Duval, A., and Hamelin, R. (2002). Mutations at Coding Repeat Sequences in Mismatch Repair-deficient Human Cancers Toward a New Concept of Target Genes for Instability. *Cancer Res.* 62, 2447–2454.
- Duval, A., Gayet, J., Zhou, X.P., Iacopetta, B., Thomas, G., and Hamelin, R. (1999). Frequent frameshift mutations of the TCF-4 gene in colorectal cancers with microsatellite instability. *Cancer Res.* 59, 4213–4215.
- Edge, S.B., and Compton, C.C. (2010). The American Joint Committee on Cancer: the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM. *Ann. Surg. Oncol.* 17, 1471–1474.

- Efrati, E., Tocco, G., Eritja, R., Wilson, S.H., and Goodman, M.F. (1999). "Action-at-a-distance" mutagenesis. 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine causes base substitution errors at neighboring template sites when copied by DNA polymerase beta. *J. Biol. Chem.* 274, 15920–15926.
- El-Bolkainy, T.N., Sakr, M.A., Nouh, A.A., and El-Din, N.H.A. (2006). A comparative study of rectal and colonic carcinoma: demographic, pathologic and TNM staging analysis. *J. Egypt. Natl. Cancer Inst.* 18, 258–263.
- El-Houari, Boukhatem, Si Ahmed, and Bouamra (2011). 4 000 Algériens atteints annuellement, Cancer colorectal, ce mal méconnu - Algérie360.
- Engel, C., Forberg, J., Holinski-Feder, E., Pagenstecher, C., Plaschke, J., Kloor, M., Poremba, C., Pox, C.P., Rüschoff, J., Keller, G., et al. (2006). Novel strategy for optimal sequential application of clinical criteria, immunohistochemistry and microsatellite analysis in the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Int. J. Cancer* 118, 115–122.
- Engel, C., Loeffler, M., Steinke, V., Rahner, N., Holinski-Feder, E., Dietmaier, W., Schackert, H.K., Goergens, H., von Knebel Doeberitz, M., Goecke, T.O., et al. (2012). Risks of less common cancers in proven mutation carriers with lynch syndrome. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 30, 4409–4415.
- Fabre, E., Spano, J.P., and Altan, D. (2000). Le cancer du côlon: mise en point. *Bull. Cancer (Paris)* 87, 5–20.
- Fearon, E.R. (2011). Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu. Rev. Pathol.* 6, 479–507.
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J.W.W., Comber, H., Forman, D., and Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 49, 1374–1403.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* 136, E359-386.
- Fishel, R., Lescoe, M.K., Rao, M.R., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Garber, J., Kane, M., and Kolodner, R. (1993). The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 75, 1027–1038.
- Flejou, J.-F. (2008). Lésions précancéreuses et MICI Aspects anatomopathologiques. *Datarevues0399832000285-Sup140*.
- Fodde, R., Smits, R., and Clevers, H. (2001). APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer* 1, 55–67.
- Friedl, W., Caspari, R., Sengteller, M., Uhlhaas, S., Lamberti, C., Jungck, M., Kadmon, M., Wolf, M., Fahnenstich, J., Gebert, J., et al. (2001). Can APC mutation analysis contribute to therapeutic decisions in familial adenomatous polyposis? Experience from 680 FAP families. *Gut* 48, 515–521.
- Fukui, K. (2010). DNA mismatch repair in eukaryotes and bacteria. *J. Nucleic Acids* 2010.
- Funkhouser Jr., W.K., Lubin, I.M., Monzon, F.A., Zehnbauser, B.A., Evans, J.P., Ogino, S., and Nowak, J.A. (2012). Relevance, Pathogenesis, and Testing Algorithm for Mismatch Repair–Defective Colorectal Carcinomas: A Report of the Association for Molecular Pathology. *J. Mol. Diagn.* 14, 91–103.

- Gama-Sosa, M.A., Slagel, V.A., Trewyn, R.W., Oxenhandler, R., Kuo, K.C., Gehrke, C.W., and Ehrlich, M. (1983). The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res.* *11*, 6883–6894.
- Gatalica, Z., and Torlakovic, E. (2008). Pathology of the hereditary colorectal carcinoma. *Fam. Cancer* *7*, 15–26.
- Geurts-Giele, W.R.R., Leenen, C.H.M., Dubbink, H.J., Meijssen, I.C., Post, E., Sleddens, H.F.B.M., Kuipers, E.J., Goverde, A., van den Ouweland, A.M.W., van Lier, M.G.F., et al. (2014). Somatic aberrations of mismatch repair genes as a cause of microsatellite-unstable cancers. *J. Pathol.* *234*, 548–559.
- Gharbi, O., Chabchoub, I., Limam, S., Hochlef, M., Ben Fatma, L., Landolsi, A., Gahbiche, S., Braham, A., Mokni, M., Ajmi, S., et al. (2010). [Prognostic factors and survival of metastatic colorectal cancer in the Sousse University Hospital (Tunisia): comparative study of two treatment period of 200 patients]. *Bull. Cancer (Paris)* *97*, 445–451.
- Ghimenti, C., Tannergård, P., Wahlberg, S., Liu, T., Giulianotti, P.G., Mosca, F., Fornaciari, G., Bevilacqua, G., Lindblom, A., and Caligo, M.A. (1999). Microsatellite instability and mismatch repair gene inactivation in sporadic pancreatic and colon tumours. *Br J Cancer* *80*, 11–16.
- Goel, A., Nagasaka, T., Hamelin, R., and Boland, C.R. (2010). An optimized pentaplex PCR for detecting DNA mismatch repair-deficient colorectal cancers. *PloS One* *5*, e9393.
- Goessl, C., Plaschke, J., Pistorius, S., Hahn, M., Frank, S., Hampl, M., Görgens, H., Koch, R., Saeger, H.D., and Schackert, H.K. (1997). An intronic germline transition in the HNPCC gene hMSH2 is associated with sporadic colorectal cancer. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* *1990* *33*, 1869–1874.
- Grady, W.M., and Carethers, J.M. (2008). Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* *135*, 1079–1099.
- Graham, R.P., Kerr, S.E., Butz, M.L., Thibodeau, S.N., Halling, K.C., Smyrk, T.C., Dina, M.A., Waugh, V.M., and Rumilla, K.M. (2015). Heterogenous MSH6 Loss Is a Result of Microsatellite Instability Within MSH6 and Occurs in Sporadic and Hereditary Colorectal and Endometrial Carcinomas: *Am. J. Surg. Pathol.* *39*, 1370–1376.
- Grandval, P., Fabre, A.J., Gaildrat, P., Baert-Desurmont, S., Buisine, M.-P., Ferrari, A., Wang, Q., Beroud, C., and Olschwang, S. (2013). UMD-MLH1/MSH2/MSH6 databases: description and analysis of genetic variations in French Lynch syndrome families. *Database Oxf.* *2013*.
- Grandval, P., Fabre, A.J., and Olschwang, S. (2013). Design of a core classification process for DNA mismatch repair variations of a priori unknown functional significance. *Hum. Mutat.* *34*, 920–922.
- Groden, J., Thliveris, A., Samowitz, W., Carlson, M., Gelbert, L., Albertsen, H., Joslyn, G., Stevens, J., Spirio, L., and Robertson, M. (1991). Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* *66*, 589–600.
- Grosclaude, P., Remontet, L., Belot, A., Danzon, A., Rasamimanana Cerf, N., and Bossard, N. (2013). *Survie des personnes atteintes de cancer en France 1989-2007. Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim.*
- Gryfe, R., Kim, H., Hsieh, E.T.K., Aronson, M.D., Holowaty, E.J., Bull, S.B., Redston, M., and Gallinger, S. (2000). Tumor Microsatellite Instability and Clinical Outcome in Young Patients with Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* *342*, 69–77.

- Guarinos, C., Castillejo, A., Barberá, V.-M., Pérez-Carbonell, L., Sánchez-Heras, A.-B., Segura, A., Guillén-Ponce, C., Martínez-Cantó, A., Castillejo, M.-I., Egoavil, C.-M., et al. (2010). EPCAM germ line deletions as causes of Lynch syndrome in Spanish patients. *J. Mol. Diagn. JMD* 12, 765–770.
- Gylling, A., Ridanpää, M., Vierimaa, O., Aittomäki, K., Avela, K., Kääriäinen, H., Laivuori, H., Pöyhönen, M., Sallinen, S.-L., Wallgren-Pettersson, C., et al. (2009). Large genomic rearrangements and germline epimutations in Lynch syndrome. *Int. J. Cancer* 124, 2333–2340.
- Hamdi Cherif, M., Serraino, D., Mahnane, A., Laouamri, S., Zaidi, Z., Boukharouba, H., Cherka, D., Rakeb, M., Kara, L., Ayat, A., et al. (2014). Time trends of cancer incidence in Setif, Algeria, 1986–2010: an observational study. *BMC Cancer* 14.
- Hampel, H. (2016). Genetic counseling and cascade genetic testing in Lynch syndrome. *Fam. Cancer* 1–5.
- Hampel, H., Stephens, J.A., Pukkala, E., Sankila, R., Aaltonen, L.A., Mecklin, J.-P., and de la Chapelle, A. (2005). Cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: later age of onset. *Gastroenterology* 129, 415–421.
- Hampel, H., Frankel, W., Panescu, J., Lockman, J., Sotamaa, K., Fix, D., Comeras, I., La Jeunesse, J., Nakagawa, H., Westman, J.A., et al. (2006). Screening for Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) among endometrial cancer patients. *Cancer Res* 66, 7810–7817.
- Hampel, H., Frankel, W.L., Martin, E., Arnold, M., Khanduja, K., Kuebler, P., Clendenning, M., Sotamaa, K., Prior, T., Westman, J.A., et al. (2008). Feasibility of Screening for Lynch Syndrome Among Patients With Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 26, 5783–5788.
- Hanna, N., Parfait, B., Vidaud, D., and Vidaud, M. (2005). Mécanismes et conséquences des mutations. *MS Médecine Sci.* 21, 969–980.
- Hansen, M.F., Neckmann, U., Lavik, L.A.S., Vold, T., Gilde, B., Toft, R.K., and Sjursen, W. (2014). A massive parallel sequencing workflow for diagnostic genetic testing of mismatch repair genes. *Mol Genet Genomic Med* 2, 186–200.
- Haraldsdottir, S., Hampel, H., Tomsic, J., Frankel, W.L., Pearlman, R., de la Chapelle, A., and Pritchard, C.C. (2014). Colon and Endometrial Cancers With Mismatch Repair Deficiency Can Arise From Somatic, Rather Than Germline, Mutations. *Gastroenterology* 147, 1308–1316.e1.
- Harley, I., Rosen, B., Risch, H.A., Siminovitch, K., Beiner, M.E., McLaughlin, J., Sun, P., and Narod, S.A. (2008). Ovarian cancer risk is associated with a common variant in the promoter sequence of the mismatch repair gene MLH1. *Gynecol. Oncol.* 109, 384–387.
- Heresbach, D. and Heresbach Le Berre, N. (2003). Les foyers de cryptes aberrantes (FCA) coliques : une lésion précancéreuse à dépister ? *Lett. L'hépatogastroentérologie* VI, 23–30.
- Hes, F.J., Nielsen, M., Bik, E.C., Konvalinka, D., Wijnen, J.T., Bakker, E., Vasen, H.F.A., Breuning, M.H., and Tops, C.M.J. (2008). Somatic APC mosaicism: an underestimated cause of polyposis coli. *Gut* 57, 71–76.
- Hishida, A., Matsuo, K., Hamajima, N., Ito, H., Ogura, M., Kagami, Y., Taji, H., Morishima, Y., Emi, N., and Tajima, K. (2003). Polymorphism in the hMSH2 gene (gIVS 12-6T-->C) and risk of non-Hodgkin lymphoma in a Japanese population. *Cancer Genet. Cytogenet.* 147, 71–74.
- Hitchins, M.P. (2013). The role of epigenetics in Lynch syndrome. *Fam. Cancer* 12, 189–205.
- Hitchins, M.P., and Burn, J. (2011). Alu in Lynch syndrome: a danger SINE? *Cancer Prev. Res. Phila. Pa* 4, 1527–1530.

- Hitchins, M.P., Wong, J.J.L., Suthers, G., Suter, C.M., Martin, D.I.K., Hawkins, N.J., and Ward, R.L. (2007). Inheritance of a cancer-associated MLH1 germ-line epimutation. *N. Engl. J. Med.* *356*, 697–705.
- Houdayer, C., Dehainault, C., Mattler, C., Michaux, D., Caux-Moncoutier, V., Pagès-Berhouet, S., Enghien, C.D., Laugé, A., Castera, L., Gauthier-Villars, M., et al. (2008). Evaluation of in silico splice tools for decision-making in molecular diagnosis. *Hum Mutat* *29*, 975–982.
- Houlston, R.S., Cheadle, J., Dobbins, S.E., Tenesa, A., Jones, A.M., Howarth, K., Spain, S.L., Broderick, P., Domingo, E., Farrington, S., et al. (2010). Meta-analysis of three genome-wide association studies identifies susceptibility loci for colorectal cancer at 1q41, 3q26.2, 12q13.13 and 20q13.33. *Nat. Genet.* *42*, 973–977.
- Hsieh, P., and Yamane, K. (2008). DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mech. Ageing Dev.* *129*, 391–407.
- Hsieh, Y.-C., Cho, E.-C., Tu, S.-H., Wu, C.-H., Hung, C.-S., Hsieh, M.-C., Su, C.-T., Liu, Y.-R., Lee, C.-H., Ho, Y.-S., et al. (2016). MSH2 rs2303425 Polymorphism is Associated with Early-Onset Breast Cancer in Taiwan. *Ann. Surg. Oncol.* 1–8.
- Ikushima, H., and Miyazono, K. (2010). Cellular context-dependent “colors” of transforming growth factor-beta signaling. *Cancer Sci.* *101*, 306–312.
- Isidro, G., Laranjeira, F., Pires, A., Leite, J., Regateiro, F., Castro e Sousa, F., Soares, J., Castro, C., Gíria, J., Brito, M.J., et al. (2004). Germline MUTYH (MYH) mutations in Portuguese individuals with multiple colorectal adenomas. *Hum. Mutat.* *24*, 353–354.
- Issa, J.-P. (2004). CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *4*, 988–993.
- Issa, J.-P. (2008). Colon cancer: it’s CIN or CIMP. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *14*, 5939–5940.
- Itzkowitz, S.H., and Yio, X. (2004). Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *287*, G7-17.
- Iwaizumi, M., Tao, H., Yamaguchi, K., Yamada, H., Shinmura, K., Kahyo, T., Yamanaka, Y., Kurachi, K., Sugimoto, K., Furukawa, Y., et al. (2015). A novel APC mosaicism in a patient with familial adenomatous polyposis. *Hum. Genome Var.* *2*, 15057.
- Jacob, S., and Praz, F. (2002). DNA mismatch repair defects: role in colorectal carcinogenesis. *Biochimie* *84*, 27–47.
- Jandova, J., Ohlson, E., Torres B S, M.R., DiGiovanni, R., Pandit, V., Elquza, E., and Nfonsam, V. (2015). Racial disparities and socioeconomic status in the incidence of colorectal cancer in Arizona. *Am. J. Surg.*
- Jansen, A.M., van Wezel, T., van den Akker, B.E., Ventayol Garcia, M., Ruano, D., Tops, C.M., Wagner, A., Letteboer, T.G., Gómez-García, E.B., Devilee, P., et al. (2016). Combined mismatch repair and POLE/POLD1 defects explain unresolved suspected Lynch syndrome cancers. *Eur. J. Hum. Genet.* *24*, 1089–1092.
- Järvinen, H.J., Aarnio, M., Mustonen, H., Aktan–Collan, K., Aaltonen, L.A., Peltomäki, P., Chapelle, A.D.L., and Mecklin, J. (2000). Controlled 15-year trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* *118*, 829–834.
- Jasperson, K.W., Tuohy, T.M., Neklason, D.W., and Burt, R.W. (2010). Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology* *138*, 2044–2058.

- Jass, J.R. (1995). Adenomas and a family history of colorectal cancer. *Gut* 37, 297–298.
- Jiricny, J. (2006). The multifaceted mismatch-repair system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 335–346.
- Johnson, S.M., Gulhati, P., Rampy, B.A., Han, Y., Rychahou, P.G., Doan, H.Q., Weiss, H.L., and Evers, B.M. (2010). Novel expression patterns of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway components in colorectal cancer. *J. Am. Coll. Surg.* 210, 767–776, 776–778.
- Jones, S., Emmerson, P., Maynard, J., Best, J.M., Jordan, S., Williams, G.T., Sampson, J.R., and Cheadle, J.P. (2002). Biallelic germline mutations in MYH predispose to multiple colorectal adenoma and somatic G:C→T:A mutations. *Hum. Mol. Genet.* 11, 2961–2967.
- Jung, C.Y., Choi, J.E., Park, J.M., Chae, M.H., Kang, H.-G., Kim, K.M., Lee, S.J., Lee, W.K., Kam, S., Cha, S.I., et al. (2006). Polymorphisms in the hMSH2 gene and the risk of primary lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomark. Prev* 15, 762–768.
- Kambara, T., Simms, L.A., Whitehall, V.L.J., Spring, K.J., Wynter, C.V.A., Walsh, M.D., Barker, M.A., Arnold, S., McGivern, A., Matsubara, N., et al. (2004). BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. *Gut* 53, 1137–1144.
- Kariola, R., Raevaara, T.E., Lönnqvist, K.E., and Nyström-Lahti, M. (2002). Functional analysis of MSH6 mutations linked to kindreds with putative hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 11, 1303–1310.
- Karoui, M., Tresallet, C., Brouquet, A., Radvanyi, H., and Penna, C. (2007). [Colorectal carcinogenesis. 2. Underlying epigenetic and genetic alterations and molecular classification of colorectal cancers]. *J. Chir. (Paris)* 144, 97–104.
- Kato, M., Takano, M., Miyamoto, M., Sasaki, N., Goto, T., Tsuda, H., and Furuya, K. (2015). DNA mismatch repair-related protein loss as a prognostic factor in endometrial cancers. *J. Gynecol. Oncol.* 26, 40–45.
- Kempers, M.J.E., Kuiper, R.P., Ockeloen, C.W., Chappuis, P.O., Hutter, P., Rahner, N., Schackert, H.K., Steinke, V., Holinski-Feder, E., Morak, M., et al. (2011). Risk of colorectal and endometrial cancers in EPCAM deletion-positive Lynch syndrome: a cohort study. *Lancet Oncol.* 12, 49–55.
- Kerber, R.A., Neklason, D.W., Samowitz, W.S., and Burt, R.W. (2005). Frequency of familial colon cancer and hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) in a large population database. *Fam. Cancer* 4, 239–244.
- Kidambi, T.D., Blanco, A., Myers, M., Conrad, P., Loranger, K., and Terdiman, J.P. (2015). Selective Versus Universal Screening for Lynch Syndrome: A Six-Year Clinical Experience. *Dig. Dis. Sci.* 60, 2463–2469.
- Kinzler, K.W., Nilbert, M.C., Su, L.K., Vogelstein, B., Bryan, T.M., Levy, D.B., Smith, K.J., Preisinger, A.C., Hedge, P., and McKechnie, D. (1991). Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 253, 661–665.
- Kirkegaard, H., Johnsen, N.F., Christensen, J., Frederiksen, K., Overvad, K., and Tjønneland, A. (2010). Association of adherence to lifestyle recommendations and risk of colorectal cancer: a prospective Danish cohort study. *BMJ* 341, c5504.
- Kliff, H., Wijnen, J., Wagner, A., Verkuilen, P., Tops, C., Otway, R., Kohonen-Corish, M., Vasen, H., Oliani, C., Barana, D., et al. (2005). Molecular characterization of the spectrum of genomic deletions in the mismatch repair genes MSH2, MLH1, MSH6, and PMS2 responsible for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Genes. Chromosomes Cancer* 44, 123–138.

- Knudsen, A.L., Bisgaard, M.L., and Bülow, S. (2003). Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP). A review of the literature. *Fam. Cancer* 2, 43–55.
- Knudsen, A.L., Bülow, S., Tomlinson, I., Möslein, G., Heinimann, K., Christensen, I.J., and AFAP Study Group (2010). Attenuated familial adenomatous polyposis: results from an international collaborative study. *Colorectal Dis. Off. J. Assoc. Coloproctology G. B. Irel.* 12, e243-249.
- Kolodner, R.D., Tytell, J.D., Schmeits, J.L., Kane, M.F., Gupta, R.D., Weger, J., Wahlberg, S., Fox, E.A., Peel, D., Ziogas, A., et al. (1999). Germ-line msh6 mutations in colorectal cancer families. *Cancer Res* 59, 5068–5074.
- Kovacs, M.E., Papp, J., Szentirmay, Z., Otto, S., and Olah, E. (2009). Deletions removing the last exon of TACSTD1 constitute a distinct class of mutations predisposing to Lynch syndrome. *Hum. Mutat.* 30, 197–203.
- Krüger, S., Bier, A., Plaschke, J., Höhl, R., Aust, D.E., Kreuz, F.R., Pistorius, S.R., Saeger, H.D., Rothhammer, V., Al-Taie, O., et al. (2004). Ten novel MSH2 and MLH1 germline mutations in families with HNPCC. *Hum. Mutat.* 24, 351–352.
- Kunkel, T.A., and Erie, D.A. (2005). Dna Mismatch Repair. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 681–710.
- Kwok, C.-T., Vogelaar, I.P., van Zelst-Stams, W.A., Mensenkamp, A.R., Ligtenberg, M.J., Rapkins, R.W., Ward, R.L., Chun, N., Ford, J.M., Ladabaum, U., et al. (2014). The MLH1 c.-27C>A and c.85G>T variants are linked to dominantly inherited MLH1 epimutation and are borne on a European ancestral haplotype. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 22, 617–624.
- La ligue contre le cancer (2009). les cancers du colon et du rectum.
- Laarabi, F.Z., Cherkaoui Jaouad, I., Baert-Desurmont, S., Ouldin, K., Ibrahimi, A., Kanouni, N., Frebourg, T., and Sefiani, A. (2012). The first mutations in the MYH gene reported in Moroccan colon cancer patients. *Gene* 496, 55–58.
- Larsson, S.C., and Wolk, A. (2006). Meat consumption and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective studies. *Int. J. Cancer* 119, 2657–2664.
- Laurent-Puig, P., Agostini, J., and Maley, K. (2010). [Colorectal oncogenesis]. *Bull. Cancer (Paris)* 97, 1311–1321.
- Laurenty, A.-P., Janick, S., and Guimbaud, R. (2014). Biomarqueurs des cancers colorectaux utiles en pratique clinique.
- Leach, F.S., Nicolaides, N.C., Papadopoulos, N., Liu, B., Jen, J., Parsons, R., Peltomäki, P., Sistonen, P., Aaltonen, L.A., and Nyström-Lahti, M. (1993). Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 75, 1215–1225.
- Lee, B.H., Kim, M.J., and Park, H.C. (2016). Exposure to Cigarette Smoke Contributes to the Risk of Developing a Colorectal Adenoma, Doesn't It? Are Repeated Exposures to Such Smoke Dangerous? *Ann. Coloproctology* 32, 43–44.
- Lee, S.-C., Guo, J.-Y., Lim, R., Soo, R., Koay, E., Salto-Tellez, M., Leong, A., and Goh, B.-C. (2005). Clinical and molecular characteristics of hereditary non-polyposis colorectal cancer families in Southeast Asia. *Clin Genet* 68, 137–145.
- Lefevre, J.H., Colas, C., Coulet, F., Bonilla, C., Mourra, N., Flejou, J.-F., Tiret, E., Bodmer, W., Soubrier, F., and Parc, Y. (2010). MYH biallelic mutation can inactivate the two genetic pathways of colorectal cancer by APC or MLH1 transversions. *Fam. Cancer* 9, 589–594.

- Leggett, B., and Whitehall, V. (2010). Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* 138, 2088–2100.
- Levine, A.J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323–331.
- Lewis, C., Xun, P., and He, K. (2016). Vitamin D supplementation and quality of life following diagnosis in stage II colorectal cancer patients: a 24-month prospective study. *Support. Care Cancer Off. J. Multinat. Assoc. Support. Care Cancer* 24, 1655–1661.
- Li, L., McVety, S., Younan, R., Liang, P., Du Sart, D., Gordon, P.H., Hutter, P., Hogervorst, F.B.L., Chong, G., and Foulkes, W.D. (2006). Distinct patterns of germ-line deletions in MLH1 and MSH2: the implication of Alu repetitive element in the genetic etiology of Lynch syndrome (HNPCC). *Hum. Mutat.* 27, 388–388.
- Li, W., Qiu, T., Zhi, W., Shi, S., Zou, S., Ling, Y., Shan, L., Ying, J., and Lu, N. (2015). Colorectal carcinomas with KRAS codon 12 mutation are associated with more advanced tumor stages. *BMC Cancer* 15.
- Lièvre, A., and Laurent-Puig, P. (2004). [Colorectal carcinogenesis: update]. *Rev. Prat.* 54, 143–150.
- Lièvre, A., and Laurent-Puig, P. (2010). La voie de signalisation RAS/MAPK RAS/MAPK signaling pathway. *Cancéro Dig* 2, 38–42.
- Ligtenberg, M.J.L., Kuiper, R.P., Chan, T.L., Goossens, M., Hebeda, K.M., Voorendt, M., Lee, T.Y.H., Bodmer, D., Hoenselaar, E., Hendriks-Cornelissen, S.J.B., et al. (2009). Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat. Genet.* 41, 112–117.
- Ligtenberg, M.J.L., Kuiper, R.P., Geurts van Kessel, A., and Hoogerbrugge, N. (2013). EPCAM deletion carriers constitute a unique subgroup of Lynch syndrome patients. *Fam. Cancer* 12, 169–174.
- Lipton, L., Halford, S.E., Johnson, V., Novelli, M.R., Jones, A., Cummings, C., Barclay, E., Sieber, O., Sadat, A., Bisgaard, M.-L., et al. (2003). Carcinogenesis in MYH-associated polyposis follows a distinct genetic pathway. *Cancer Res.* 63, 7595–7599.
- Liu, B., Parsons, R.E., Hamilton, S.R., Petersen, G.M., Lynch, H.T., Watson, P., Markowitz, S., Willson, J.K., Green, J., and Chapelle, A. (1994). hMSH2 mutations in hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindreds. *Cancer Res* 54, 4590–4594.
- Lo, Y.-L., Hsiao, C.-F., Jou, Y.-S., Chang, G.-C., Tsai, Y.-H., Su, W.-C., Chen, K.-Y., Chen, Y.-M., Huang, M.-S., Hsieh, W.-S., et al. (2011). Polymorphisms of MLH1 and MSH2 genes and the risk of lung cancer among never smokers. *Lung Cancer* 72, 280–286.
- Lo Muzio, L. (2001). A possible role for the WNT-1 pathway in oral carcinogenesis. *Crit. Rev. Oral Biol. Med. Off. Publ. Am. Assoc. Oral Biol.* 12, 152–165.
- Lugli, A., Zlobec, I., Minoo, P., Baker, K., Tornillo, L., Terracciano, L., and Jass, J.R. (2006). Role of the mitogen-activated protein kinase and phosphoinositide 3-kinase/AKT pathways downstream molecules, phosphorylated extracellular signal-regulated kinase, and phosphorylated AKT in colorectal cancer—a tissue microarray-based approach. *Hum. Pathol.* 37, 1022–1031.
- Lynch, H.T., and Chapelle, A. (1999). Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 36, 801–818.
- Lynch, H.T., and Krush, A.J. (1971). Cancer family “G” revisited: 1895-1970. *Cancer* 27, 1505–1511.

- Lynch, H.T., Shaw, M.W., Magnuson, C.W., Larsen, A.L., and Krush, A.J. (1966). Hereditary factors in cancer. Study of two large midwestern kindreds. *Arch. Intern. Med.* *117*, 206–212.
- Lynch, H.T., Smyrk, T., McGinn, T., Lanspa, S., Cavalieri, J., Lynch, J., Slominski-Castor, S., Cayouette, M.C., Priluck, I., and Luce, M.C. (1995). Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP) a phenotypically and genotypically distinctive variant of FAP. *Cancer* *76*, 2427–2433.
- Lynch, H.T., Boland, C.R., Gong, G., Shaw, T.G., Lynch, P.M., Fodde, R., Lynch, J.F., and de la Chapelle, A. (2006). Phenotypic and genotypic heterogeneity in the Lynch syndrome: diagnostic, surveillance and management implications. *Eur. J. Hum. Genet.* *14*, 390–402.
- Lynch, H.T., Lynch, J.F., Lynch, P.M., and Attard, T. (2008). Hereditary colorectal cancer syndromes: molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management. *Fam. Cancer* *7*, 27–39.
- Ma, X., Zhang, B., and Zheng, W. (2014). Genetic variants associated with colorectal cancer risk: comprehensive research synopsis, meta-analysis, and epidemiological evidence. *Gut* *63*, 326–336.
- MacFarlane, A.J., and Stover, P.J. (2007). Convergence of genetic, nutritional and inflammatory factors in gastrointestinal cancers. *Nutr. Rev.* *65*, S157-166.
- Macrae, F., du Sart, D., and Nasioulas, S. (2009). Familial adenomatous polyposis. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* *23*, 197–207.
- Madisen, L., Hoar, D.I., Holroyd, C.D., Crisp, M., and Hodes, M.E. (1987). DNA banking: the effects of storage of blood and isolated DNA on the integrity of DNA. *Am. J. Med. Genet.* *27*, 379–390.
- Mange, S., Bellcross, C., Cragun, D., Duquette, D., Gorman, L., Hampel, H., and Jasperson, K. (2015). Creation of a network to promote universal screening for Lynch syndrome: the LynchSyndrome Screening Network. *J. Genet. Couns.* *24*, 421–427.
- Mangold, E., Pagenstecher, C., Friedl, W., Mathiak, M., Buettner, R., Engel, C., Loeffler, M., Holinski-Feder, E., Müller-Koch, Y., Keller, G., et al. (2005). Spectrum and frequencies of mutations in MSH2 and MLH1 identified in 1,721 German families suspected of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Int. J. Cancer* *116*, 692–702.
- Manolio, T.A. (2010). Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *N. Engl. J. Med.* *363*, 166–176.
- Martínez-Bouzas, C., Ojembarrena, E., Beristain, E., Errasti, J., Viguera, N., and Tejada Minguéz, M.-I. (2007). High proportion of large genomic rearrangements in hMSH2 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) families of the Basque Country. *Cancer Lett* *255*, 295–299.
- Martín-López, J.V., and Fishel, R. (2013). The mechanism of mismatch repair and the functional analysis of mismatch repair defects in Lynch syndrome. *Fam. Cancer* *12*, 159–168.
- Meddah, D., Meddah, B., Tir Touil, A., Ghalek, M., and Sahraoui, T. (2009). Étude épidémiologique du cancer du côlon chez des patients de l'Ouest algérien. *J. Afr. Cancer Afr. J. Cancer* *1*, 31–35.
- Menendez, D., Inga, A., and Resnick, M.A. (2009). The expanding universe of p53 targets. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 724–737.
- Mensenkamp, A.R., Vogelaar, I.P., van Zelst-Stams, W.A.G., Goossens, M., Ouchene, H., Hendriks-Cornelissen, S.J.B., Kwint, M.P., Hoogerbrugge, N., Nagtegaal, I.D., and Ligtenberg, M.J.L. (2014). Somatic Mutations in MLH1 and MSH2 Are a Frequent Cause of Mismatch-Repair Deficiency in Lynch Syndrome-Like Tumors. *Gastroenterology* *146*, 643–646.e8.

- Mercader, P. (2010). Muir-Torre syndrome. *Adv. Exp. Med. Biol.* 685, 186–195.
- Miller, S.A., Dykes, D.D., and Polesky, H.F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16, 1215.
- Miyaki, M., and Kuroki, T. (2003). Role of Smad4 (DPC4) inactivation in human cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306, 799–804.
- Miyaki, M., Konishi, M., Muraoka, M., Kikuchi-Yanoshita, R., Tanaka, K., Iwama, T., Mori, T., Koike, M., Ushio, K., and Chiba, M. (1995). Germ line mutations of hMSH2 and hMLH1 genes in Japanese families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC): usefulness of DNA analysis for screening and diagnosis of HNPCC patients. *J Mol Med* 73, 515–520.
- Miyaki, M., Iijima, T., Yamaguchi, T., Shirahama, S., Ito, T., Yasuno, M., and Mori, T. (2004). Novel germline hMSH2 genomic deletion and somatic hMSH2 mutations in a hereditary nonpolyposis colorectal cancer family. *Mutat. Res.* 548, 19–25.
- Modrich, P. (2006). Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. *J. Biol. Chem.* 281, 30305–30309.
- Modrich, P. (2016). Mechanisms in *E. coli* and Human Mismatch Repair (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* n/a-n/a.
- Modrich, P., and Lahue, R. (1996). Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 101–133.
- Mojtahed, A., Schrijver, I., Ford, J.M., Longacre, T.A., and Pai, R.K. (2011). A two-antibody mismatch repair protein immunohistochemistry screening approach for colorectal carcinomas, skin sebaceous tumors, and gynecologic tract carcinomas. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 24, 1004–1014.
- Morak, M., Heidenreich, B., Keller, G., Hampel, H., Laner, A., de la Chapelle, A., and Holinski-Feder, E. (2014). Biallelic MUTYH mutations can mimic Lynch syndrome. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 22, 1334–1337.
- Moussa, S.A.-B., Moussa, A., Kourda, N., Mezlini, A., Abdelli, N., Zerimech, F., Najjar, T., Jilani, S.B., Porchet, N., Ayed, F.B., et al. (2011). Lynch syndrome in Tunisia: first description of clinical features and germline mutations. *Int J Colorectal Dis* 26, 455–467.
- Mrkonjic, M., Raptis, S., Green, R.C., Monga, N., Daftary, D., Dicks, E., Youngusband, H.B., Parfrey, P.S., Gallinger, S.S., McLaughlin, J.R., et al. (2007). MSH2 118T>C and MSH6 159C>T promoter polymorphisms and the risk of colorectal cancer. *Carcinogenesis* 28, 2575–2580.
- Mrkonjic, M., Roslin, N.M., Greenwood, C.M., Raptis, S., Pollett, A., Laird, P.W., Pethe, V.V., Chiang, T., Daftary, D., Dicks, E., et al. (2010). Specific variants in the MLH1 gene region may drive DNA methylation, loss of protein expression, and MSI-H colorectal cancer. *PLoS ONE* 5, e13314.
- Muir, E.G., Bell, A.J., and Barlow, K.A. (1967). Multiple primary carcinomata of the colon, duodenum, and larynx associated with kerato-acanthomata of the face. *Br. J. Surg.* 54, 191–195.
- Mur, P., Pineda, M., Romero, A., del Valle, J., Borràs, E., Canal, A., Navarro, M., Brunet, J., Rueda, D., Ramón y Cajal, T., et al. (2014). Identification of a founder *EPCAM* deletion in Spanish Lynch syndrome families: New founder deletion in the *EPCAM* gene. *Clin. Genet.* 85, 260–266.
- Murata, H., Khattar, N.H., Kang, Y., Gu, L., and Li, G.-M. (2002). Genetic and epigenetic modification of mismatch repair genes hMSH2 and hMLH1 in sporadic breast cancer with microsatellite instability. *Oncogene* 21, 5696–5703.

- Naccarati, A., Polakova, V., Pardini, B., Vodickova, L., Hemminki, K., Kumar, R., and Vodicka, P. (2012). Mutations and polymorphisms in TP53 gene--an overview on the role in colorectal cancer. *Mutagenesis* 27, 211–218.
- Nagase, H., Miyoshi, Y., Horii, A., Aoki, T., Ogawa, M., Utsunomiya, J., Baba, S., Sasazuki, T., and Nakamura, Y. (1992). Correlation between the location of germ-line mutations in the APC gene and the number of colorectal polyps in familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res.* 52, 4055–4057.
- Nakabeppu, Y., Sakumi, K., Sakamoto, K., Tsuchimoto, D., Tsuzuki, T., and Nakatsu, Y. (2006). Mutagenesis and carcinogenesis caused by the oxidation of nucleic acids. *Biol. Chem.* 387, 373–379.
- NAKAMURA, K., BANNO, K., YANOKURA, M., IIDA, M., ADACHI, M., MASUDA, K., UEKI, A., KOBAYASHI, Y., NOMURA, H., HIRASAWA, A., et al. (2014). Features of ovarian cancer in Lynch syndrome (Review). *Mol. Clin. Oncol.* 2, 909–916.
- Narayan, S., and Roy, D. (2003). Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Mol. Cancer* 2, 41.
- Nguyen, S.A., Stechishin, O.D.M., Luchman, H.A., Lun, X.Q., Senger, D.L., Robbins, S.M., Cairncross, J.G., and Weiss, S. (2014). Novel MSH6 mutations in treatment-naïve glioblastoma and anaplastic oligodendroglioma contribute to temozolomide resistance independently of MGMT promoter methylation. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 20, 4894–4903.
- Niessen, R.C., Kleibeuker, J.H., Jager, P.O.J., Sijmons, R.H., and Hofstra, R.M.W. (2007). Getting rid of the PMS2 pseudogenes: mission impossible? *Hum. Mutat.* 28, 414; author reply 415.
- Niessen, R.C., Hofstra, R.M.W., Westers, H., Ligtenberg, M.J.L., Kooi, K., Jager, P.O.J., de Groote, M.L., Dijkhuizen, T., Olderode-Berends, M.J.W., Hollema, H., et al. (2009). Germline hypermethylation of MLH1 and EPCAM deletions are a frequent cause of Lynch syndrome. *Genes. Chromosomes Cancer* 48, 737–744.
- Niskakoski, A., Kaur, S., Renkonen-Sinisalo, L., Lassus, H., Järvinen, H.J., Mecklin, J.-P., Bützow, R., and Peltomäki, P. (2013). Distinct molecular profiles in Lynch syndrome-associated and sporadic ovarian carcinomas. *Int. J. Cancer* 133, 2596–2608.
- Niu, L., Li, S., Liang, H., and Li, H. (2015). The hMLH1 –93G>A Polymorphism and Risk of Ovarian Cancer in the Chinese Population. *PLoS ONE* 10, e0135822.
- Obmolova, G., Ban, C., Hsieh, P., and Yang, W. (2000). Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA. *Nature* 407, 703–710.
- Ochiai, M., Hippo, Y., Izumiya, M., Watanabe, M., and Nakagama, H. (2014). Newly defined aberrant crypt foci as a marker for dysplasia in the rat colon. *Cancer Sci.* 105, 943–950.
- Offerhaus, G.J., De Feyter, E.P., Cornelisse, C.J., Tersmette, K.W., Floyd, J., Kern, S.E., Vogelstein, B., and Hamilton, S.R. (1992). The relationship of DNA aneuploidy to molecular genetic alterations in colorectal carcinoma. *Gastroenterology* 102, 1612–1619.
- Olschwang, S., and Eisinger, F. (2005). Prédiposition héréditaire au cancer colorectal et inactivation de la fonction de réparation des mésappariements de l'ADN. *EMC - Hépatogastroentérologie* 2, 214–222.
- Olschwang, S., Hamelin, R., Laurent-Puig, P., Thuille, B., De Rycke, Y., Li, Y.J., Muzeau, F., Girodet, J., Salmon, R.J., and Thomas, G. (1997). Alternative genetic pathways in colorectal carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 12122–12127.

Otani, T., Iwasaki, M., Yamamoto, S., Sobue, T., Hanaoka, T., Inoue, M., Tsugane, S., and Japan Public Health Center-based Prospective Study Group (2003). Alcohol consumption, smoking, and subsequent risk of colorectal cancer in middle-aged and elderly Japanese men and women: Japan Public Health Center-based prospective study. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* *12*, 1492–1500.

Oukkal, M., Bouzid, K. (2006). Études épidémiologiques des cancers colorectaux au service d'oncologie médicale du CPMC d'Alger. *Registre Tumor Alger*, 3–64.

Pagin, A., Zerimech, F., Leclerc, J., Wacrenier, A., Lejeune, S., Descarpentries, C., Escande, F., Porchet, N., and Buisine, M.-P. (2013). Evaluation of a new panel of six mononucleotide repeat markers for the detection of DNA mismatch repair-deficient tumours. *Br. J. Cancer* *108*, 2079–2087.

Parsons, M.T., Buchanan, D.D., Thompson, B., Young, J.P., and Spurdle, A.B. (2012). Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. *J. Med. Genet.* *49*, 151–157.

Parsons, R., Myeroff, L.L., Liu, B., Willson, J.K., Markowitz, S.D., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1995). Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res.* *55*, 5548–5550.

Paz-y-Miño, C., Pérez, J.C., Fiallo, B.F., and Leone, P.E. (2002). A polymorphism in the hMSH2 gene (gIVS12-6T>C) associated with non-Hodgkin lymphomas. *Cancer Genet. Cytogenet.* *133*, 29–33.

Peltomäki, P. (2001). Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum Mol Genet* *10*, 735–740.

Peltomäki, P. (2014). Epigenetic mechanisms in the pathogenesis of Lynch syndrome. *Clin. Genet.* *85*, 403–412.

Peltomäki, P. (2016). Update on Lynch syndrome genomics. *Fam. Cancer* *15*, 385–393.

Peltomäki, P., and Vasen, H. (2004). Mutations associated with HNPCC predisposition -- Update of ICG-HNPCC/INSiGHT mutation database. *Dis. Markers* *20*, 269–276.

Peltomäki, P., Lothe, R.A., Aaltonen, L.A., Pylkkänen, L., Nyström-Lahti, M., Seruca, R., David, L., Holm, R., Ryberg, D., Haugen, A., et al. (1993). Microsatellite Instability Is Associated with Tumors That Characterize the Hereditary Non-Polyposis Colorectal Carcinoma Syndrome. *Cancer Res.* *53*, 5853–5855.

Pensotti, V., Radice, P., Presciuttini, S., Calistri, D., Gazzoli, I., Grimalt Perez, A., Mondini, P., Buonsanti, G., Sala, P., Rossetti, C., et al. (1997). Mean age of tumor onset in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) families correlates with the presence of mutations in DNA mismatch repair genes. *Genes. Chromosomes Cancer* *19*, 135–142.

Pérez-Cabornero, L., Borrás Flores, E., Infante Sanz, M., Velasco Sampedro, E., Acedo Becares, A., Lastra Aras, E., Cuevas González, J., Pineda Riu, M., Ramón y Cajal Asensio, T., Capellá Munar, G., et al. (2011). Characterization of new founder Alu-mediated rearrangements in MSH2 gene associated with a Lynch syndrome phenotype. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa* *4*, 1546–1555.

Pérez-Cabornero, L., Infante, M., Velasco, E., Lastra, E., Miner, C., and Durán, M. (2013). Genotype-phenotype correlation in MMR mutation-positive families with Lynch syndrome. *Int J Colorectal Dis* *28*, 1195–1201.

- Perron, L.M.D., and Ph, D. (2011). L'incidence du cancer colorectal selon le sexe et le site anatomique. *Québec 11*, 2011.
- Piard, F., Martin, L., Chapusot, C., Ponnelle, T., and Faivre, J. (2002). Les voies de la carcinogenèse colorectale : intérêt et application pour le pathologiste. *Ann. Pathol.* 22, 277–288.
- Pietsch, E.C., Humbey, O., and Murphy, M.E. (2006). Polymorphisms in the p53 pathway. *Oncogene* 25, 1602–1611.
- Pino, M.S., and Chung, D.C. (2010). The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* 138, 2059–2072.
- Pino, M.S., and Chung, D.C. (2011). Microsatellite instability in the management of colorectal cancer. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 5, 385–399.
- Piñol, V., Castells, A., Andreu, M., Castellví-Bel, S., Alenda, C., Llor, X., Xicola, R.M., Rodríguez-Moranta, F., Payá, A., Jover, R., et al. (2005). Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *JAMA* 293, 1986–1994.
- Pistorius, S., Görgens, H., Plaschke, J., Hoehl, R., Krüger, S., Engel, C., Saeger, H.-D., and Schackert, H.K. (2007). Genomic rearrangements in MSH2, MLH1 or MSH6 are rare in HNPCC patients carrying point mutations. *Cancer Lett.* 248, 89–95.
- Plazzer, J.P., Sijmons, R.H., Woods, M.O., Peltomäki, P., Thompson, B., Dunnen, J.T.D., and Macrae, F. (2013). The InSiGHT database: utilizing 100 years of insights into Lynch Syndrome. *Fam. Cancer* 12, 175–180.
- Plocharczyk, E.F., Frankel, W.L., Hampel, H., and Peters, S.B. (2013). Mismatch repair protein deficiency is common in sebaceous neoplasms and suggests the importance of screening for Lynch syndrome. *Am. J. Dermatopathol.* 35, 191–195.
- Plótár, V., Liskay, G., Ladányi, A., and Tóth, E. (2013). [New TNM classification (AJCC 2009) and the pathological significance of sentinel lymph node biopsy in malignant melanoma]. *Magy. Onkol.* 57, 68–72.
- Polakis, P. (1999). The oncogenic activation of beta-catenin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9, 15–21.
- Ponti, G., Castellsagué, E., Ruini, C., Percesepe, A., and Tomasi, A. (2015). Mismatch repair genes founder mutations and cancer susceptibility in Lynch syndrome. *Clin. Genet.* 87, 507–516.
- Poplawski, T., Sobczuk, A., Sarnik, J., Pawlowska, E., and Blasiak, J. (2015). Polymorphism of DNA mismatch repair genes in endometrial cancer. *Exp. Oncol.* 37, 44–47.
- Poynter, J.N., Siegmund, K.D., Weisenberger, D.J., Long, T.I., Thibodeau, S.N., Lindor, N., Young, J., Jenkins, M.A., Hopper, J.L., Baron, J.A., et al. (2008). Molecular characterization of MSI-H colorectal cancer by MLH1 promoter methylation, immunohistochemistry, and mismatch repair germline mutation screening. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 17, 3208–3215.
- Pretlow, T.P., O’Riordan, M.A., Pretlow, T.G., and Stellato, T.A. (1992). Aberrant crypts in human colonic mucosa: putative preneoplastic lesions. *J. Cell. Biochem. Suppl.* 16G, 55–62.
- Prior, I.A., and Hancock, J.F. (2012). Ras trafficking, localization and compartmentalized signalling. *Semin. Cell Dev. Biol.* 23, 145–153.

- Pritchard, C.C., Morrissey, C., Kumar, A., Zhang, X., Smith, C., Coleman, I., Salipante, S.J., Milbank, J., Yu, M., Grady, W.M., et al. (2014). Complex MSH2 and MSH6 mutations in hypermutated microsatellite unstable advanced prostate cancer. *Nat. Commun.* 5, 4988.
- Raevaara, T.E., Korhonen, M.K., Lohi, H., Hampel, H., Lynch, E., Lönnqvist, K.E., Holinski-Feder, E., Sutter, C., McKinnon, W., Duraisamy, S., et al. (2005). Functional significance and clinical phenotype of nontruncating mismatch repair variants of MLH1. *Gastroenterology* 129, 537–549.
- Rasmussen, L.J., Heinen, C.D., Royer-Pokora, B., Drost, M., Tavtigian, S., Hofstra, R.M.W., and de Wind, N. (2012). Pathological assessment of mismatch repair gene variants in Lynch syndrome: past, present, and future. *Hum. Mutat.* 33, 1617–1625.
- Rehm, J. (2011). The risks associated with alcohol use and alcoholism. *Alcohol Res. Health J. Natl. Inst. Alcohol Abuse Alcohol.* 34, 135–143.
- Rey, J.-M., Noruzinia, M., Brouillet, J.-P., Sarda, P., Maudelonde, T., and Pujol, P. (2004). Six novel heterozygous MLH1, MSH2, and MSH6 and one homozygous MLH1 germline mutations in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 155, 149–151.
- Rodrigues, N.R., Rowan, A., Smith, M.E., Kerr, I.B., Bodmer, W.F., Gannon, J.V., and Lane, D.P. (1990). p53 mutations in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 7555–7559.
- Rodriguez-Bigas, M.A., Boland, C.R., Hamilton, S.R., Henson, D.E., Jass, J.R., Khan, P.M., Lynch, H., Perucho, M., Smyrk, T., Sobin, L., et al. (1997). A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst* 89, 1758–1762.
- Roh, S.A., Kim, H.C., Kim, J.S., and Kim, J.C. (2003). Characterization of mutator pathway in younger-age-onset colorectal adenocarcinomas. *J. Korean Med. Sci.* 18, 387–391.
- Roncari, B., Pedroni, M., Maffei, S., Di Gregorio, C., Ponti, G., Scarselli, A., Losi, L., Benatti, P., Roncucci, L., De Gaetani, C., et al. (2007). Frequency of constitutional MSH6 mutations in a consecutive series of families with clinical suspicion of HNPCC. *Clin. Genet.* 72, 230–237.
- Roscigno, R.F., Weiner, M., and Garcia-Blanco, M.A. (1993). A mutational analysis of the polypyrimidine tract of introns. Effects of sequence differences in pyrimidine tracts on splicing. *J. Biol. Chem.* 268, 11222–11229.
- Rougier P (2004). «Cancers du côlon et du rectum : mieux les dépister et mieux les traiter». *Rev. Prat.* 54, 133–142.
- Rustgi, A.K. (2007). The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev.* 21, 2525–2538.
- Ryan, S., Jenkins, M.A., and Win, A.K. (2014). Risk of prostate cancer in Lynch syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 23, 437–449.
- Samadder, N.J., Jasperson, K., and Burt, R.W. (2015). Hereditary and common familial colorectal cancer: evidence for colorectal screening. *Dig. Dis. Sci.* 60, 734–747.
- Samadder, N.J., Smith, K.R., Hanson, H., Pimentel, R., Wong, J., Boucher, K., Akerley, W., Gilcrease, G., Ulrich, C.M., Burt, R.W., et al. (2016). Familial Risk in Patients With Carcinoma of Unknown Primary. *JAMA Oncol.* 2, 340–346.
- Sameer, A.S., Nissar, S., and Fatima, K. (2014). Mismatch repair pathway: molecules, functions, and role in colorectal carcinogenesis. *Eur. J. Cancer Prev. Off. J. Eur. Cancer Prev. Organ. ECP* 23, 246–257.

- Sancho, E., Batlle, E., and Clevers, H. (2004). Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *20*, 695–723.
- Santibanez Koref, M., Wilson, V., Cartwright, N., Cunnington, M.S., Mathers, J.C., Bishop, D.T., Curtis, A., Dunlop, M.G., and Burn, J. (2010). MLH1 Differential allelic expression in mutation carriers and controls. *Ann Hum Genet* *74*, 479–488.
- Scaltriti, M., and Baselga, J. (2006). The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *12*, 5268–5272.
- Schouten, J.P., McElgunn, C.J., Waaijer, R., Zwiijnenburg, D., Diepvens, F., and Pals, G. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* *30*, e57.
- Scoazec, J.-Y., and Sabourin, J.-C. (2010). [2010: The seventh edition of the TNM classification]. *Ann. Pathol.* *30*, 2–6.
- Sedivcová, M., Martínek, P., Stehlik, J., Grossmann, P., Kašpírková, J., and Vaneček, T. (2013). Sequencing - classical method. *Ceskoslovenská Patol.* *49*, 122–128.
- SEER, Stat Database.* (2010): *Incidence , 1969-2007 Counties : Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program* (www.seer.cancer.gov), National Cancer Institute, DCCPS, Surveillance Research Program, Cancer Statistics Branch.
- Senter, L., Clendenning, M., Sotamaa, K., Hampel, H., Green, J., Potter, J.D., Lindblom, A., Lagerstedt, K., Thibodeau, S.N., Lindor, N.M., et al. (2008). The Clinical Phenotype of Lynch Syndrome Due to Germ-Line PMS2 Mutations. *Gastroenterology* *135*, 419–428.e1.
- Shacter, E., and Weitzman, S.A. (2002). Chronic inflammation and cancer. *Oncol. Williston Park N* *16*, 217–226, 229–232.
- Sheng, J.Q., Fu, L., Sun, Z.Q., Huang, J.S., Han, M., Mu, H., Zhang, H., Zhang, Y.Z., Zhang, M.Z., Li, A.Q., et al. (2008). Mismatch repair gene mutations in Chinese HNPCC patients. *Cytogenet. Genome Res.* *122*, 22–27.
- Sheng, Z., Oka, S., Tsuchimoto, D., Abolhassani, N., Nomaru, H., Sakumi, K., Yamada, H., and Nakabeppu, Y. (2012). 8-Oxoguanine causes neurodegeneration during MUTYH-mediated DNA base excision repair. *J. Clin. Invest.* *122*, 4344–4361.
- Sijmons, R.H., Greenblatt, M.S., and Genuardi, M. (2013). Gene variants of unknown clinical significance in Lynch syndrome. An introduction for clinicians. *Fam. Cancer* *12*, 181–187.
- Silva, F.C.C. da, Valentin, M.D., Ferreira, F. de O., Carraro, D.M., and Rossi, B.M. (2009). Mismatch repair genes in Lynch syndrome: a review. *São Paulo Med. J. Rev. Paul. Med.* *127*, 46–51.
- Slováková, P., Majerová, L., Matáková, T., Skereňová, M., Kavcová, E., and Halašová, E. (2015). Mismatch repair gene polymorphisms and association with lung cancer development. *Adv Exp Med Biol* *833*, 15–22.
- Song, L., Yuan, F., and Zhang, Y. (2010). Does a helicase activity help mismatch repair in eukaryotes? *IUBMB Life* *62*, 548–553.
- Sparks, A.B., Morin, P.J., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1998). Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res.* *58*, 1130–1134.

- Spirio, L., Olschwang, S., Groden, J., Robertson, M., Samowitz, W., Joslyn, G., Gelbert, L., Thliveris, A., Carlson, M., and Otterud, B. (1993). Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis. *Cell* 75, 951–957.
- Srivastava, K., Srivastava, A., and Mittal, B. (2010). Polymorphisms in ERCC2, MSH2, and OGG1 DNA repair genes and gallbladder cancer risk in a population of Northern India. *Cancer* 116, 3160–3169.
- Stark, A.M., Doukas, A., Hugo, H.-H., Hedderich, J., Hattermann, K., Maximilian Mehdorn, H., and Held-Feindt, J. (2015). Expression of DNA mismatch repair proteins MLH1, MSH2, and MSH6 in recurrent glioblastoma. *Neurol. Res.* 37, 95–105.
- Stevens, R.G., Swede, H., Heinen, C.D., Jablonski, M., Grupka, M., Ross, B., Parente, M., Tirnauer, J.S., Giardina, C., Rajan, T.V., et al. (2007). Aberrant crypt foci in patients with a positive family history of sporadic colorectal cancer. *Cancer Lett.* 248, 262–268.
- Stone, E.A., and Sidow, A. (2005). Physicochemical constraint violation by missense substitutions mediates impairment of protein function and disease severity. *Genome Res.* 15, 978–986.
- Stoppa-Lyonnet, D., Frébourg, T., Bonaïti, C., Bonneau, D., Delpèch, M., and Lefranc, J.-P. (2009). Principales recommandations de prise en charge des patients porteurs d'une mutation d'un gène MMR dans le syndrome de Lynch.
- Takagi, Y., Koumura, H., Futamura, M., Aoki, S., Ymaguchi, K., Kida, H., Tanemura, H., Shimokawa, K., and Saji, S. (1998). Somatic alterations of the SMAD-2 gene in human colorectal cancers. *Br. J. Cancer* 78, 1152–1155.
- Takahashi, M., Shimodaira, H., Andreutti-Zaugg, C., Iggo, R., Kolodner, R.D., and Ishioka, C. (2007). Functional analysis of human MLH1 variants using yeast and in vitro mismatch repair assays. *Cancer Res* 67, 4595–4604.
- Takayama, T., Miyanishi, K., Hayashi, T., Sato, Y., and Niitsu, Y. (2006). Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. *J. Gastroenterol.* 41, 185–192.
- Talseth-Palmer, B.A., Bauer, D.C., Sjursen, W., Evans, T.J., McPhillips, M., Proietto, A., Otton, G., Spigelman, A.D., and Scott, R.J. (2016). Targeted next-generation sequencing of 22 mismatch repair genes identifies Lynch syndrome families. *Cancer Med.* 5, 929–941.
- Tariq, K., and Ghias, K. (2016). Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer Biol. Med.* 13, 120–135.
- Tenesa, A., and Dunlop, M.G. (2009). New insights into the aetiology of colorectal cancer from genome-wide association studies. *Nat. Rev. Genet.* 10, 353–358.
- Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E., and Karin, M. (2010). Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* 138, 2101–2114.e5.
- Thiagalingam, S., Laken, S., Willson, J.K., Markowitz, S.D., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Lengauer, C. (2001). Mechanisms underlying losses of heterozygosity in human colorectal cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 2698–2702.
- Thiel, A., and Ristimäki, A. (2013). Toward a Molecular Classification of Colorectal Cancer: The Role of BRAF. *Front. Oncol.* 3, 281.
- Thiel, A., Heinonen, M., Kantonen, J., Gylling, A., Lahtinen, L., Korhonen, M., Kytölä, S., Mecklin, J.-P., Orpana, A., Peltomäki, P., et al. (2013). BRAF mutation in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. *Virchows Arch.* 463, 613–621.

- Thompson, B.A., Spurdle, A.B., Plazzer, J.-P., Greenblatt, M.S., Akagi, K., Al-Mulla, F., Bapat, B., Bernstein, I., Capellá, G., den Dunnen, J.T., et al. (2014). Application of a 5-tiered scheme for standardized classification of 2,360 unique mismatch repair gene variants in the InSiGHT locus-specific database. *Nat. Genet.* *46*, 107–115.
- Tian, F., Tang, Z., Song, G., Pan, Y., He, B., Bao, Q., and Wang, S. (2012). Loss of imprinting of IGF2 correlates with hypomethylation of the H19 differentially methylated region in the tumor tissue of colorectal cancer patients. *Mol. Med. Rep.* *5*, 1536–1540.
- Tomita, N., Yamano, T., Matsubara, N., and Tamura, K. (2013). [A novel genetic disorder of Lynch syndrome - EPCAM gene deletion]. *Gan To Kagaku Ryoho* *40*, 143–147.
- Tomlinson, I.P.M., Houlston, R.S., Montgomery, G.W., Sieber, O.M., and Dunlop, M.G. (2012). Investigation of the effects of DNA repair gene polymorphisms on the risk of colorectal cancer. *Mutagenesis* *27*, 219–223.
- Torre, D. (1968). Multiple sebaceous tumors. *Arch. Dermatol.* *98*, 549–551.
- Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., and Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA. Cancer J. Clin.* *65*, 87–108.
- TORTORA, G.J., DERRICKSON, B. (2007). Le système digestif. In *Principes d’anatomie et de physiologie.*, De boeck : John Wiley et Son, Chap 24, pp. 969–1018.
- Tournier, I., Vezain, M., Martins, A., Charbonnier, F., Baert-Desurmont, S., Olschwang, S., Wang, Q., Buisine, M.P., Soret, J., Tazi, J., et al. (2008). A large fraction of unclassified variants of the mismatch repair genes MLH1 and MSH2 is associated with splicing defects. *Hum Mutat* *29*, 1412–1424.
- Toyota, M., Ahuja, N., Suzuki, H., Itoh, F., Ohe-Toyota, M., Imai, K., Baylin, S.B., and Issa, J.P. (1999). Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype. *Cancer Res.* *59*, 5438–5442.
- Trabert, B., Eldridge, R.C., Pfeiffer, R.M., Shiels, M.S., Kemp, T.J., Guillemette, C., Hartge, P., Sherman, M.E., Brinton, L.A., Black, A., et al. (2016). Pre-diagnostic circulating inflammation markers and endometrial cancer risk in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer (PLCO) Screening Trial. *Int. J. Cancer.*
- Tsai-Wu, J.J., Su, H.T., Wu, Y.L., Hsu, S.M., and Wu, C.H. (2000). Nuclear localization of the human mutY homologue hMYH. *J. Cell. Biochem.* *77*, 666–677.
- Tulupova, E., Kumar, R., Hanova, M., Slyskova, J., Pardini, B., Polakova, V., Naccarati, A., Vodickova, L., Novotny, J., Halamkova, J., et al. (2008). Do polymorphisms and haplotypes of mismatch repair genes modulate risk of sporadic colorectal cancer? *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* *648*, 40–45.
- Turcot, J., Despres, J.P., and St Pierre, F. (1959). Malignant tumors of the central nervous system associated with familial polyposis of the colon: report of two cases. *Dis. Colon Rectum* *2*, 465–468.
- Tutlewska, K., Lubinski, J., and Kurzawski, G. (2013). Germline deletions in the EPCAM gene as a cause of Lynch syndrome – literature review. *Hered. Cancer Clin. Pract.* *11*, 9.
- Umar, A., Risinger, J.I., Hawk, E.T., and Barrett, J.C. (2004). Testing guidelines for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer* *4*, 153–158.
- Umar, A., Boland, C.R., Terdiman, J.P., Syngal, S., de la Chapelle, A., Rüschoff, J., Fishel, R., Lindor, N.M., Burgart, L.J., Hamelin, R., et al. (2004). Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J. Natl. Cancer Inst.* *96*, 261–268.

- Valentin, M.D., Silva, F.C. da, Santos, E.M.M. dos, Lisboa, B.G., Oliveira, L.P. de, Ferreira, F. de O., Gomy, I., Nakagawa, W.T., Junior, S.A., Redal, M., et al. (2011). Characterization of germline mutations of MLH1 and MSH2 in unrelated south American suspected Lynch syndrome individuals. *Fam. Cancer* 10, 641–647.
- Varesco, L. (2004). Familial adenomatous polyposis: genetics and epidemiology. *Tech. Coloproctology* 8 *Suppl 2*, s305-308.
- Vasen, H.F. (2000). Clinical diagnosis and management of hereditary colorectal cancer syndromes. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 18, 81S–92S.
- Vasen, H.F., Mecklin, J.P., Khan, P.M., and Lynch, H.T. (1991). The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Colon Rectum* 34, 424–425.
- Vasen, H.F., Watson, P., Mecklin, J.P., and Lynch, H.T. (1999). New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 116, 1453–1456.
- Vasen, H.F.A., Möslein, G., Alonso, A., Bernstein, I., Bertario, L., Blanco, I., Burn, J., Capella, G., Engel, C., Frayling, I., et al. (2007). Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer). *J. Med. Genet.* 44, 353–362.
- Vasen, H.F.A., Möslein, G., Alonso, A., Aretz, S., Bernstein, I., Bertario, L., Blanco, I., Bulow, S., Burn, J., Capella, G., et al. (2010). Recommendations to improve identification of hereditary and familial colorectal cancer in Europe. *Fam. Cancer* 9, 109–115.
- Vasen, H.F.A., Ghorbanoghli, Z., Bourdeaut, F., Cabaret, O., Caron, O., Duval, A., Entz-Werle, N., Goldberg, Y., Ilencikova, D., Kratz, C.P., et al. (2014). Guidelines for surveillance of individuals with constitutional mismatch repair-deficiency proposed by the European Consortium “Care for CMMR-D” (C4CMMR-D). *J. Med. Genet.* 51, 283–293.
- Vasen, H.F.A., Velthuisen, M.E., Kleibeuker, J.H., Menko, F.H., Nagengast, F.M., Cats, A., van der Meulen-de Jong, A.E., Breuning, M.H., Roukema, A.J., van Leeuwen-Cornelisse, I., et al. (2016). Hereditary cancer registries improve the care of patients with a genetic predisposition to cancer: contributions from the Dutch Lynch syndrome registry. *Fam. Cancer*.
- Veigl, M.L., Kasturi, L., Olechnowicz, J., Ma, A.H., Lutterbaugh, J.D., Periyasamy, S., Li, G.M., Drummond, J., Modrich, P.L., Sedwick, W.D., et al. (1998). Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 8698–8702.
- Viel, A., Genuardi, M., Capozzi, E., Leonardi, F., Bellacosa, A., Paravatou-Petsotas, M., Pomponi, M.G., Fornasarig, M., Percesepe, A., Roncucci, L., et al. (1997). Characterization of MSH2 and MLH1 mutations in Italian families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Genes. Chromosomes Cancer* 18, 8–18.
- Viguier J, Bourlier P, Karsenti D, De Calan I, and Danquechin Dorval E (2003). «Cancer du côlon». *Encycl Méd Chir Gastro-entérologie* 9-068-A-10, 18.
- Vilar, E., and Gruber, S.B. (2010). Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 7, 153–162.
- Vindigni, S.M., and Kaz, A.M. (2015). Universal Screening of Colorectal Cancers for Lynch Syndrome: Challenges and Opportunities. *Dig. Dis. Sci.*

- Walon, C., Kartheuser, A., Michils, G., Smaers, M., Lannoy, N., Ngounou, P., Mertens, G., and Verellen-Dumoulin, C. (1997). Novel germline mutations in the APC gene and their phenotypic spectrum in familial adenomatous polyposis kindreds. *Hum. Genet.* *100*, 601–605.
- Walther, A., Houlston, R., and Tomlinson, I. (2008). Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. *Gut*.
- Walther, A., Johnstone, E., Swanton, C., Midgley, R., Tomlinson, I., and Kerr, D. (2009). Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 489–499.
- Wang, L., Cunningham, J.M., Winters, J.L., Guenther, J.C., French, A.J., Boardman, L.A., Burgart, L.J., McDonnell, S.K., Schaid, D.J., and Thibodeau, S.N. (2003). BRAF mutations in colon cancer are not likely attributable to defective DNA mismatch repair. *Cancer Res.* *63*, 5209–5212.
- Warden, G., Harnett, D., Green, J., Wish, T., Woods, M.O., Green, R., Dicks, E., Rahman, P., Zhai, G., and Parfrey, P. (2013). A population-based study of hereditary non-polyposis colorectal cancer: evidence of pathologic and genetic heterogeneity. *Clin Genet* *84*, 522–530.
- Warthin AS. (1913). Hereditary with reference to carcinoma. *Arch Intern Med* *12*, 546–555.
- Waterman, M.L. (2004). Lymphoid enhancer factor/T cell factor expression in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev.* *23*, 41–52.
- Watson, P., Vasen, H.F.A., Mecklin, J.-P., Bernstein, I., Aarnio, M., Järvinen, H.J., Myrhøj, T., Sunde, L., Wijnen, J.T., and Lynch, H.T. (2008). The risk of extra-colonic, extra-endometrial cancer in the Lynch syndrome. *Int. J. Cancer* *123*, 444–449.
- Went, P.T., Lugli, A., Meier, S., Bundi, M., Mirlacher, M., Sauter, G., and Dirnhofer, S. (2004). Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum. Pathol.* *35*, 122–128.
- Whiffin, N., Broderick, P., Lubbe, S.J., Pittman, A.M., Penegar, S., Chandler, I., and Houlston, R.S. (2011). MLH1-93G > A is a risk factor for MSI colorectal cancer. *Carcinogenesis* *32*, 1157–1161.
- Win, A.K., and Jenkins, M.A. (2013). Is the reported modifying effect of 8q23.3 and 11q23.1 on colorectal cancer risk for MLH1 mutation carriers valid? *Int. J. Cancer* *133*, 1762–1763.
- Win, A.K., Jenkins, M.A., Buchanan, D.D., Clendenning, M., Young, J.P., Giles, G.G., Goldblatt, J., Leggett, B.A., Hopper, J.L., Thibodeau, S.N., et al. (2011). Determining the frequency of de novo germline mutations in DNA mismatch repair genes. *J. Med. Genet.* *48*, 530–534.
- Win, A.K., Young, J.P., Lindor, N.M., Tucker, K.M., Ahnen, D.J., Young, G.P., Buchanan, D.D., Clendenning, M., Giles, G.G., Winship, I., et al. (2012). Colorectal and other cancer risks for carriers and noncarriers from families with a DNA mismatch repair gene mutation: a prospective cohort study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *30*, 958–964.
- Win, A.K., Lindor, N.M., and Jenkins, M.A. (2013). Risk of breast cancer in Lynch syndrome: a systematic review. *Breast Cancer Res. BCR* *15*, R27.
- Winawer, S., M. Classen, S. Winawer, M. Fried, P. Dite, and K.L. Goh (2007). *Recommandations pratiques: Dépistage du cancer colorectal.* World Gastroenterol. Organ. Dig. Cancer Alliance.
- Wong, J.J.L., Hawkins, N.J., and Ward, R.L. (2007). Colorectal cancer: a model for epigenetic tumorigenesis. *Gut* *56*, 140–148.

- Xiao, X.-Q., Gong, W.-D., Wang, S.-Z., Zhang, Z.-D., Rui, X.-P., Wu, G.-Z., and Ren, F. (2012). Polymorphisms of mismatch repair gene hMLH1 and hMSH2 and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Oncol Lett* 3, 591–598.
- Yamamoto, H., and Imai, K. (2015). Microsatellite instability: an update. *Arch. Toxicol.* 89, 899–921.
- Zahary, M.N., Kaur, G., Abu Hassan, M.R., Singh, H., Naik, V.R., and Ankathil, R. (2012). Germline mutation analysis of MLH1 and MSH2 in Malaysian Lynch syndrome patients. *World J Gastroenterol* 18, 814–820.
- Zamani, M., Hosseini, S.V., and Mokarram, P. (2016). The Correlation Between Single Nucleotide Polymorphism Patterns and Colorectal Cancer in the Iranian Population. *Ann. Colorectal Res.* *inpress*.
- Zhang, X., and Li, J. (2013). Era of universal testing of microsatellite instability in colorectal cancer. *World J. Gastrointest. Oncol.* 5, 12–19.
- 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.
- Zhi, Y., Yu, J., Liu, Y., Wei, Q., Yuan, F., Zhou, X., Song, B., Chen, Z., and Yang, J. (2012). Interaction between polymorphisms of DNA repair genes significantly modulated bladder cancer risk. *Int J Med Sci* 9, 498–505.

ANNEXES

Annexe I

Tableau A : Classification TNM des cancers colorectaux (AJCC 7ème édition 2010).

Tumeur primitive (T)
<p>TIS = Carcinome in situ. Tumeur intra-épithéliale ou envahissant la lamina propria sans extension à la sous-muqueuse</p> <p>T1 = Tumeur infiltrant la sous-muqueuse sans la dépasser</p> <p>T2 = Tumeur infiltrant la musculature sans la dépasser</p> <p>T3 = Tumeur envahissant toute la paroi sans la dépasser</p> <p>T4 = Tumeur dépassant la séreuse</p>
Envahissement ganglionnaire (N)
<p>N0 = Absence de métastase ganglionnaire régionale</p> <p>N1 = Métastase dans un à trois ganglions régionaux</p> <ul style="list-style-type: none"> - N1a = 1 ganglion envahi - N1b = 2 ou 3 ganglions envahis - N1c = présence d'embolies tumorales dans la sous-séreuse sans métastase ganglionnaire <p>N2 = Métastase dans 4 ganglions régionaux ou plus</p> <ul style="list-style-type: none"> - N2a = 4 à 6 ganglions envahis - N2b = 7 ganglions envahis ou plus <p>Nx = Statut ganglionnaire inconnu</p>
Métastases (M)
<p>M0 = Absence de métastase</p> <p>M1 = Présence de métastases à distance</p> <ul style="list-style-type: none"> - M1a = limité à un site ou organe - M1b = touchant plusieurs organes ou le péritoine <p>Mx = Statut métastatique inconnu</p>

Tableau B : Critères d'Amsterdam établis par l'International Collaborative Group (ICG-SL)

Critères d'Amsterdam I (classique) (Vasen et al., 1991).
<p>Une famille comportant au moins 3 parents atteints de CCR histologiquement (spectre étroit du SL) prouvé et présentant tous les critères suivants :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. L'un des parents atteints est apparenté au 1^{er} degré avec les deux autres. 2. Au moins deux générations successives sont atteintes 3. Au moins un des diagnostics de CCR est porté avant l'âge de 50 ans 4. Une polypose adénomateuse familiale doit être exclue.
Critères d'Amsterdam II (révisés) (Vasen et al., 1999)
<p>Une famille comportant au moins 3 parents atteints d'un cancer histologiquement prouvé appartenant au cancers associés aux CCR (spectre large du SL) : de l'estomac, des ovaires, de l'endomètre, de l'intestin grêle, de l'uretère ou des cavités rénales, du cerveau et de la peau. Selon les signes :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. L'un des parents atteints est apparenté au 1^{er} degré avec les deux autres. 2. Au moins deux générations successives sont atteintes. 3. Au moins un des CCR non polyposique, ou cancers associés doivent être détectés avant 50 ans. 4. Une polypose adénomateuse familiale doit être exclue pour les CCR.

Tableau C : Les critères de Bethesda impliquant dans le syndrome de Lynch.

Critères originaux de Bethesda <i>(Rodriguez-Bigas et al., 1997)</i>
<ol style="list-style-type: none">1. Individus avec des cancers dans leur famille qui répondent aux critères d'Amsterdam.2. Individus avec deux tumeurs en relation avec le SL, incluant les CCR synchrones, métachrones ou les cancers extra-coliques associés (ovaire, endomètre, gastrique, intestin grêle, rein, uretère..)3. Individus avec un CCR et un parent au 1^{er} degré avec un CCR et/ou un Cancer extra-colique associés au SL et/ou un adénome colorectal ; un des cancers diagnostiqué avant 50 ans et les adénomes avant 40 ans.4. Individus avec un CCR ou de l'endomètre diagnostiqué avant 50 ans5. Individus avec un CCR du côté droit avec une structure histopathologique indifférenciée diagnostiqué avant 50 ans6. Individus avec un CCR avec un type cellulaire en bague à chaton diagnostiqué avant 50 ans7. Individus avec un adénome diagnostiqué avant 40 ans.
Critères révisés de Bethesda <i>(Umar et al., 2004)</i>
<ol style="list-style-type: none">1. Cancer colorectal diagnostiqué avant l'âge de 50 ans.2. Présence des tumeurs colorectales synchrones, métachrones ou d'autres tumeurs associées au SL(<i>ovaire, endomètre, gastrique, intestin grêle, rein, uretère, cerveau, pancréas...</i>)3. CCR avec une histologie MSI-H (<i>présence de lymphocytes infiltrant la tumeur, réaction immunitaire identique à la maladie du Crohn, croissance médullaire</i>) diagnostiqué chez les patients de moins de 60 ans.4. CCR diagnostiqué chez un ou plusieurs parents au 1^{er} degré avec des tumeurs en relation avec le SL, avec un des cancers diagnostiqué avant 50 ans.5. CCR diagnostiqué chez deux parents, ou plus, du 1^{er} ou 2nd degré avec des tumeurs en relation avec un SL indifféremment de l'âge.

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

	INSTABILITE MICROSATELLITAIRE	IMMUNOHISTOCHEMIE
AVANTAGES	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Sensibilité : 97 à ~100 % (<i>Engel et al., 2006</i>) (<i>Goel et al., 2010</i>). ➤ Hautement reproductible 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Sensibilité : ~ 93 à 94 % (<i>Hampel et al., 2005</i>) (<i>Engel et al., 2006</i>). ➤ Disponible dans de nombreux centres et facilement réalisable techniquement ➤ Oriente vers le gène responsable, donc réduit le coût de l'analyse moléculaire des gènes MMR ➤ Fiable même quand faible pourcentage de cellules tumorales.
LIMITES	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Nécessité d'être équipé pour la réalisation d'analyse moléculaire ➤ Problèmes des tumeurs mucineuses non macrodissécables ➤ Difficulté d'identifier les défaillances du système MMR liées à des mutations du gène <i>MSH6</i> car l'instabilité est plus faible ➤ N'identifie pas le gène défectueux donc augmentation du coût de l'analyse moléculaire des gènes MMR ➤ Peu fiable quand faible pourcentage de cellules tumorales (<15-20%) ➤ Difficulté d'identifier les défaillances du système MMR dans certains tissus (endomètre, urothélium) car instabilité plus faible 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Problème de bruit de fond des tumeurs mucineuses et de fixation tissulaire ou autres problème techniques résultant en un marquage faible ou hétérogène ➤ Mutations ne modifiant pas l'épitope sont reconnues par l'anticorps ➤ Moins fiable sur des échantillons de petite taille ➤ Difficulté d'interprétation pour certaines tumeurs (endomètre, urothélium, système nerveux central) ➤ Variabilité d'interprétation entre observateurs.

Annexe II

Fiche de renseignements du patient

Année	N° de Dossier.....
Nom	Prénom:.....
Date et lieu de naissance	Age :.....
Etat civil.....	Nbre d'Enfants:.....
Adresse :.....	Tel.....
Origine ethnique:.....	Fonction :.....

Caractéristiques cliniques au diagnostic:

Diagnostic de la maladie :.....	
Age au moment du diagnostic:	Année de diagnostic.....
Diabète : oui <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/>	Dyslipidémies : oui <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/>
Maladies cardiovasculaires : oui <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/>	Type de maladie.....
Autres ATCD personnels.....	

Analyses biologiques

CA19:9.....	ACE.....	Autres
Examens cliniques:		
Endoscopie:		
Echo/ Scanner :.....		
Thérapie et traitements:		
Chirurgie seule		
Chirurgie + CT	CT seule :.....	
Chirurgie +CT+ RT:.....	RT seule :	
Durée du traitement.....		
Nbre de cures:.....		

Caractéristiques tumorales

A- Données macroscopique :	
- Localisation tumorale : rectum <input type="checkbox"/> colon sigmoïde <input type="checkbox"/> colon gauche <input type="checkbox"/>	
Colon transverse <input type="checkbox"/> colon droit <input type="checkbox"/>	
- Aspect : bourgeonnant <input type="checkbox"/> infiltrant <input type="checkbox"/> plan <input type="checkbox"/>	
- Polypes synchrones : Absents <input type="checkbox"/> présents <input type="checkbox"/>	
- Métastases synchrones : Absentes <input type="checkbox"/> présentes <input type="checkbox"/>	
Localisations :	
B- Données histologiques :	
- Type d'adénocarcinomes : bien <input type="checkbox"/> moyennement <input type="checkbox"/> peu différencié <input type="checkbox"/>	
- Envahissement en profondeur : Intramuqueux (Tis) <input type="checkbox"/>	
Limité à la sous muqueuse (T1) <input type="checkbox"/> Limité à la musculuse (T2) <input type="checkbox"/>	
Envahissement à la sous séreuse (T3) <input type="checkbox"/>	
Envahissement de séreuse ou à des organes de voisinage(T4) <input type="checkbox"/>	
- Stades pTNM :	

Antécédents tumoraux personnels:

- -
- -

Antécédents familiaux :

Type de cancer du Père :
Age de diagnostic.....

Type de C de la mère :.....
Age de diagnostic.....

Type de C du frère :.....
Age de diagnostic.....

Type de C de la sœur :.....
Age de diagnostic.....

Collatéraux:

Parent 1:.....
Lien de parenté:.....
Age de diagnostic.....
Type de cancer

Parent 2 :.....
Lien de parenté:.....
Age de diagnostic.....
Type de cancer.....

Arbre généalogique :

Nom de l'investigateur

Lieu d'investigation :.....
Date :.....

Fiche de consentement du patient

Centre hospitalier Universitaire de Constantine
Gastroentérologie /Centre Anti cancéreux
Laboratoire de Biologie et génétique moléculaire
Etude génétique du Cancer colorectal

Dans le cadre de :

Etude de prédisposition génétique aux cancers colorectaux

Je soussigné(e) :

Nom :

Prénom :

Date de naissance :

-Déclare avoir pris connaissance des informations explicatives concernant cette étude.
- J'accepte le prélèvement sous les conditions décrites en gardant tous mes droits stipulés par la loi algérienne

- J'accepte ce type de recherche :
- Je m'oppose à ce type de recherche :

-En cas de réponse affirmative, je souhaite que les résultats puissent m'être communiqués

OUI

NON

Signature du patient(e) :

Signature de Doctorant (investigateur)

En lieu et date :

Signature du Médecin

**Fiche de consentement du patient
Enfant mineur**

Centre hospitalier Universitaire de Constantine
Gastroentérologie /Centre Anti Cancéreux
Laboratoire de Biologie génétique moléculaire
Etude génétique du Cancer colorectal

Dans le cadre de :

Etude de prédisposition génétique aux cancers colorectaux

Nous soussignés : Nom :

Prénom :

Nom :

Prénom :

Agissant en qualité de parents de l'enfant mineur

Nom :

Prénom :

Date de naissance :

-Déclare avoir pris connaissance des informations explicatives concernant cette étude.
- J'accepte le prélèvement concernant mon enfant mineur sous les conditions décrites en gardant tous mes droits stipulés par la loi

- J'accepte ce type de recherche :.....
- Je m'oppose à ce type de recherche :.....

-En cas de réponse affirmative, je souhaite que les résultats puissent m'être communiqués

OUI

NON

Signature du patient(e) :

Signature de Doctorant (investigatrice)

En lieu et date :

Signature du Médecin :

Les étapes de l'extraction de l'ADN :

1- Préparation des leucocytes

- Dans un tube Falcon de 50 ml ; mettre le sang total (7-10 ml) et compléter à 45 ml avec du TE 20 :5. Laisser 10 min dans la glace.
- Centrifuger 15 min à 3900 g (3900 rpm).
- Déverser le surnageant prudemment afin de garder le culot leucocytaire précipité au fond de tube.
- Rajouter le TE 20:5 au culot jusqu'à 25-30 ml, agiter pour le remettre en suspension et laisser 10 min dans la glace.
- Centrifuger dans les mêmes conditions précédentes.
- Déverser le surnageant : obtention d'un culot de leucocytes. (Si on s'arrête à ce niveau, les mettre dans un tube nunc de 1.5 ml avec du TE 10 :1 et les conserver à -20°C dans un congélateur).

2- Extraction de l'ADN

- Décongeler les leucocytes.
- Centrifuger pendant 15 min à 3900 rpm.
- Dilacérer le culot de leucocytes soigneusement afin de les prendre complètement et les mettre dans un tube Falcon conique de 15 ml.
- Ajouter 3 ml de tampon de lyse (NaCl 400 mM, EDTA 2mM, Tris 10mM, PH 8.2)
- Ajouter 200 µL de SDS à 10% (100 g SDS + 1000 ml H₂O).
- Ajouter 100 µL de protéinase K à 10 mg / ml. Dans l'étuve, Agiter le tube sur une roue rotative à 37°C pendant une nuit. Le lendemain ; refroidir dans la glace.
- Ajouter 1 ml de NaCl 4 M et agiter rigoureusement à la main.
- Remettre 5 min dans la glace (précipitation des protéines).
- Centrifuger 15 min à 2500 rpm.
- Transvaser le surnageant dans un tube Falcon de 50 ml , ajouter 2 fois son volume d'éthanol absolu (100%) préalablement refroidi et agiter en tournant le tube plusieurs fois : **la formation de la méduse** visible à l'œil nu . (laisser éventuellement 30 min à -20°C si la pelote d'ADN ne se forme pas).
- Récupérer la pelote d'ADN par une pipette pasteur et la rincer 2 fois dans l'éthanol à 70% dans un tube nunc (ependorf) stérile.

3-Solubilisation de l'ADN :

- L'ADN est réhydraté en ajoutant entre 300 et 1000 µL de TE 10 :1 selon la grosseur de la pelote et la concentration souhaitée.
- Laisser une nuit sur agitateur rotateur à 37°C, puis à température ambiante jusqu'à dissolution complète (de 1 jusqu'à 3 jour).

Détermination de la pureté et la concentration de l'ADN :

-Détermination de la pureté :

- Principe :

- L'ADN absorbe à 260 nm alors que les protéines (témoins de contamination) absorbent à 280 nm.
- L'échantillon est dilué au 1/100 dans l'eau distillée (10 µl de l'ADN solubilisé dans 990 µL de l'eau stérile).
- Les DO sont lues à 260 et 280 nm (longueurs d'onde d'absorption des acides nucléiques et des protéines) dans le même type de cuve que celle ayant servi à faire le zéro (eau stérile).
- Par le moyen du rapport de DO 260 nm / DO 280nm, la pureté de l'ADN est déterminée en indiquant la contamination de l'ADN par les protéines ou par les ARN.

On considère que

- L'ADN est suffisamment pur lorsque le rapport $R = DO_{260} / DO_{280}$ est compris entre 1.6 et 2 ($1.6 < R \leq 2$).
- L'ADN est contaminé par les protéines si : $DO_{260} / DO_{280} < 1.6$.
- L'ADN est contaminé par les ARN si : $DO_{260} / DO_{280} > 2$.

-Détermination de la concentration de l'ADN :

-Principe

La densité optique à 260 nm permet de calculer la concentration de l'ADN sachant que :
1 unité de DO_{260} nm = 50 µg/ ml d'ADN double brin.

• Exemple :

Pour un ADN solubilisé dans 1000 µl de TE 10 :1 ayant une DO_{260} nm =0.139

1 unité de DO_{260} nm \longrightarrow 50 µg/ ml d'ADN

0.139 DO_{260} nm \longrightarrow X

$$X = 0.139 \times 50 = 6.95 \text{ µg/ ml}$$

Considérant que l'ADN est dilué à 1/100 , donc $6.95 \times 100 = 695 \text{ µg/ ml}$. **La concentration de l'ADN en µg /ml = facteur de dilution x DO_{260} x 50 µg / ml.**

Fiche de Suivi technique

PCR n° :
20 / /

polymérase utilisées :

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	C10	D11	D12
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12

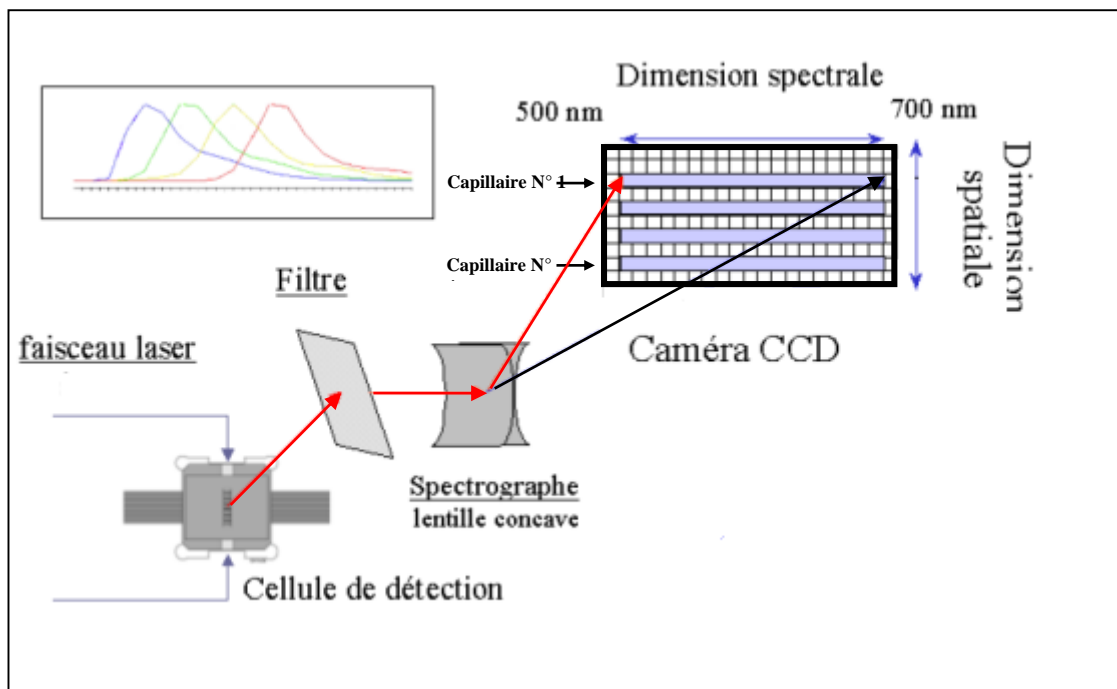


Figure A : Principe de l'électrophorèse capillaire

Il se repose sur une différence de potentiel (ddp), des polyanions d'ADN simple brin vont migrer du pôle négatif (cathode) vers le pôle positif (anode) du circuit électrique. Les données de fluorescences sont récupérées au niveau d'une cellule de détection et transmises vers la caméra CCD pour être analysées. Les fluorochromes excités vont ré-émettre une fluorescence spécifique perpendiculairement. Elle passe à travers un filtre qui va sélectionner uniquement la fluorescence provenant des capillaires. Une lentille concave appelée spectrographe va décomposer pour chacun des capillaires la fluorescence entre 500 et 700 nm et diriger chaque faisceau en direction de la caméra CCD.

Analyse informatique : Les étapes de l'analyse sont :

- 1) On obtient un électrophorégramme avec la signalisation des bases sur un code adapté.
- 2) On compare les séquences obtenues avec celles de référence à l'œil nu. Il est possible d'utiliser un logiciel (logiciel SEQUENCHER) qui consiste à assembler et aligner des séquences par rapport à la séquence de référence. On sauvegarde les corrections éventuelles effectuées.
- 3) Impression des graphes après corrections.
- 4) Lorsque les séquences sens et antisens de tous les exons sont validées, elles sont remises pour une « première lecture ». Des contrôles éventuels sont effectués sur une nouvelle PCR, ou à partir d'une nouvelle extraction en cas de suspicion de résultat pathologique. Une « seconde lecture » est obligatoire.
- 5) Les variations identifiées issues de la comparaison aux séquences de référence utilisées sont classées selon le type de chaque mutation entre polymorphismes, mutations pathogènes ou encore des variations de signification inconnue.

Déroulement de la manipulation de la MLPA

Il convient de noter que : Toute la manipulation est réalisée dans la glace avec utilisation du matériel jetable neuf et tous les produits sont décongelés en avance de leur utilisation.

Jour 1: Tous les ADNs (*3 témoins + 9 patients*) sont dilués à 50µg/ml (*cette concentration permet à la fin de réaliser les calculs statistiques*). Ils sont stockés à +4°C jusqu'à utilisation. En fin de journée (*30 min ~*) :

Dénaturation – Hybridation (toute la nuit) :

- Mettre 5 µl d'ADN dilué dans chaque puits de la plaque « année/ mois/ jour hybridation MLPA kit P xxx » suivant le plan de travail ;
- Sceller avec un film adhésif (*AB-0558 réf. SAP : 10121806*) ;
- Déposer la plaque dans un thermocycleur ;
- Mettre un couvercle silicone (*réf. : SAP 10017536*) et fermer le couvercle ;
- Démarrer le programme « MLPA hybrid ». (*étape 1 : dénaturation 5min à 98°C*).

Durant la dénaturation préparer le mix hybridation :

- Probemix (Sondes spécifique du Kit)..... 21 µl ;
- Le tampon de MLPA (MLPA buffer) 21 µl ;

Ensuite :

- Homogénéiser doucement (*pipette ou retournement*) ;
- Centrifuger brièvement ;
- A 25°C (*étape 2 : 5min 25°C*) ouvrir le couvercle du thermocycleur ;
- Retirer délicatement le film adhésif en laissant la plaque dans le thermocycleur ;
- Ajouter 3 µl du mix hybridation dans chaque puits, en mélangeant doucement par aspiration avec la pipette ;

L'hybridation est en route... (*étape 3 : 1min à 95°C*) ; (*étape 4 : hybridation 16h à 60°C*).

Jour 2 : fin de l'hybridation + ligation + PCR.

A la fin de l'hybridation, le thermocycleur passe à 54°C (*étape 5 : 15 min à 54°C + étape 6 : 15 min à 54°C*) : température de ligation.

Pendant l'étape 5, décongeler un tube bouchon transparent + un tube bouchon blanc.

PRÉPARER LE MIX LIGATION :

- Eau 350 µl ;
- Ligase 65 buffer A 42 µl ;
- Ligase 65 buffer B 42 µl ;
- SALSA Ligase- 65 14 µl ;

Ensuite :

- Homogénéiser doucement ;
- Centrifuger brièvement ;
- Ouvrir le couvercle Thermocycleur ;
- Retirer délicatement le film adhésif en laissant les tubes dans le thermocycleur ;
- Ajouter 32 µl du mix ligation dans chaque tube, en mélangeant doucement par aspiration avec la pipette ;

Ligation :

- (*étape 6 : ligation 15 min à 54°C*) ; (*étape 7 : désactivation de la ligase 5 min à 98°C*)
(*étape 8 : ∞ à 4°C*) ;

On peut stopper à cette étape. Conserver jusqu'à 5 jours à 4°.

PCR

Pour réaliser la réaction PCR, Préparer un mix tampon :

- Eau.....364 µl ;
- PCR buffer (Tampon de PCR)56 µl ;

Ensuite :

- Homogénéiser doucement ;
- Centrifuger brièvement ;

- Distribuer 30 µl du mix tampon dans la plaque «année mois jour PCR MLPA kit Pxxx » ;
- Avec la pipette multicanaux, distribuer 10µl du produit de ligation depuis la plaque « année mois jour hybridation MLPA kit P xxx » vers la plaque « année mois jour PCR MLPA kit P xxx » ;
- Mélanger par aspiration avec la pipette, en changeant de pointes entre chaque colonne ;
- Mettre un nouveau film adhésif, placer le couvercle silicone et laisser dans la glace ; Préparer le mix PCR :
- Eau 77 µl ;
- PCR enzyme dilution buffer 28 µl ;
- PCR primers Mix (CY 5.0) 28 µl ;
- SALSA Polymerase..... 7 µl ;

Ensuite :

- Homogénéiser doucement ;
- Centrifuger rapidement ;
- Mettre la plaque dans le thermocycleur ;
- Lancer le programme « MLPA PCR » ;
- A 60°C, ajouter 10 µl du mix polymérase dans chaque tube, en mélangeant doucement par aspiration avec la pipette ;
- Mettre un nouveau film adhésif, placer le couvercle silicone.

On peut stopper à cette étape. Conserver jusqu'à 5 jours à 4°.

Après amplification par PCR :

- Dépôt des produits d'amplification sur l'analyseur de fragments Ceq 8800 ;
- Préparation du plan de plaque sur Ceq :
- Préparation de la plaque :
- Diluer au 1/8^{ème} les produits PCR dans du SLS (Sample Loading Solution) , préparer une nouvelle plaque selon plan « année mois jour PCR MLPA kit xxx » :
- Par puits : SLS 35 µl ;
- produit d'amplification5 µl ;
- Homogénéiser doucement et centrifuger brièvement.

Préparer un mix marqueur de taille :

- Par puits SLS 9.5 µl ;
- Marqueur 600 0.5 µl ;

Ensuite :

- Hmogénéiser doucement et centrifuger brièvement ;

- Dans une plaque Beckman distribuer 10 µl du mix marqueur de taille ;
- Avec une multipipette déposer 20 µl des produits PCR au 1/8^{ème} ;
- Ajouter une goutte d'huile minérale ;
- Centrifuger brièvement à 1000 tours/min.

Déposer sur le séquenceur :

- Placer la ou les plaques de dépôts, le ou les bacs d'immersion, la ou les plaques de tampon et leurs couvercles antiévaporation ;
- préciser la position de la ou des plaques sélectionner la feuille de travail et le projet associé pour chacune des plaques

Analyse des fragments

- Imprimer tous les chromatogrammes de l'étude.

Annexe III

Gene *MSH2*

- c.942+ 3A>T (p.Val 265_Gln314del) :

Exon 5: sequence normale

atccagtggt atagaaatct tcgatttta aattccta ttagGTTGC
AGTTTCATCA CTGTCTGCGG TAATCAAGTT TTTAGAACTC TTATCAGATG
ATTCCAACCT TGGACAGTTT GAACTGACTA CTTTTGACTT CAGCCAGTAT
ATGAAATTGG ATATTGCAGC AGTCAGAGCC CTTAACCTTT TT CAGgtaaa

Mutation au début de l' intron 5 **gttaa**

CAG gtaaa

Chez l'individu F3.1 Une mutation au début de l'intron 5 du gène *MSH2* touchant le 3^{ème} nucléotide (a>t).

- Le variant c.2210+11_2210+22del12

EXON 13 + INTRON normal

GCCCCAATATGGGAGGTAAATCAACATATATTCGACAAACTGGGGTGATA
GTACTCATGGCCCAAATTGGGTGTTTTGTGCCATGTGAGTCAGCAGAAG
GTCCATTGTGGACTGCATCTTAGCCCCGAGTAGGGGCTGGTGACAGTCAAT
TGAAAGGAGTCTCCACGTTTCATGGCTGAAATGTTGGAACTGCTTCTATC
CTCAGgtaagtgcattgaagatagaaatgtatgtctct
gtcctgtgagaaggaaaagtatatttgcagattctcatgtaaaaacatct
gagaatgtttgccttagtttaaatagttgttttctgtggactttatatac

EXON 13 + INTRON mutant.

GCCCCAATATGGGAGGTAAATCAACATATATTCGACAAACTGGGGTGATA
GTACTCATGGCCCAAATTGGGTGTTTTGTGCCATGTGAGTCAGCAGAAG
GTCCATTGTGGACTGCATCTTAGCCCCGAGTAGGGGCTGGTGACAGTCAAT
TGAAAGGAGTCTCCACGTTTCATGGCTGAAATGTTGGAACTGCTTCTATC
CTCAGgtaagtgcattgaagatagaaatgtatgtctct
gtcctgtgagaaggaaaagtatatttgcagattctcatgtaaaaacatct
gagaatgtttgccttagtttaaatagttgttttctgtggactttatatac

Gène *MLH1*

- Le nouveau variant : c.881_884delTCAGinsCATTCT déletion

gtttagATCGTCTGGTAGAATCAACTTCCTTGAGAAAAGCCATAGAAACA ↑
GTGTATGCAGCCTATTTGCCCAAAAACACACACCCATTCTGTACCTCAG
gtaatgtagcacc aaactcctcaaccaagactcacaaggaacagatgttc
tatcaggctctcctctttgaaagagatgagcatgctaatagtacaatcag
agtgaatccatacaccactggcaaaaggatgttctgtcccttcttacag
gtttagATCGTCTGGTAGAATCAACTTCCTTGAGAAAAGCCATAGAAACA ↓ insertion
GTGTATGCAGCCTATTTGCCCAAAAACACACACCCATTCTGTACCCATTCT
gtaatgtagcacc aaactcctcaaccaagactcacaaggaacagatgttc
tatcaggctctcctctttgaaagagatgagcatgctaatagtacaatcag
agtgaatccatacaccactggcaaaaggatgttctgtcccttcttacag

Séquence de reference de la protéine MLH1

MSFVAGVIRRLDET VVNR IAAGEVIQR PANAIKEMIENCLDAKSTS IQVIVKEGGLKLIQ
IQDNGTGIRKEDLDIVCERFTTSK LQSFEDLASISTYGFRGEALASISHVAHVTTITTKTA
DGKCA YRASYS DGK LKAPPKPCAGNQGTQITVEDLFYNIATR KALKNPSE EYGKILEVV
GRYSVHNAGISFSVKKQGETVADVRTL P NASTVDNIRSIFGN AVSRELIEIGCEDKTLAF
KMNGYISNANYSVKKCIFLLFINHRLVESTSLRKA IETVY AAYLPKNTHPFLYLSLEISP
QNV DVNVHPTKHEVHFLHEESILERVQQHIESKLLGNSSRMYFTQTLLPGLAGPSGEMV
KSTTSLTSSSTSGSSDKVYAHQMVRTDSREQKLD A FLQPLSKPLSSQPQAI VTE DKTDIS
SGRARQQDEEMLELPAPAEVA AKNQSL EGDTTKGTSEMSEKRGPTSSNPRKRHREDS DVE
MVEDDSRKEMTA ACTPRRRIINLTSVLSLQEEINEQGHEVLR EMLHNHSFVGC VNPQWAL
AQHQTKLYLLNTTKLSEELFYQIL IYDFANFGVLR LSEPAPLFDLAMLALDSPE SGWTEE
DGPKEGLAEYIVEFLKKA EMLADYFSLEI DEEGNLI GLPLLI DNYVPPLEGLPIFILRL
ATEVNWDEEKECFESLSKECAMFY S IRKQYISEESTLSGQQSEVPGSIPNSWKWTV EHVIV
YKALRSHILPPKHFTEDGNILQLANLPDLYKVFERC .

Séquence de reference de la protéine MSH2

MAVQPKETLQLESAAEVGFVRRFFQGMPEKPTT TVRLFDRGDFYTAHGEDALLAAREVFKT
QGVIKYMG PAGA KNLQSVVLSK MNFESFVKDLLLV RQYRVEVYKNRAGNKASKENDWYLA
YKASPGNLSQFEDILFGNNDMSASIGVGVKMSAVD GQRQVGVGYVDSIQRKLGLCEFPD
NDQFSNLEALLIQIGPKECVLPGETAGDMGKLRQI IQRGGILITERKKADFSTKDIYQD
LNRLKGGKGEQMNSAVLPEMENQVAVSSLSAVIKFLELLSDDSNFGQFELTTFDFSQYM
KLDIAAVRALNLFQGSVEDTTGSQSLAALLNKCKTPQGQRLVNQWIKQPLMDKNRIEERL
NLVEAFVEDAE LRQTLQEDLLRRFPDLNRLAKKFQRQAANLQDCYRLYQGINQLPNVIQA
LEKHEGKHQKLLLA VFVTP L TDLRSDFS K FQEMIETTLDMDQVENHEFLVKPSFDPNLSE
LREIMNDLEKKMQSTLISAARDLGLDPGKQIKLDSSAQFGYYFRVTCKEEKVLRNKNFS
TVDIQKNGVFTNSKLTSLNEEYTKNKTEYEEA QDAIVKEIVNISSGYVEPMQTLNDVLA
QLDAVVSFAHVSNGAPVYVRPAILEKGGRIILKASRHACVEVQDEIAFIPNDVYFEKD
KQMFHIITGPNMGGKSTYIRQTVIVLMAQIGCFVPCESAEVSVDCILARVGAGDSQLK
GVSTFMAEMLETASILRSATKDSLIIIDELGRGTSTYDGFGLAWAISEYIATKIGAFCMF
ATHFHELTALANQIPTVNNLHV TALTTEETLTMLYQVKKGVC DQSFGIHVAELANFPKHV
IECAKQKALELEEFQYIGESQGYDIMEPAAKKCYLEREQGEKIQEFLSKVKQMPFTEMS
EENITIKLQKLAEVI AKNNSFVNEIISRIKVTT .

Séquence de reference de la protéine MSH6 :

MSRQSTLYSFFPKSPALSDANKASARASREGG RAAAAPGASPSPGGDAAWSEAGPGRPL
ARSASPPKAKNLNGGLRRSVAPAAPTSCDFSPGDLVWAKMEGYPWWPCLVYNHPFDGTFI
REKGSVRVHVQFFDDSPTRGWVSKRLLKPYTGSKSKEAQKGGHFYSAPPEILRAMQRAD
EALNKDKIKRLELAVCDEPSEPEEEEEEME VGTTYVTDKSEEDNEIESEEEVQPKTQGSRR
SSRQIKRRRVIDSESDIGGSDVEFKPDTKEEGSSDEISSGVGDSESEGLNSPVKVARKR
KRMVGTGNGSLKRKSSRKETPSATKQATSISSETKNTLRAFSAPQNSSEQAHVSGGGDDSS
RPTVWYHETLEWLKEEKRRDEHRRRPDHPDFDASTLYVPEDFLNSCTPGMRKWWQIKSQN
FDLVICYKVGKFFELYHMDALIGVSELGLVFMKGNWAHSGFPEIAFGRYSDSLVQKGYKV
ARVEQTETPEMMEARCRKMAHISKYDRVVRREICRIITKGTQTYSVLEGDPSENYSKYLL
SLKEKEEDSSGHTRAYGVCVFDTSLGKFFIGQFSDDRHC SRFRTLVAHYPPVQVLF EKGN
LSKETKTIKSSLSCSLQEGLIPGSQFWDASKTLR TLLEEEYFREKLSDGIGVMLPQVLK
GMTSESDSIGLTPGEKSELALSALGGCVFY LKCLIDQELLSMANFEEYIPLDSDTVSTT
RSGAIFTKAYQRMVLDAVTLNLEIFLNGTNGSTEGTLLERVDTCHTFPGKRLKQWLCA
PLCNHYAINDRLDAIEDLMVVPDKISEVVELLKKLPDLERLLSKIHNVGSPLKSNHPDS
RAIMYEETTYSKKIIDFLSALEGFKVMCKIIGIMEEVADGFKSKILKQVISLQTKNPEG
RFPDLTVELNRWDATFDHEKARKTGLITPKAGFDSYDQALADIRENEQS LLEYLEKQRN
RIGCRTIVYWGIGRNRYQLEIPENFTTRNLPEEYELKSTKKGCKRYWTKTIEKKLANLIN
AEERRDVS LKDCMRLLFYNFDKNYKDWQSAVECIAVLDVLLCLANYSRGGDGP MCRPVIL
LPEDTPPFLKLSRHLPCITKTFFGDDFI PNDILIGCEEEEQENGKAYCVLVTGPNMGGK
STLMRQAGLLAVMAQMGCVPAEVCRLTPIDRVFTRLGASDRIMSGESTFFVELSETASI
LMHATAHSLVLVDELGRGTATFDGTAIANAVVKELAEITKCRTLFSTHYHSLVEDYSQNV
AVRLGHMACMVENECE DPSQETITFLYKFIK GACPKSYGFNAARLANLP EEVIQKGRKA
REFEKMNSLRLRFREVCLASERSTVD AEAVHKLTLIKEL .

5024 P072.D10_10050310UX

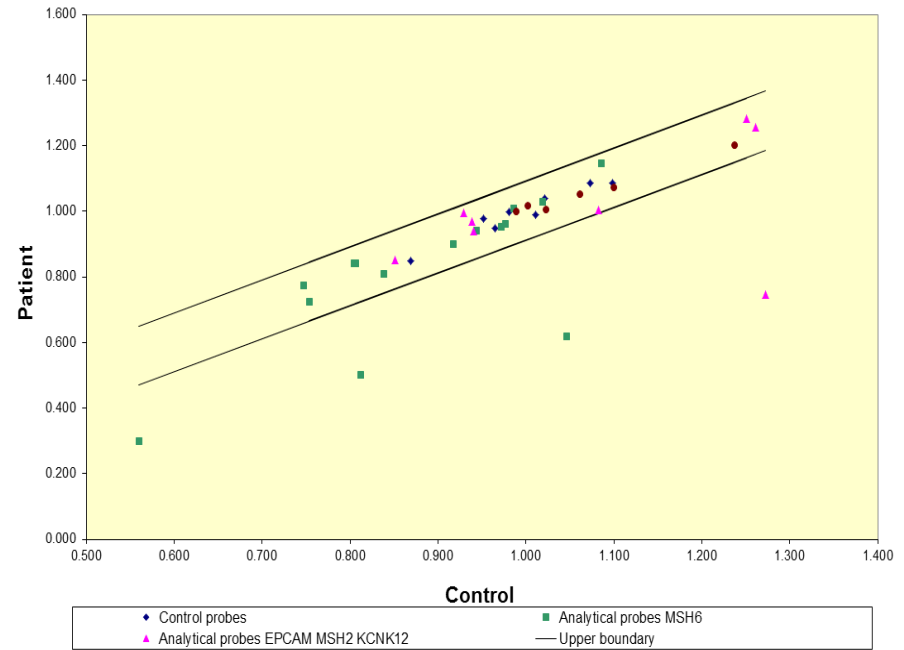
date : 29.04.2010

Confidence limit (CL) 0.500%

Standard error 2.94%

Probe	Dosage	P	Patient					Control						
			Size	Height	Est	Rel hght	Sqrt(Rel hght)	Size	Height	Est	Rel hght	Sqrt(Rel hght)		
Ctrl1	1.033	63.596%	128	16466	76368	76880	0.993	0.997	128	16448	22132.67	23007	0.962	0.981
EPCAM_3	1.068	32.071%	135	18336	69983	74403	0.941	0.970	135	18323	19658.67	22331	0.880	0.938
MSH6_7	1.088	26.824%	142	20031	51180	72307	0.708	0.841	142	20022	14155	21760	0.651	0.807
MLH1_1a	1.033	62.668%	149	22070	72516	69951	1.037	1.018	149	22066	21198	21119	1.004	1.002
Ctrl2	0.963	52.069%	154	23759	61145	68119	0.898	0.947	154	23761	19211	20620	0.932	0.965
MSH6_8	1.048	46.964%	160	25680	67318	66151	1.018	1.009	160	25684	19501	20085	0.971	0.985
MLH1_1b	1.026	70.720%	167	27932	64158	63984	1.003	1.001	167	27944	19048.67	19497	0.977	0.988
MSH6_9	1.097	22.474%	174	30193	43932	61944	0.709	0.842	174	30196	12249.67	18946	0.647	0.804
Ctrl3	0.978	64.689%	184	33698	69703	59013	1.181	1.087	184	33716	21917.67	18151	1.208	1.099
EPCAM_8	0.996	91.246%	190	36130	50383	57126	0.882	0.939	190	36149	15618	17641	0.885	0.941
MSH6_10	1.020	78.315%	196	38436	58674	55436	1.058	1.029	196	38466	17837.33	17183	1.038	1.019
MSH2_up	0.998	93.780%	203	41144	38745	53560	0.723	0.851	203	41183	12091	16677	0.725	0.851
MSH6_1a	0.350	0.000%	209	43744	19874	51862	0.383	0.619	209	43755	17759.33	16225	1.095	1.046
MSH6_3	0.923	30.777%	223	49631	25337	48341	0.524	0.724	223	49693	8670.333	15271	0.568	0.753
Ctrl4	1.053	44.147%	229	52528	44625	46755	0.954	0.977	229	52603	13458.67	14845	0.907	0.952
MSH6_5a	0.932	31.797%	238	56877	29160	44533	0.655	0.809	239	56943	10008.33	14252	0.702	0.838
MSH6_4a	0.964	52.268%	248	61296	38644	42452	0.910	0.954	248	61357	12936	13698	0.944	0.972
Ctrl5	0.957	43.537%	256	65597	39727	40578	0.979	0.989	256	65645	13503.33	13200	1.023	1.011
MSH6_2a	0.966	56.659%	266	70793	31244	38495	0.812	0.901	266	70845	10627	12647	0.840	0.917
MSH6_5b	0.970	58.822%	275	75482	34017	36767	0.925	0.962	275	75502	11628.67	12192	0.954	0.977
Ctrl6	1.031	63.693%	282	79552	38073	35374	1.076	1.037	282	79513	12345	11830	1.044	1.022
MUTYH_16	0.967	53.201%	292	85416	33896	33525	1.011	1.006	292	85369	11864.67	11343	1.046	1.023
MSH6_1b	0.288	0.000%	302	91210	2878	31864	0.090	0.301	302	91136	3416	10909	0.313	0.560
EPCAM_9a	0.862	1.284%	312	97144	30625	30319	1.010	1.005	312	97063	12303.67	10506	1.171	1.082
MLH1_1c	0.945	23.684%	320	102419	42055	29067	1.447	1.203	320	102323	15582	10181	1.530	1.237
MSH6_1c	0.384	0.000%	330	108742	7020	27703	0.253	0.503	330	108603	6481.667	9831	0.659	0.812
KCNK12_2	0.344	0.000%	339	114623	14809	26557	0.558	0.747	338	114481	15448	9537	1.620	1.273
MSH6_2b	1.116	5.468%	346	119640	33785	25667	1.316	1.147	346	119479	10976.67	9310	1.179	1.086
MSH2_1	1.147	3.767%	354	125394	24498	24739	0.990	0.995	354	125165	7834.333	9078	0.863	0.929
MSH6_4b	1.073	39.566%	365	133378	14138	23601	0.599	0.774	365	133179	4908.667	8791	0.558	0.747
Ctrl7	0.953	46.682%	375	140385	16367	22736	0.720	0.848	374	140031	6480.333	8582	0.755	0.869
MSH6_6	0.999	94.674%	385	148317	19448	21895	0.888	0.942	385	148179	7444.667	8373	0.889	0.943
MUTYH_2	0.987	77.608%	404	162925	22974	20694	1.110	1.054	403	162764	9103.667	8094	1.125	1.061
EPCAM_down	0.992	81.810%	413	170866	31910	20212	1.579	1.256	413	170682	12713.67	7990	1.591	1.261
MUTYH_3	0.953	35.988%	421	177132	22927	19910	1.152	1.073	421	177000	9578.333	7928	1.208	1.099
EPCAM_9b	1.048	36.774%	430	184866	32194	19626	1.640	1.281	430	184717	12333	7878	1.566	1.251
Ctrl8	1.023	73.007%	438	191730	22900	19452	1.177	1.085	438	191590	9040	7854	1.151	1.073

Plot of sqrted relative heights



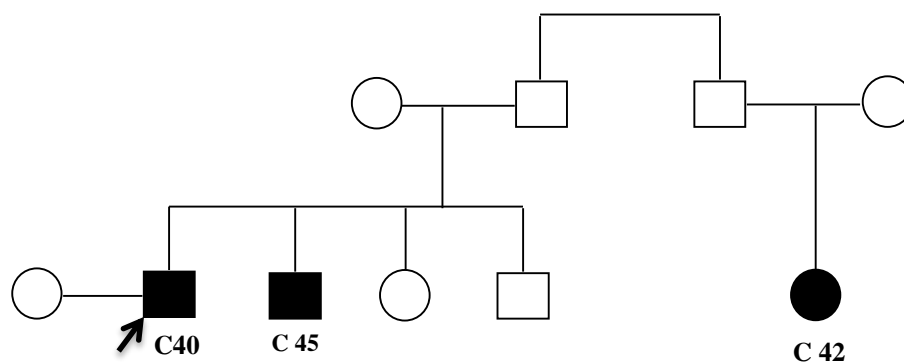
Key	
0.9-1.1	<CL
<0.65	Analytical probes (MSH6)
>1.35	Control probes
	Analytical probes (MSH2 + EPCAM + KCNK12)
	Analytical probes (MLH1 + MUTYH)

Figure B : Feuille de calcul Excel utilisée par le logiciel associé pour obtenir les profils MLPA d'un sujet sain témoin et de la patiente F2 avec la délétion c.1 -?_260 + del.

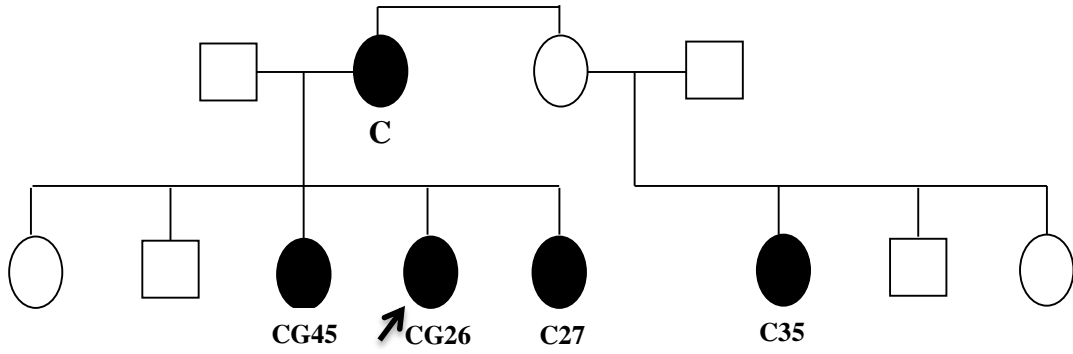
Tableau E : Récapitulatif de l'aspect mutationnel des gènes étudiés dans les familles (AMS et BETH) ayant des antécédents de tumeurs.

Cas index d'une famille (AMS ou BETH)	Nombre d'apparentés atteints	Nombre d'apparentés (sains + atteints) analysés	La mutation familiale (gène)	Nombre d'apparentés porteurs de la mutation familiale
F3.1 (AMS)	13 (Fig.42)	7 (tab.11)	c.942+3A>T c.2210+11_2210+22del12 (<i>MSH2</i>)	5 (tab.14)
F5 (BETH)	2	0	/	0
F7 (BETH)	1	0	/	0
F9 (BETH)	2	0	c.1020C>G (<i>MLH1</i>)	0
F10.1(AMS)	8 (Fig.54)	6 (Fig.54)	c.881_884delTCAGinsCAT TCCT (<i>MLH1</i>)	3 (Fig.54)
F13 (BETH)	1	0	/	0
F16 (BETH)	1	0	/	0
F17.1 (BETH)	3	4	/	0
F18 (BETH)	2	0	/	0
F20 (BETH)	2	0	/	0
F23 (AMS)	4	0	/	0
F25 (BETH)	1	0	/	0
F26 (BETH)	3	2	/	0
F27 (AMS)	3(Fig.46)	0	c.1030C>T c.728G>A (<i>MSH2</i>)	0
F28(BETH)	2	0	/	0

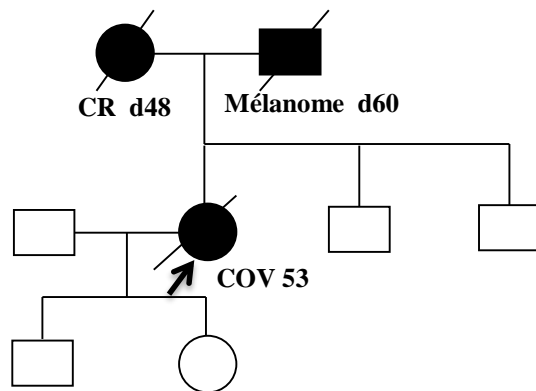
Dans la **figure C**, sont représentés les arbres généalogiques de certaines familles incluses dans notre étude et répondant aux critères (AMS et BETH) avec des antécédents familiaux :



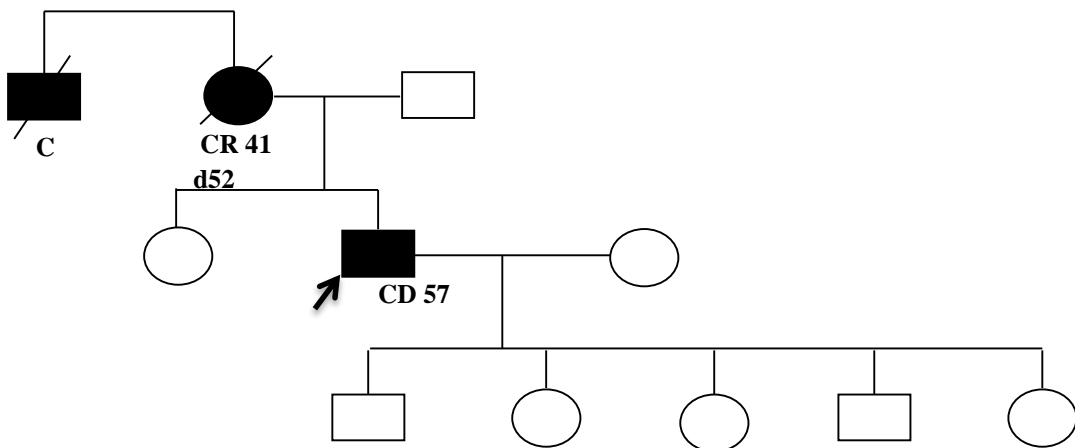
Arbre généalogique de la famille F5.



Arbre généalogique de la famille F23



Arbre généalogique de la famille F18.



Arbre généalogique de la famille F28.

Figure C : Arbres généalogiques des patients SL étudiés.

L'âge au moment de diagnostic est désigné par un chiffre, l'âge de décès par un chiffre précédé de la lettre « d ». Les types de cancer(s) sont désignés par les symboles suivants : **C** cancer du colon, **CG** cancer du colon gauche, **CD** cancer du colon droit, **COV** cancer de l'ovaire et **U** cancer de l'utérus.

Résumé

Le cancer colorectal (CCR) constitue actuellement un problème majeur de santé publique en Algérie. Parmi les formes héréditaires de ce cancer, le syndrome de Lynch (SL) ou Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (HNPCC) qui est une maladie autosomique dominante caractérisée par l'apparition précoce du CCR. Ce syndrome est lié aux mutations germinales dans les gènes de réparation des mésappariements (MMR) de l'ADN.

Le travail que nous avons accompli a été consacré à l'étude de la corrélation moléculaire entre le CCR et les mutations se produisant dans les gènes de réparation *MLH1*, *MSH2* et *MSH6* chez 27 familles algériennes non apparentées.

La recherche de mutations germinales a été effectuée par séquençage de tous les exons et les parties introniques adjacentes de ces gènes. La technique Multiplex Ligation dependent Probe Amplification (MLPA) a été utilisée pour détecter les grands réarrangements génomiques (délétions/duplications), lorsque nous constatons une absence de mutations ponctuelles.

Des mutations pathogènes ont été identifiées dans 15% des familles avec suspicion clinique de SL. Deux nouveaux variants, décrits pour la première fois dans les familles algériennes, ont été identifiés dans *MLH1*, c.881_884delTCAGinsCATTCCT et une grande délétion dans le gène *MSH6*. Les variants du gène *MSH2*: c.942+3A>T et c.1030C>T les plus fréquemment décrits étaient également détectés dans nos familles. En outre, les SL causés par les mutations du *MSH6* peuvent survenir à un âge précoce comparable à celui des patients ayant subi une mutation en *MLH1* ou *MSH2*.

Suite à nos résultats, nous avons confirmé que *MSH2*, *MLH1* et *MSH6* contribuent à la susceptibilité au CCR dans nos familles, notre travail nous a permis la mise en œuvre d'un algorithme de diagnostic pour l'identification des patients atteints de SL et leurs apparentés dans les familles algériennes, pouvant aider à la prise en charge de ces patients et la surveillance médicales de leurs apparentés à risque.

Mots-clés : familles algériennes- HNPCC - syndrome de Lynch- *MLH1*- *MSH2*- gènes MMR.

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is currently a major public health problem in Algeria. Among the hereditary forms of this cancer, Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (HNPCC) is an autosomal dominant disorder characterized by the early onset of CRC. This syndrome is linked to germline defects in Mismatch Repair (MMR) genes. The work we have done has been devoted to studying the molecular correlation between CRC and mutations occurring in the *MLH1*, *MSH2* and *MSH6* repair genes in 27 unrelated Algerian families.

The search for germline mutations was tested by sequencing all exons and adjacent intronic sequences. Multiplex ligand-dependent probe amplification (MLPA) technique was used for testing large genomic rearrangements (deletion / duplication), when we observed no point mutations.

Pathogenic mutations were identified in 15 % of families with clinical suspicion on HNPCC. Two novel variants described for the first time in Algerian families were identified in *MLH1*, c.881_884delTCAGinsCATTCCT and a large deletion in *MSH6* gene from a young onset of CRC. Moreover, the variants of *MSH2* gene: c.942+3A>T et c.1030C>T, the most described ones, were also detected in our families. Furthermore, the families HNPCC caused by *MSH6* germline mutation may show an age of onset that is comparable to this of patients with *MLH1* and *MSH2* mutations.

According to our results, we confirmed that *MSH2*, *MLH1*, and *MSH6* contribute to CRC susceptibility. This work represents the implementation of a diagnostic algorithm for the identification of Lynch syndrome patients in Algerian families, which can assist in the management of these patients and the medical supervision of their relatives at risk.

Keywords: Algerian families-Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer- Lynch syndrome - *MLH1* and MMR genes.

ملخص

يمثل سرطان القولون والمستقيم (CCR) حالياً مشكلاً رئيسياً للصحة العمومية في الجزائر. من ضمن الأشكال الوراثية لهذا السرطان تعتبر متلازمة لينش (SL) أو السرطان القولوني المستقيمي الوراثي بدون زوائد (HNPCC) اضطراباً وراثياً ذو صفة جسمية سائدة يتميز ببداية مبكرة لسرطان القولون والمستقيم، حيث يرتبط هذا السرطان الوراثي بالعيوب الوراثية في المورثات الجينية المسؤولة على إصلاح عدم التطابق (MMR) للحمض النووي (ADN). لقد كررنا العمل المنجز، لدراسة العلاقة الجزيئية بين CCR والطفرات التي تحدث في هذه المورثات الجينية والتي تمت على سبعة وعشرين عائلة جزائرية ليست على علاقات قرابية.

حيث تم بحث الطفرات في المورثات الجينية *MLH1*، *MSH2* و *MSH6* بواسطة تقنية التسلسل (séquençage) لكل الوحدات الدالة exons وسلاسل الوحدات غير الدالة intron المجاورة. كما تم الاعتماد على تقنية MLPA لاختبار إعادة ترتيب التغيرات الكبيرة (حذف/تضعيف) في حالة عدم وجود طفرات صغيرة نقطية.

من خلال دراستنا، تم تحديد الطفرات الموروثة المسببة للأمراض في 15% من الأسر التي لديها اشتباه سريري على HNPCC. تم التعرف على اثنين من الطفرات الجديدة لأول مرة في الأسر الجزائرية في مورثة الجين *MLH1*، *ins CATTCT c.881_884delTCAG* وحذف كبير في مورثة الجين *MSH6* لدى حالة ذات سن مبكرة. كما تم الكشف عن متغيرين من مورثة الجين *MSH2* : *c.942+3A>T* و *c.1030C>T* ، الأكثرها وصفاً، أيضاً في الأسر الجزائرية. إضافة إلى ذلك، فإن العائلات المصابة ب HNPCC التي سببها الطفرات لمورثة الجين *MSH6* قد تظهر في عمر مبكر مماثل للمرضى الذين يعانون من طفرات *MLH1* و *MSH2*.

على إثر نتائج دراستنا أكدنا أن المورثات الجينية *MSH2*، *MLH1*، و *MSH6* تساهم في قابلية الإصابة بسرطان القولون والمستقيم الوراثي. ويمثل هذا العمل تنفيذاً لإستراتيجية التشخيص من أجل تحديد المرضى الذين يعانون من متلازمة لينش في الأسر الجزائرية، ممماً يساعد على التكفل بهؤلاء المصابين والعناية الطبية بذويهم المحتمل إصابتهم.

كلمات البحث : العائلات الجزائرية -السرطان القولوني المستقيمي الوراثي بدون زوائد -متلازمة لينش- *MLH1* و *MMR*.

Etude des gènes de prédisposition aux cancers colorectaux : Syndrome de Lynch

Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Science

Le cancer colorectal (CCR) constitue actuellement un problème majeur de santé publique en Algérie. Parmi les formes héréditaires de ce cancer, le syndrome de Lynch (SL) ou Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (HNPCC) qui est une maladie autosomique dominante caractérisée par l'apparition précoce du CCR. Ce syndrome est lié aux mutations germinales dans les gènes de réparation des mésappariements (MMR) de l'ADN.

Le travail que nous avons accompli a été consacré à l'étude de la corrélation moléculaire entre le CCR et les mutations se produisant dans les gènes de réparation *MLH1*, *MSH2* et *MSH6* chez 27 familles algériennes non apparentées.

La recherche de mutations germinales a été effectuée par séquençage de tous les exons et les parties introniques adjacentes de ces gènes. La technique Multiplex Ligation dependent Probe Amplification (MLPA) a été utilisée pour détecter les grands réarrangements génomiques (délétions/duplications), lorsque nous constatons une absence de mutations ponctuelles.

Des mutations pathogènes ont été identifiées dans 15% des familles avec suspicion clinique de SL. Deux nouveaux variants, décrits pour la première fois dans les familles algériennes, ont été identifiés dans *MLH1*, c.881_884delTCAGinsCATTCCT et une grande délétion dans le gène *MSH6*. Les variants du gène *MSH2*: c.942+3A>T et c.1030C>T les plus fréquemment décrits étaient également détectés dans nos familles. En outre, les SL causés par les mutations du *MSH6* peuvent survenir à un âge précoce comparable à celui des patients ayant subi une mutation en *MLH1* ou *MSH2*.

Suite à nos résultats, nous avons confirmé que *MSH2*, *MLH1* et *MSH6* contribuent à la susceptibilité au CCR dans nos familles, notre travail nous a permis la mise en œuvre d'un algorithme de diagnostic pour l'identification des patients atteints de SL et leurs apparentés dans les familles algériennes, pouvant aider à la prise en charge de ces patients et la surveillance médicales de leurs apparentés à risque.

Mots-clés : Familles algériennes- HNPCC - Syndrome de Lynch- *MLH1*- *MSH2*- gènes MMR.

Laboratoire de recherche : Biologie et génétique moléculaire.

Date de soutenance
15/03/2017