

Caractérisation moléculaire des mutations germinales et somatiques associées au cancer colorectal héréditaire sans polyposes en Tunisie.

Molecular characterization of lynch syndrome in Tunisia.

Sana Aissi, Farid Zérimech, Amel Moussa, Nadia Kourda, Amel Mezlini, Nabil Abdelli, Taoufik Najjar, Farhat Ben Ayed, Sarah Ben Jilani, Mohamed Manai, Marie-Pierre Buisine.

Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Faculté des Sciences de Tunis.

RÉSUMÉ

Prérequis : Bien que le cancer colorectal (CCR) soit relativement peu fréquent en Tunisie, la proportion de cancers colorectaux développés à un âge précoce est particulièrement élevée, suggérant une susceptibilité génétique. Néanmoins, jusqu'à présent, aucune étude génétique n'a été réalisée dans la population tunisienne.

But : Etudier les caractéristiques cliniques et génétiques du cancer colorectal héréditaire sans polyposes (HNPCC) en Tunisie et tenter d'identifier de nouveaux marqueurs d'aide au diagnostic de susceptibilité au cancer colorectal.

Méthodes : 31 familles tunisiennes suspectées de HNPCC ont été analysées à la recherche de mutations germinales au niveau des gènes MMR. Nous avons aussi étudié le phénotype et les caractéristiques génétiques des tumeurs de 51 patients sélectionnés selon les critères de Bethesda.

Résultats : 10 mutations germinales, dont 8 mutations nouvelles, ont été identifiées au niveau des gènes MMR dans 11 familles (35,5%) : 5 dans MSH2 et 5 dans MLH1, dont un réarrangement de grande taille. De plus, la mucine sécrétée MUC5AC était plus fréquemment exprimée dans les tumeurs des patients présentant une histoire familiale de cancer colorectal ($p=0,039$).

Conclusion : L'identification des patients présentant avec un risque élevé de développer un CRC reste problématique néanmoins l'étude de l'expression de MUC5AC pourrait avoir un intérêt pour l'aide au dépistage des patients Tunisiens à haut risque de développer un cancer colorectal.

Mots-clés

HNPCC, MMR, MLH1, MSH2, MSI, MLPA, MUC5AC

SUMMARY

Background: High rates of early colorectal cancers (CRC) are observed in Tunisia suggesting genetic susceptibility. Nevertheless, up to now no molecular studies have been performed in the Tunisian population.

Aim: To evaluate the clinical and genetic characteristics of Tunisian families suspected of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) and to identify new tumoral markers for CRC susceptibility leading to distinguish patients with sporadic CRC from those with familial CRC, like HNPCC.

Methods: 31 unrelated families suspected of HNPCC were screened for germline mutations in MMR genes. We have also analyzed tumoral phenotype and the genetic characteristics of tumors from 51 patients with CRC meeting the Bethesda criteria.

Results: 10 different germ line mutations, 8 of which were novel, were identified in 11 out of the 31 families (35.5%), 5 in MSH2 and 5 in MLH1. Our results showed that MUC5AC expression was more frequent in patients with family history of CRC ($p=0.039$).

Conclusion: The analysis of MUC5AC expression might be very beneficial in the detection of Tunisian patients with high susceptibility to CRC.

Key-words

HNPCC, MMR, MLH1, MSH2, MSI, MLPA, MUC5AC.

Si la plupart des cancers colorectaux (CRC) surviennent de façon sporadique, au moins 10% ont une composante héréditaire [1]. Le syndrome HNPCC ou syndrome de Lynch (OMIM #120435, 120436) constitue la forme la plus commune de cancer colorectal héréditaire avec une fréquence évaluée à 1/200-1/1000 individus. Il s'agit d'une pathologie à transmission autosomique dominante qui se caractérise par la survenue précoce de CRCs, mais aussi de cancers touchant d'autres sites incluant l'endomètre, l'estomac, les ovaires, l'intestin grêle, le tractus hépato-biliaire, l'urothélium, le cerveau, la peau. Il est défini cliniquement par les critères d'Amsterdam : au moins 3 apparentés avec CRC ou cancer de l'endomètre, de l'intestin grêle, des voies urinaires excrétrices supérieures, dont l'un est apparenté au premier degré par rapport aux deux autres, sur au moins deux générations successives, et l'un des cancers ayant été diagnostiqué avant l'âge de 50 ans [2]. Le syndrome HNPCC est dû à des mutations dans les gènes de réparation des mésappariements de l'ADN (ou gènes MMR, MisMatch Repair). Le diagnostic moléculaire est compliqué par l'hétérogénéité génétique du syndrome impliquant plusieurs gènes homologues aux gènes MutS et MutL : MSH2, MSH6, MLH1 et PMS2. Des mutations de MSH2 et MLH1 sont retrouvées chez environ 50% des familles répondant aux critères d'Amsterdam. Les mutations de MSH6 et de PMS2 sont beaucoup plus rares (< 5%). Les mutations faux-sens sont relativement fréquentes (environ 30% pour MLH1, 25% pour MSH2, 10% pour MSH6), posant le délicat problème de leur interprétation quant à leur caractère délétère. Par ailleurs, des réarrangements (délétions et duplications de grande taille) ont été décrits pour les gènes MLH1 et MSH2, et plus récemment MSH6, posant le problème de leur détection. Une mutation d'un gène MMR se traduit dans la tumeur par une perte d'expression de la protéine correspondante et un phénotype MSI-H (High MicroSatellite Instability) ou RER (Replication Error) positif traduisant le défaut de réparation de l'ADN. Ce phénotype MSI-H est mis en évidence dans plus de 92 % des tumeurs associées à un syndrome HNPCC versus 12-15 % des tumeurs CRC sporadiques ; il constitue de ce fait un test particulièrement intéressant pour dépister les patients HNPCC ne répondant pas aux critères d'Amsterdam. Se pose cependant le problème de distinguer parmi les tumeurs MSI-H celles qui sont liées à un syndrome HNPCC et à un défaut constitutionnel du système MMR, de celles survenues de façon sporadique (généralement associées à une hyperméthylation du promoteur du gène MLH1). Par ailleurs, il semble que dans certaines familles répondant aux critères d'Amsterdam, la survenue de tumeurs CRC ne soit pas liée à un défaut de réparation de l'ADN (absence de détection de mutation dans les gènes MMR et tumeurs non MSI-H) [3]. Au cours de notre travail, nous avons essayé de caractériser les mutations germinales et somatiques dans des familles Tunisiennes HNPCC ou « HNPCC-like », présentant une susceptibilité particulière à développer des CRCs. Nos résultats visent à améliorer le diagnostic de ce syndrome, ainsi que la prise en charge des patients et de leurs familles.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Dans cet ordre d'idée, nous avons pu collecter, depuis 4 ans, en étroite collaboration avec les Chirurgiens digestifs à l'Institut Salah AZAIEZ, l'Hôpital C. Nicolle de Tunis et l'Hôpital militaire de Tunis les

prélèvements de sang de 31 patients non apparentés (19 hommes et 12 femmes) ayant développé un cancer du spectre HNPCC avant l'âge de 50 ans ou dont l'histoire familiale vérifie les critères d'Amsterdam. Nous avons pu, également, collecter des services d'anatomopathologie de l'Hôpital C. Nicolle de Tunis et de l'Institut Salah AZAIEZ de Tunis les échantillons de tumeur et de muqueuse saine de ces 31 patients, ainsi que ceux relatifs à 51 autres patients ayant développé un CRC dans le but de rechercher des marqueurs tumoraux permettant de distinguer les sujets porteurs d'un CRC sporadique des sujets HNPCC.

Caractérisation des mutations germinales des patients HNPCC. L'ADN génomique extrait à partir du sang périphérique de chaque patient a permis d'analyser les gènes MLH1 (19 exons), MSH2 (16 exons) et MSH6 (10 exons). L'analyse a consisté à rechercher des mutations ponctuelles dans les séquences codantes et les jonctions introns- exons de ces gènes par PCR et séquençage sur ABI PRISM model 3100, ainsi que des réarrangements de grande taille par la technique MLPA (Multiplex Ligation Probe Dependant Analysis) (<http://www.mrc-holland.com/>). La séquence des amorces, les températures d'hybridation et les conditions des réactions PCR peuvent être fournies à la demande.

Le caractère délétère des mutations faux-sens détectées a été évalué en se basant sur les données publiées (International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumors : <http://www.insight-group.org>, Human Gene Mutation Database of Medical Genetics in Cardiff (HGMD) : <http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0.html>), les sites de prédiction de mutations (polyphen : <http://tux.embl-heidelberg.de/ramensky/> ; Neutral Network Splice Site Prediction : www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html), et en étudiant la fréquence des ces mutations dans la population Tunisienne en les recherchant dans le sang périphérique de 59 sujets Tunisiens non apparentés cliniquement sains utilisés comme témoin. Les familles pour lesquels aucune mutation n'a été identifiée dans les trois gènes MMR étudiés ont fait l'objet d'une recherche mutationnelle ciblée sur les exons 7 (c.494A>G, p.Tyr165Cys) et 13 (c.1145G>A, p.Gly382Asp) du gène MUTYH, responsable de certaines formes de CRC héréditaires et de CRC diagnostiqués à un âge jeune. Les délétions génomiques identifiées au niveau germinale ont été, recherchées, dans les tumeurs et tissus sains des patients correspondants. Un quotient de dosage DQ 0,6 par rapport à la muqueuse saine correspondante ou 0,3 par rapport à un ADN normal de contrôle suggèrent une délétion bi-allélique (les seuils tenant compte d'une contamination inévitable du tissu tumoral par du tissu sain). Les résultats de la MLPA évoquant une délétion génomique germinale ou somatique ont été confirmés dans au moins deux réactions indépendantes, mais aussi sur un deuxième prélèvement sanguin indépendant du premier. Les exons apparemment délétés ont été analysés par séquençage direct à la recherche d'une mutation ponctuelle (substitution, insertion/délétion de quelques nucléotides) au niveau du site de ligation des sondes de la MLPA et pouvant mimer une délétion partielle de cet exon. Afin de caractériser les réarrangements détectés par MLPA et de localiser les points de cassure, l'ADN génomique extrait à partir du sang périphérique du cas index a été amplifié par PCR longue distance ensuite cloné et séquencé.

Les séquences obtenues ont été analysées par comparaison à la séquence de référence via le programme Blast 2 de NCBI

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq>). En se basant sur le fait que la plupart des délétions génomiques sont médiées par recombinaison [4], la séquence des introns flanquant la délétion ont été analysées par le logiciel RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org/>), ainsi que le programme Blast 2 en vue de caractériser des séquences d'ADN fortement similaires localisées au niveau de la région de cassure et susceptibles d'induire une délétion génomique par recombinaison (homologue ou non homologue).

Caractérisation des tumeurs associées au syndrome de Lynch. Dans le but d'identifier les patients HNPCC, nous avons tout d'abord analysé le phénotype tumoral en rapport direct avec le système MMR : analyser l'expression des protéines MLH1, MSH2 et MSH6 par immunohistochimie ; étudier le phénotype MSI par l'analyse par PCR multiplex de 5 marqueurs microsatellites (BAT25, BAT26, NR21, NR22, NR24) [5]. Nous avons déterminé pour toute tumeur MSI-H le statut de méthylation du promoteur du gène MLH1, ceci afin de distinguer les tumeurs développées dans le cadre d'un syndrome HNPCC par rapport aux tumeurs sporadiques. Les réactions MSP ont été réalisées selon les conditions publiées par Grady et al [6]. Pour l'ensemble des tumeurs collectées, nous avons essayé de confronter les données obtenues par les techniques décrites précédemment avec d'autres marqueurs. Notre objectif est de pouvoir proposer d'autres marqueurs du syndrome HNPCC qui soient facilement utilisables en pratique médicale de soin. En particulier, nous avons analysé par PCR et séquençage sur ABI PRISM model 3100 le gène BRAF (exon 15) pour lequel il a été montré qu'il était fréquemment muté dans les tumeurs MSI-H sporadiques, non associées au syndrome de Lynch [7], le gène CTNNB1 (codant pour la β -caténine) (exons 3) altéré spécifiquement dans les tumeurs associées au syndrome de Lynch, et les gènes KRAS (codons 12 et 13) et TP53 (immunohistochimie et mutations au niveau des exons 4 à 9). La séquence des amorces, les températures d'hybridation ainsi que le programme des réactions PCR peuvent être fournis à la demande. Nous avons également étudié par immunohistochimie l'expression dans ces tumeurs de la mucine sécrétée MUC5AC. Cette mucine a été isolée et complètement caractérisée par Buisine et al. [8]. Des résultats préliminaires semblent indiquer que cette mucine qui est peu exprimée dans les tumeurs CRC en général serait fréquemment exprimée dans les tumeurs MSI-H.

Analyse statistique. Le seuil de significativité du p a été placé à 0,05. L'analyse statistique a été réalisée grâce à l'utilisation du logiciel SPSS version 15.0 (SPSS, Chicago, Illinois, USA).

RÉSULTATS

Nous avons analysé les gènes MMR chez 31 familles Tunisiennes non apparentées considérées selon les critères de sélection clinique comme étant à haut risque pour le syndrome de Lynch. Seul 13 d'entre elles ont répondu aux critères d'Amsterdam [2].

Les 18 familles restantes ont répondu à au moins un des critères révisés de Bethesda [9]. Au total 11 mutations germinales différentes ont été identifiées chez 6/13 (46.2%) familles Amsterdam-positives et 5/18 (28%) familles Amsterdam-négatives analysées : 3 mutations non sens, 3 mutation avec décalage du cadre de lecture, 2 mutations du site d'épissage, 1 réarrangement génomique, et une mutation faux sens de signification biologique et clinique inconnue. 8 des 11 altérations germinales identifiées dans notre étude, n'ont pas été

répertoriées dans d'autres populations (HGMD : <http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0.html>, Insight: <http://www.insight-group.org/>). Aucune mutation n'a été détectée au niveau des gènes MSH6 et MUTYH. Notre niveau de détection globale de mutation est de 35.5 % (11/31).

Toutes ces mutations, sauf une, ont été détectées chez des sujets de sexe masculin. L'âge moyen au moment du diagnostic des sujets porteurs de mutations est plus élevé (38 ans) que celui des sujets non porteurs de mutations (36.5 ans). Par ailleurs, l'âge moyen d'apparition des tumeurs dans les familles mutées est de 46 ans, contre 57 ans pour les familles non mutées. Les échantillons tumoraux disponibles de tous les sujets porteurs d'une mutation germinale ont montré une forte instabilité microsatellitaire (MSI-H) et une perte d'expression de la protéine codée par le gène muté. En revanche, les sujets Amsterdam positifs non porteurs de mutation délétère ont montré un phénotype tumoral stable (MSS) associé à une expression normale des 4 protéines MMR considérées. Par ailleurs, aucune mutation germinale délétère n'a pu être détectée chez le patient HNP8, malgré un phénotype tumoral fortement instable et une perte de l'expression des gènes MLH1 et PMS2. Ce résultat suggère que l'inactivation du gène MLH1 est, probablement, due à une mutation somatique et non germinale, en l'occurrence une altération épigénétique. Toutefois, l'étude par MSP de la région promotrice du gène MLH1 à la recherche d'une méthylation aberrante n'a révélé aucune altération, plaidant en faveur de HNPCC. Cependant, le mécanisme génétique à la base reste à déterminer. Une même mutation germinale délétère nouvelle a été identifiée au niveau de l'exon 9 du gène MSH2 dans deux familles (HNP25 et HNP27) à priori non apparentées. Ces familles partagent, par ailleurs, une même mutation faux sens au niveau de l'exon 4 du gène MSH2. L'analyse d'haplotype au niveau de ces deux familles en utilisant des marqueurs microsatellites localisés au niveau et flanquant le gène MSH2 était en accord avec une mutation fondatrice héritée d'un ancêtre commun plusieurs années auparavant. Nous avons également identifié une mutation germinale faux sens au niveau du gène MLH1 chez un patient. L'alignement des séquences peptidiques de MLH1 de plusieurs espèces a montré que cette altération implique un acide aminé qui est hautement conservé au cours de l'évolution. Cette altération n'a pas été identifiée chez 59 sujets cliniquement sains utilisés en tant que témoins. Malheureusement, il n'a pas été possible d'effectuer des études de co-ségrégation de la mutation avec la pathologie dans la famille et d'analyser le phénotype MSI et l'expression des gènes MMR dans les cellules tumorales par immunohistochimie qui auraient pu être d'une aide précieuse dans l'évaluation de leur nature pathogène. Chez quatre sujets nous avons identifié la même mutation faux sens au niveau de l'exon 19 du gène MLH1 (c.2152C>T, p.His718Tyr). Cette altération a provoqué la substitution d'un acide aminé chargé positivement par un autre polaire non chargé au niveau du domaine d'interaction de la protéine MLH1 avec les protéines PMS2/MLH3/PMS1. Ce domaine comporte 36 résidus amino-acides qui sont hautement conservés entre les protéines PMS2, MLH3 et PMS1. Les mutations faux sens qui ont eu lieu, dans le cas d'un syndrome de Lynch, au niveau de la région C-terminale ont provoqué une perte significative de l'interaction entre les protéines MLH1 et PMS2 [10]. Bien que cette mutation occupe une position hautement conservée chez *Mus musculus*, *Ratus norvegicus*,

Drosophilla melanogaster, *Saccharomyces cerevisiae*, elle a été considérée dans notre étude comme étant non pathogène pour plusieurs raisons. Premièrement, le même variant a été observé chez 4/ 59 sujets cliniquement sains et utilisés en tant que témoins. Deuxièmement, elle a été détectée en présence d'une mutation délétère chez les patients HNP3 et HNP24. A partir du fait que HNPCC est une pathologie à transmission autosomique dominante, la présence d'une seule mutation germinale délétère au niveau d'un gène MMR est suffisante pour déclencher la maladie. Troisièmement, l'échantillon tumoral du patient HNP3 a montré une perte sélective d'expression du gène MSH2 alors que la protéine MLH1 est normalement exprimée. La fréquence de mutations délétères détectées dans les familles ayant vérifié les critères d'Amsterdam est plus faible que celle attendue. Une étude génétique complète de 7/ 13 (54%) familles présentant une forme « classique » du syndrome de Lynch, n'a révélé aucune mutation germinale pathogène au niveau des gènes MMR MLH1, MSH2 ni MSH6. Les tumeurs de deux d'entre eux ont montré un phénotype MSS et une expression normale des quatre protéines MMR analysées. Dans ce groupe de patients le CRC familial est, probablement, associé à des mutations affectant des loci autres que les gènes MMR, c'est ce qu'on appelle cancer rectocolique du type X (c'est à dire d'étiologie inconnue) [11]. Par ailleurs, le sujet index peut, également, constituer un cas de phénocopie sporadique. En effet, les échantillons tumoraux sont génétiquement stables (MSS) et ne montrent pas de perte d'expression des gènes MMR par IHC. Bien qu'aucune mutation n'ait pu être détectée, ces familles doivent être considérées comme étant à haut risque et doivent bénéficier d'un programme de surveillance régulière [12, 13]. Parmi les 5 individus Amsterdam négatives chez qui une mutation délétère a été détectée, 2 ont développé des tumeurs métachrones colorectales ou rénales. Par ailleurs, l'étude des caractéristiques génétiques des 51 tumeurs a montré que, comme attendu, la présence d'instabilité microsatellitaire et la perte d'expression des protéines MMR étaient significativement associées à l'existence chez les patients d'antécédents familiaux de CRC ($p < 0,001$). De plus, l'expression de la mucine gastrique MUC5AC qui n'est pas exprimée dans le colon adulte normal était significativement associée à la présence d'instabilité microsatellitaire ($p = 0,0039$) et de perte d'expression des protéines MMR ($p = 0,0039$).

DISCUSSION

Nous avons analysé les gènes MMR chez 31 familles Tunisiennes non apparentées considérées selon les critères de sélection clinique comme étant à haut risque pour le syndrome de Lynch. Au total 11 mutations germinales différentes ont été identifiées chez 6/13 (46.2%) familles Amsterdam-positives et 5/18 (28%) familles Amsterdam-négatives analysées. Notre niveau de détection globale de mutation est de 35.5 % (11/31), ce qui est en accord avec certaines études [14]. Les échantillons tumoraux disponibles de tous les sujets porteurs d'une mutation germinale ont montré une forte instabilité microsatellitaire (MSI-H) et une perte d'expression de la protéine codée par le gène muté. En revanche, les sujets Amsterdam positifs non porteurs de mutation délétère ont montré un phénotype tumoral stable (MSS) associé à une expression normale des 4 protéines MMR considérées. Notre niveau de détection de mutation est de 0% pour les familles

présentant un phénotype tumoral MSS et/ou une expression normale des gènes MMR et de 86% (6/7) pour les familles présentant des tumeurs du type MSI-H et une perte de l'expression d'au moins un des gènes. Dans la présente étude nous avons trouvé une sensibilité de 83% à prédire un dysfonctionnement du système de réparation des mésappariements de l'ADN. Nos résultats supportent la notion que l'étude du phénotype MSI et de l'expression des gènes MMR par immunohistochimie doivent être utilisées en tant qu'outils de prescreening de sujets porteurs d'un syndrome de Lynch avant de procéder à la recherche mutationnelle au niveau des gènes MMR. L'inactivation des gènes MMR provoque un déficit dans le système de réparation et l'accumulation de mutations au niveau des séquences microsatellites. Détectée dans 85 à 90% des tumeurs associées à HNPCC, l'étude du phénotype MSI constitue l'empreinte principale du syndrome de Lynch [15]. Cependant, 10 à 15% des CRC sporadiques montrent aussi un phénotype MSI, associé à une altération somatique bi-allélique acquise et non germinale d'un gène MMR, le plus souvent par hyperméthylation des îlots CpG (cytosine phosphate-guanidine) du promoteur du gène MLH1 [16]. Malgré que les critères d'Amsterdam ont été modifiés pour tenir compte des tumeurs extracoliques, ces derniers demeurent assez strict dispensant de propositions médicales adaptées à environ un tiers des familles porteuses d'une mutation germinale au niveau des gènes MLH1 et MSH2 [17]. Les critères de Bethesda ont identifié les patients porteurs de mutations des gènes MLH1 et MSH2 avec une plus grande sensibilité (sensibilité de 94%) mais avec une spécificité moindre (Spécificité de 25%) [18]. Une même mutation germinale délétère nouvelle a été identifiée au niveau de l'exon 9 du gène MSH2 dans deux familles à priori non apparentées. Ces familles partagent, par ailleurs, une même mutation faux sens au niveau de l'exon 4 du gène MSH2. L'analyse d'haplotype au niveau de ces deux familles en utilisant des marqueurs microsatellites localisés au niveau et flanquant le gène MSH2 était en accord avec une mutation fondatrice héritée d'un ancêtre commun plusieurs années auparavant. De nombreuses mutations fondatrices affectant les gènes MLH1 et MSH2 ont été décrites dans le cadre d'un syndrome de Lynch dans certaines populations isolées [19, 20]. L'identification de ces mutations fondatrices a un impact très important sur le plan pratique, en effet, la recherche mutationnelle chez les sujets considérés comme étant à haut risque pour HNPCC ciblera, d'abord, la mutation ethnique – spécifique avant de procéder à une recherche mutationnelle générale. La fréquence des mutations germinales des gènes MLH1/MSH2 détectées dans les familles ayant répondu aux critères d'Amsterdam est comparable à celles rapportées par d'autres équipes (niveau de détection de 45-50% versus 46.2% dans notre étude) [21]. Par ailleurs, le niveau de détection au sein des familles suspectées d'avoir HNPCC et ne répondant pas aux critères d'Amsterdam est similaire à celui rapporté dans la littérature (8-28% versus 26.3% dans le présent travail) [21]. Dans la présente étude, le risque de CRC est plus fréquent chez les hommes par rapport aux femmes. Ce résultat est en rapport avec l'incidence de CCR dans la population générale en Tunisie, plus fréquent chez les hommes comparés aux femmes [21]. Cette distribution en fonction du sexe chez les sujets porteurs d'une mutation du gène MMR a été rapportée par d'autres études [22]. Une même mutation faux sens au niveau de l'exon 19 du gène MLH1 (c.2152C>T, p.His718Tyr) a été identifiée chez quatre sujets. Bien que cette mutation occupe une position

hautement conservée au cours de l'évolution, elle a été considérée dans notre étude comme étant non pathogène. Cette mutation faux sens a été, déjà, rapportée chez des sujets Afro-Américains sains, suggérant qu'il s'agit probablement d'un polymorphisme caractéristique des populations originaires d'Afrique [23, 24]. Comme attendue, les critères d'Amsterdam ont oublié la majorité des familles porteuses de mutations dans le cadre d'un syndrome de Lynch [18] et 45.5% (5/11) des sujets HNPCC ne seraient pas identifiés, si l'étude génétique était limitée uniquement aux familles ayant vérifié les critères d'Amsterdam I/II. Les critères de Bethesda ont identifié toutes les familles mutées des gènes MLH1 ou MSH2 mais, en contre partie, ils ont inclus plusieurs sujets dépourvus de mutations. Ces familles mutation positives n'ont pas vérifié les critères d'Amsterdam pour plusieurs raisons: (1) Le propositus est le premier cas de cancer dans les familles HNP18, HNP28 et HNP30 ; (2) Seuls deux membres sont atteints d'un cancer dans la famille HNP7 et HNP24 ; et enfin (3) Tous les sujets malades appartiennent à une seule génération dans la famille HNP3. Toutes ces données stipulent la nécessité de rechercher des familles HNPCC en dehors de la situation de haut risque typique pour le syndrome de Lynch. Par ailleurs, l'étude des caractéristiques

génétiques des 51 tumeurs a montré que, comme attendu, la présence d'instabilité microsatellitaire et la perte d'expression des protéines MMR étaient significativement associées à l'existence chez les patients d'antécédents familiaux de CRC ($p < 0,001$). De plus, l'expression de la mucine gastrique MUC5AC qui n'est pas exprimée dans le côlon adulte normal était significativement associée à la présence d'instabilité microsatellitaire ($p = 0,0039$) et de perte d'expression des protéines MMR ($p = 0,0039$).

En conclusion, cette étude visant la caractérisation moléculaire des mutations associées au syndrome HNPCC dans la population tunisienne est la première en Tunisie et son objectif consiste à mettre en place un programme de suivi et de prévention des familles HNPCC. Celle-ci nous a permis jusqu'à présent d'identifier une mutation germinale dans 10 familles. Huit des mutations identifiées permettent dès à présent leur recherche chez les apparentés dans un but de diagnostic prédictif. Nos résultats ont montré que, bien que préliminaire, l'étude de l'expression de MUC5AC pourrait avoir un intérêt pour l'aide au dépistage des patients à haut risque de développer un CRC.

Références

1. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 919-932.
2. Vasen HFA, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT, the ICG-HNPCC: New criteria for the hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the international collaborative group on HNPCC (ICG-HNPCC). *Gastroenterology* 1999; 116: 1453-1456.
3. Jass JR. HNPCC and sporadic MSI-H colorectal cancer: a review of the morphological similarities and differences. *Familial cancer* 2004; 3:93-100.
4. Kozak L, Hrabincova E, Kintir J, et al. Identification and characterization of large deletions in the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene by MLPA : Evidence for both homologous and non-homologous mechanisms of rearrangement. *Mol Genet and Metab* 2006; 89:300-309.
5. Suraweera N, Duval A, Reperant M et al: Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology* 2002; 123:1804-1811.
6. Grady WM, Rajput A, Lutterbaugh JD, Markowitz SD. Detection of aberrantly methylated hMLH1 promoter DNA in the serum of patients with microsatellite unstable colon cancer. *Cancer Res* 2001; 61:900-902.
7. Lubomierski N, Plotz G, Womerk M et al: BRAF mutations in colorectal carcinomas suggest two entities of microsatellite-unstable tumors. *Cancer* 2005; 104: 952-961.
8. Buisine MP, Devisme L, Savidge TC, et al. Mucin gene expression in human embryonic and fetal intestine. *Gut*. 1998 ; 43:519-24.
9. Umar A, Risinger JI, Hawk ET, Barrett JC. Testing guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nature* 2004; 4:153-158.
10. Vasen HFA, Stormorken A, Menko FH, et al. MSH2 mutation carriers are at higher risk of cancer than MLH1 MLH1 mutation carriers: A study of hereditary nonpolyposis colorectal cancer families. *J. Clin. Oncol.* 2001; 19: 4074-4080.
11. Weber TK, Chin HM, Rodriguez-Bigas M, et al. Novel hMLH1 and hMSH2 germline mutations in African Americans with colorectal cancer. *JAMA* 1999; 281: 2316-2320.
12. Lindor NM, Rabe K, Petersen GM, et al. Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency (Familial colorectal cancer type X). *JAMA* 2005; 293: 1979-1985.
13. Rossi BM, Lopes A, Ferreira FP, et al. hMLH1 and hMSH2 gene mutation in Brazilian families with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2002; 9: 555-561.
14. Lynch HT et Smyrk T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Cancer* 1996; 78:1149-1167.
15. Pi ol V, Castells A, Andreu M, et al. Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *JAMA* 2005; 293:1986-1994.
16. Salovaara R, Loukola A, Jristo P, et al. Population-based molecular detection of HNPCC. *J. Clin Oncol* 2000; 18: 2193-2200.
17. Syngal S, Fox EA, Eng C, Kolodner RD, Garber JE. Sensitivity and specificity of clinical criteria for hereditary non-polyposis colorectal cancer associated mutations in MSH2 and MLH1. *J. Med. Genet.* 2000; 37:641-645.
18. Chan TL, Yuen ST, Ho JW, et al. A novel germline 1.8-kb deletion of hMLH1 mimicking alternative splicing: a founder mutation in the Chinese population. *Oncogene* 2001; 20: 2976-2981.
19. Wagner A, Barrows A, Wijnen J T, et al. Molecular analysis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the united states: high mutation detection rate among clinically selected families and characterization of an American founder genomic deletion of the MSH2 gene. *Am. J. Hum. Genet.* 2003; 72:1088-1100.
20. Katballe N, Christensen M, Wikman FP, Ørntoft TF, Lauberg S. Frequency of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in Danish colorectal cancer patients. *Gut* 2002; 50:43-51.
21. Ben Abdallah M (1998) Registre des cancers Nord-Tunisie 1995-1998.
22. Kondo E, Horii A, Fukushige S. The interacting domains of three MutL heterodimers in man: hMLH1 interacts with 36 homologous amino acid residues within hMLH3, hPMS1 and hPMS2. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29: 1695-1702.
23. Kowalski LD, Mutch DG, Herzog TJ, Rader JS, Goodfellow PJ. Mutational analysis of MLH1 and MSH2 in 25 prospectively-Acquired RER+ endometrial cancers. *Genes, Chromosomes and cancer* 1997; 18: 219-227.
24. Syngal S, Fox EA, Li C, Dovidio M, Eng C, Kolodner RD, Garber JE. Interpretation of genetic test results for hereditary Nonpolyposis colorectal cancer. Implication for clinical predisposition testing. *JAMA* 1999; 281: 247-253.