

Centre d'Etudes Doctorales : Sciences et Techniques de l'Ingénieur

N° d'ordre 60/2018

THESE DE DOCTORAT

Présentée par

Mlle Fatima Zahra Moufid

Spécialité : Génétique et Biologie Moléculaire

**L'apport de la génétique et la génomique dans la
caractérisation moléculaire des gènes de
prédisposition héréditaire au cancer colorectal chez la
population Marocaine**

Thèse présentée et soutenue le 22/12/2018 devant le jury composé de :

Nom Prénom	Titre	Etablissement	
Pr. Ibensouda Koraichi Saad	PES	FST-Fès	Président
Pr. Ibrahimi Azeddine	PES	FMP-Rabat	Rapporteur
Pr. Houari Abdellah	PES	FP-Taroudant	Rapporteur
Pr. Tazi Abdelali	PES	FST-Fès	Rapporteur
Pr. Ouldim Karim	PES	FMP-Fès	Examineur
Pr. Iraqui Houssaini Mohammed	PES	FST-Fès	Directeur de thèse

Laboratoire d'accueil : Laboratoire de Biotechnologie Microbienne

Etablissement : Faculté des Sciences et Techniques de Fès

Chapitre 1

**Étude de l'implication des gènes *MLH1* et *MSH2* dans la
prédisposition au cancer colorectal chez la population
Marocaine**

Introduction

Le syndrome de Lynch est une prédisposition génétique qui augmente le risque de développer certains types de cancers, particulièrement le cancer du côlon et du rectum. Il constitue la forme la plus commune (2-4%) du cancer colorectal héréditaire (Jasperson et al., 2010) (Ma et al., 2018).

Au niveau génétique, le syndrome est causé par un défaut du système de réparation des mésappariements, suite à une mutation germinale d'au moins un des gènes MMR : *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* ou *EPCAM* (Tiwari et al., 2016). Cette mutation conduit à la perte d'expression de la protéine correspondante, induisant l'affaiblissement du système de réparation lors de la réplication d'ADN par la cellule (Jiricny, 2006). En conséquence, l'altération de la fonction de réparation des mésappariements au cours de la réplication introduit une infidélité dans la séquence d'ADN et conduit à l'accumulation des mutations dans des séquences répétitives simples (microsatellites), provoquant une instabilité du génome (phénotype MSI) (Baudhuin et al., 2005).

La majorité des altérations génétiques responsables du syndrome de Lynch, affectent principalement les gènes *MLH1* et *MSH2*. En effet, environ 90% des mutations germinales sont localisées sur ces deux gènes (Tutlewska et al., 2013).

Ainsi, nous avons choisi d'étudier l'implication des gènes *MLH1* et *MSH2* dans la susceptibilité au cancer colorectal héréditaire chez une population atteinte de CCR en général. Afin d'atteindre cet objectif, nous avons sélectionné, dans un premier temps, les patients éligibles pour réaliser l'analyse mutationnelle des gènes *MLH1/MSH2*, en se basant sur une stratégie de pré-criblage moléculaire par IHC (ImmunoHistoChimie). Dans un second temps, les cas ayant montré un phénotype MMR-D (MMR-déficient), ont bénéficié du test génétique visant à rechercher les mutations constitutionnelles au niveau des gènes *MLH1/MSH2*. Après identification des variants, nous avons procédé à la caractérisation bio-informatique des mutations afin de démontrer leurs effets pathogéniques sur la protéine. Nous avons également réalisé le diagnostic presymptomatique d'une famille Marocaine, dans le but d'identifier, premièrement, les membres de la famille porteurs de la mutation causale, et deuxièmement, de leur proposer un protocole de surveillance adapté.

Résultats

1. Les caractéristiques cliniques et histo-pathologiques de la population étudiée

Depuis Janvier 2010 jusqu'au Décembre 2014, une cohorte de 215 patients atteints de cancer colorectal a été recrutée au niveau du CHU Hassan II de Fès. L'Âge moyen au moment du diagnostic est de 56.16 ans. Les cas âgés de moins de 50 ans représentent 66.7 %. La population a été classée en trois catégories : 1.4 % répondent aux critères d'Amsterdam II, 33.3 % suivent les critères révisés de Bethesda et 65.2 % représentent les cas sporadiques.

L'adénocarcinome constitue le type histologique le plus commun dans notre cohorte avec un pourcentage de 90.4 %. De même, la localisation colique est la plus fréquente (55.8 %) par rapport à la localisation rectale (44.2 %) (Annexe 1).

2. Etude de l'expression des protéines MMR par immunohistochimie

Le diagnostic du syndrome de Lynch constitue un processus relativement délicat, se faisant en plusieurs étapes. Dans un premier temps intervient le diagnostic dit « clinique » qui permet de suspecter un syndrome de Lynch ; suivi du diagnostic moléculaire précoce indispensable pour sélectionner les patients qui bénéficieront de l'analyse constitutionnelle des gènes impliqués dans ce syndrome, étape ultime pour confirmer le diagnostic du SL.

Le diagnostic clinique du SL repose sur les critères d'Amsterdam II et les critères révisés de Bethesda (Vasen et al., 1999) (Umar et al., 2004). Cependant, ces critères ont été largement critiqués pour le manque de spécificité et de sensibilité (Kievit et al., 2004) (Julié et al., 2008). En effet, certains sujets valident ces critères, mais n'ont pas de mutations constitutionnelles identifiées. À l'opposé, d'autres sujets ne présentent pas ces critères mais des mutations ont été retrouvées lors de l'analyse des gènes. Ces critères ne sont donc pas restrictifs pour la suite du diagnostic. A la lumière de ces contraintes, plusieurs études et consortiums ont mis en évidence les bénéfices du dépistage systématique du SL chez tous les cas diagnostiqués par un CCR en employant les tests de pré-criblage moléculaires (Vasen et al., 2013) . Ces tests permettent d'identifier un sous-groupe d'individus suspectés d'être porteurs du syndrome de Lynch, qui vont bénéficier par la suite de l'analyse constitutionnelle des gènes MMR.

Les tests de pré-criblage sont indispensables car ils permettent de sélectionner les patients sur des critères plus précis et fiables que les critères cliniques. Ces tests font intervenir deux techniques. La première est la mise en évidence du phénotype MSI par PCR ;

la seconde est l'immunohistochimie (IHC) qui permet de mettre en évidence la perte d'expression de l'une des protéines du système MMR (Baudhuin et al., 2005).

Dans notre contexte, nous avons employé l'IHC comme stratégie de pré-criblage. Le choix de cette technique a été basé sur les résultats des études ultérieures qui ont montré que l'IHC est plus rentable et moins coûteuse que la recherche du phénotype MSI par PCR (Hewish et al., 2010) (Shia, 2008) (Chen et al., 2016). En effet, l'IHC nécessite peu d'équipements et présente l'avantage de spécifier le gène muté à travers la protéine qui a montré une extinction de l'expression (Chaves et al., 2000).

Ainsi, dans ce travail, nous avons recherché l'extinction des 4 protéines MMR (MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2) par IHC chez 215 patients atteints de CCR. En résultat, 25 patients ont montré un phénotype MMR-déficient (MMR-D) (11.6 %). Une perte conjointe des protéines MLH1/PMS2 a été observée chez 17 cas (68 %). Tandis que, 8 cas (32 %) ont montré une absence des protéines MSH2/MSH6.

L'ensemble des CCR qui répondent aux critères d'Amsterdam II (AM) ont montré un phénotype MMR-D. Cependant, seulement 11.8 % des CCR remplissant les critères révisés de Bethesda (CB) ont révélé une perte conjointe de l'expression des protéines MMR.

La corrélation entre le statut IHC et les caractéristiques clinico-pathologiques a été réalisée et les résultats ont été rapportés dans le tableau 15. Globalement, aucune différence n'a été notée concernant la différenciation tumorale, le type histologique et les stades T ou N entre les groupes IHC négative et positive. En revanche, les participants ayant un phénotype MMR-déficient étaient significativement masculins ($p = 0,006$) et plus susceptibles d'avoir une localisation tumorale droite ($P < 0.00001$). De plus, La perte d'expression des protéines MMR était significativement liée aux critères d'Amsterdam II ($p = 0.002$).

Dans ce travail, la proportion des tumeurs qui ont montré un phénotype MMR-déficient rapportée était de l'ordre de 11.6 %. Nos résultats concordent avec ceux des études ultérieures dont l'objectif était d'étudier l'expression des protéines MMR et le phénotype MSI chez une population atteinte de CCR non sélectionnée. Certains pays occidentaux et du moyen orient ont rapporté une fréquence des tumeurs MMR-D entre 9 et 15 % (Julié et al., 2008) (Siraj et al., 2015) (Buchanan et al., 2016). La seule étude Marocaine visant à rechercher le phénotype MSI chez 70 patients atteints de CCR à un âge inférieur à 50 ans, a décrit une fréquence de 15 %, relativement supérieure à celle décrite dans notre étude (Benmoussa et al., 2012).

Tableau 15 : Corrélation entre les données clinico-pathologiques et le statut MMR des patients.

Caractéristiques	IHC		p-Value
	Positive (%) (n=190)	Négative (%) (n=25)	
Nombre de patients (%)	190 (88.4)	25 (11.6)	
Age de diagnostic			0.22
50\geq	126 (68)	14 (56)	
50\leq	59 (32)	11 (44)	
Sexe			0.006
Homme	97 (51)	20 (80)	
Femme	93 (49)	5 (20)	
Groups (n=210)			0.002
AC	0	3 (12)	
BG	62 (33)	8 (32)	
Sporadique	123 (66)	14 (56)	
Site de la tumeur (n=214)			<0.00001
Colon gauche	68 (36)	6 (25)	
Colon droit	30 (16)	15 (62.5)	
Rectum	92 (48)	3 (12.5)	
Type Histologique (n=215)			1
Adénocarcinome	172 (90.5)	23 (92)	
Carcinome mucineux	18 (9.5)	2 (8)	
Différentiation de la tumeur (n= 215)			0.14
bien	118 (62.1)	12 (48)	
Moyen	60 (31.6)	9 (36)	
Peu	12 (6.3)	4 (16)	
Stade T (n=196)			0.08
T1/T2	40 (22.7)	1 (5)	
T3/T4	136 (77.3)	19 (95)	
Stade N (n=184)			0.14
Absence de nodules	101 (61.6)	16 (80)	
Présence de nodules	63 (38.4)	4 (20)	

3. Caractérisation moléculaire et bio-informatique des mutations germinales des gènes *MLH1* et *MSH2*

Dans le but d'étudier l'implication des gènes *MLH1* et *MSH2* dans la prédisposition héréditaire au CCR chez la population Marocaine, nous avons réalisé l'analyse mutationnelle des deux gènes par séquençage de Sanger. La méthode de Sanger constitue un moyen fiable et sensible permettant de déterminer avec certitude la succession exacte des nucléotides de la région du gène ciblé. Après séquençage et identification des variants, l'étape suivante consiste à rechercher l'éventuelle présence des mutations mises en évidence dans les bases de données internationales pour distinguer les nouveaux variants de ceux déjà décrits. Par la suite, nous nous sommes servis des outils de prédiction in-silico pour étudier le caractère délétère des substitutions faux-sens identifiées sur la protéine correspondante.

Les vingt-cinq patients qui ont montré une perte de l'expression des protéines MMR ont été sélectionnés pour passer le test génétique visant à rechercher les mutations au niveau des gènes *MLH1* et *MSH2*. Après extraction d'ADN à partir des échantillons de sang, et amplification des exons et des jonctions exon-intron des gènes *MLH1* et *MSH2* par PCR, les produits d'amplification ont été séquencés et analysés.

Parmi 25 patients ayant passé l'analyse mutationnelle, cinq cas ont révélé des mutations germinales au niveau des gènes *MLH1/MSH2*. Deux patients sur les cinq (40 %) remplissaient les critères d'Amsterdam II et trois (60 %) répondaient aux critères révisés de Bethesda. Les porteurs des mutations étaient significativement plus jeunes au moment du diagnostic du CCR, et plus susceptibles d'avoir une localisation droite de la tumeur. Les principaux résultats de l'étude sont résumés dans la figure 34.

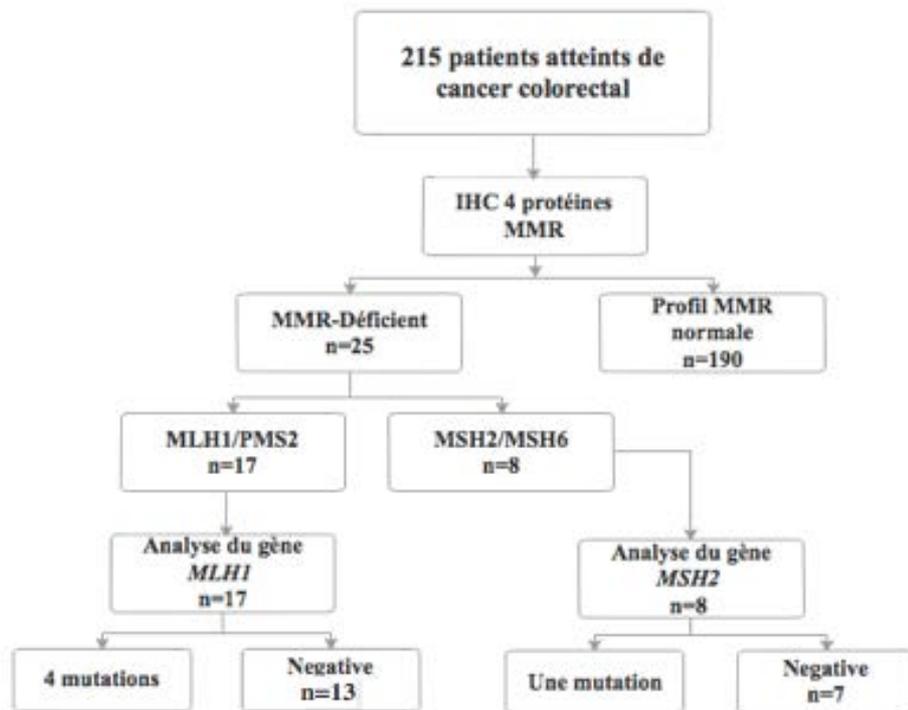


Figure 34 : Organigramme montrant les résultats de la stratégie de pré-criblage moléculaire adoptée pour sélectionner les patients éligible pour l'analyse mutationnelle des gènes *MLH1/MSH2*.

IHC indique immunohistochimie, négative indique l'absence des mutations

• Le variant du gène *MSH2*

L'analyse moléculaire du gène *MSH2* (NM_000251) a mis en évidence une mutation faux-sens chez un Homme (CR93) âgé de 48 ans, diagnostiqué par un adénocarcinome peu différencié du côlon droit. Il avait comme histoire familiale, une sœur diagnostiquée par le cancer du sein.

La mutation c.1759C>G (*MSH2* (NM_000251), p.Gly587Arg) correspond à une substitution faux-sens, qui entraîne le changement du résidu Glycine en position 587 par l'Arginine (Figure 35).

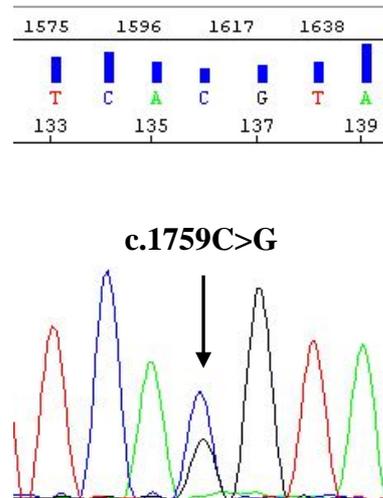


Figure 35 : Chromatogramme montrant la substitution c.1759C>G du gène MSH2 à l'état hétérozygote.

Dans le but d'étudier l'effet du variant c.1759C>G sur les fonctions biologiques de la protéine MSH2, nous avons employé les logiciels SIFT et UMD-predictor. Le programme SIFT a donné un score de 0, ce qui signifie que la substitution a un effet pathogénique sur la protéine. De même, le logiciel UMD-predictor a prédit le variant comme délétère, en attribuant un score de 100. Les résultats de l'analyse in-silico sont résumés dans le tableau 16.

Tableau 16 : Les résultats de l'analyse de prédiction de l'effet de la mutation c.1759C>G sur la protéine MSH2.

Variant	Score SIFT (0-1)	Prédiction	Score UMD- predictor (0-100)	Prédiction
c.1759C>G	0.00	Pathogénique	100	Pathogénique

Nous avons également étudié la conservation du résidu impacté par le changement. Pour cela, nous avons réalisé l'alignement multiple de l'acide aminé en position 587 avec les séquences protéiques de plusieurs espèces. Les résultats obtenus montrent que l'acide aminé est conservé dans la phylogénie (Figure 36).

L'exploration moléculaire des gènes MMR (*MLH1* et *MSH2*) a montré que 80% des mutations étaient localisées sur le gène *MLH1*, avec une dominance relative des mutations frameshift (60%). En effet, l'analyse bio-informatique nous a permis de détecter une délétion, une duplication et une substitution au niveau du gène *MLH1* (Figure 38).

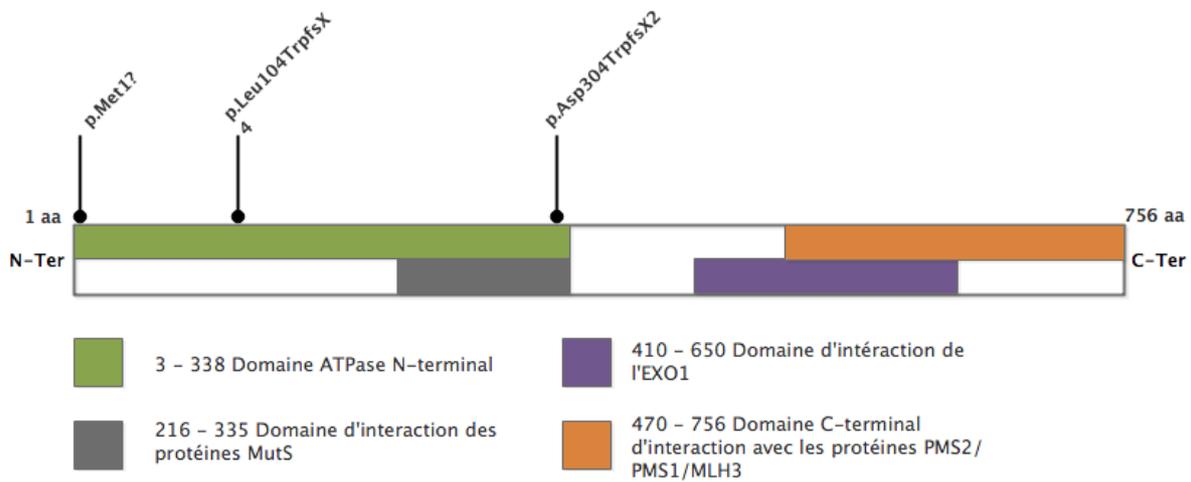


Figure 38 : Localisation des trois mutations germinales identifiées sur le domaine ATPase N-terminal de la protéine *MLH1*.

Les trois variants ont été identifiés chez quatre patients, dont une délétion détectée chez deux patients non apparentés. Le tableau 17 résume les caractéristiques cliniques des patients porteurs des mutations au niveau des gènes *MLH1* et *MSH2*.

Tableau 17 : Les caractéristiques cliniques des patients porteurs des mutations germinales sur le gène *MLH1*.

ID du patient	Age	Sexe	critères	Le site de la tumeur	IHC	Le gène muté	Type d'altération	Le variant nucléotidique
CR1	45	H	AM	Colon droit	MLH1/PMS2	<i>MLH1</i>	Délétion	c.311delT
CR55	38	H	CRB	Colon droit	MLH1/PMS2	<i>MLH1</i>	Délétion	c.311delT
CR136	50	F	AM	Colon droit	MLH1/PMS2	<i>MLH1</i>	Duplication	c.910dupG
CR215	37	H	AM	Colon droit	MLH1/PMS2	<i>MLH1</i>	Substitution	c.2T>C

H indique Homme, F indique Femme. CRB : critères révisés de Bethesda. AM : critères d'Amsterdam II.

➤ **Le variant c.2T>C**

La mutation c.2T>C (*MLH1* (NM_001258271), p.Met1?) du gène *MLH1* a été identifiée chez un patient (CR215) âgé de 37 ans (Figure 39). L'histoire clinique du patient associe un adénocarcinome moyennement différencié du côlon droit. Tandis que l'histoire familiale indique la présence des antécédents familiaux de cancer colorectal chez 4 frères.

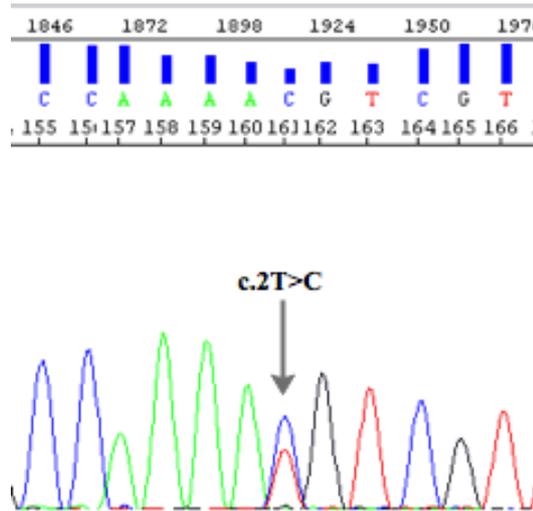


Figure 39 : Chromatogramme montrant la substitution c.2T>C à l'état hétérozygote identifiée chez le patient CR215.

Les logiciels de prédiction utilisés pour analyser l'impact du variant sur la protéine ont classé la substitution comme étant délétère. En effet, SIFT a attribué un score de 0, témoignant la nature pathogénique de la substitution. Dans le même sens, UMD-predictor a prédit le changement affectant le premier acide aminé de la séquence protéique MLH1, comme délétère, en donnant un score de 100. Le tableau 18 résume les principaux résultats de l'analyse in-silico réalisée par les logiciels SIFT et UMD-predictor.

Tableau 18 : Les résultats de l'analyse de prédiction de l'effet de la mutation c.2T>C sur la protéine MLH1.

Variant	Score SIFT (0-1)	Prédiction	Score UMD-predictor (0-100)	Prédiction
c.2T>C	0.00	Pathogénique	100	Pathogénique

La substitution c.2T>C (*MLH1* (NM_001258271), p.Met1?) affecte le deuxième nucléotide du codon initiateur qui code pour la Méthionine. Les changements au niveau de ce codon entraînent un blocage de la synthèse protéique. En effet, l'ARN de transfert chargé d'initier la synthèse de la chaîne d'acides aminés ne reconnaît plus le codon initiateur (altéré par la mutation), par conséquent, la synthèse protéique n'aura pas lieu. L'absence de la protéine MLH1 au niveau de la tumeur a été mise en évidence par immunohistochimie chez le patient porteur de la mutation, ce qui prouve l'effet pathogénique de ce variant sur l'expression protéique.

➤ **Le variant c.311delT**

La délétion c.311delT (*MLH1* (NM_001258271), p.Leu104TrpfsX4) localisée au niveau de l'exon 4 du gène *MLH1*, a été rapportée chez deux cas non apparentés (CR1 et CR55) appartenant à des régions différentes au Maroc (Figure 40). Le patient (CR1) est un Homme âgé de 45 ans suivi pour un adénocarcinome bien différencié du côlon droit. Il avait par ailleurs des antécédents familiaux du cancer du côlon, de l'endomètre et gastrique. Son frère et sa mère étaient décédés d'un cancer du côlon à l'âge de 30 et 70 ans respectivement. Le deuxième cas (CR215) porteur de la même délétion, est un Homme âgé de 38 ans diagnostiqué pour un cancer du côlon droit sans antécédents familiaux de cancers.

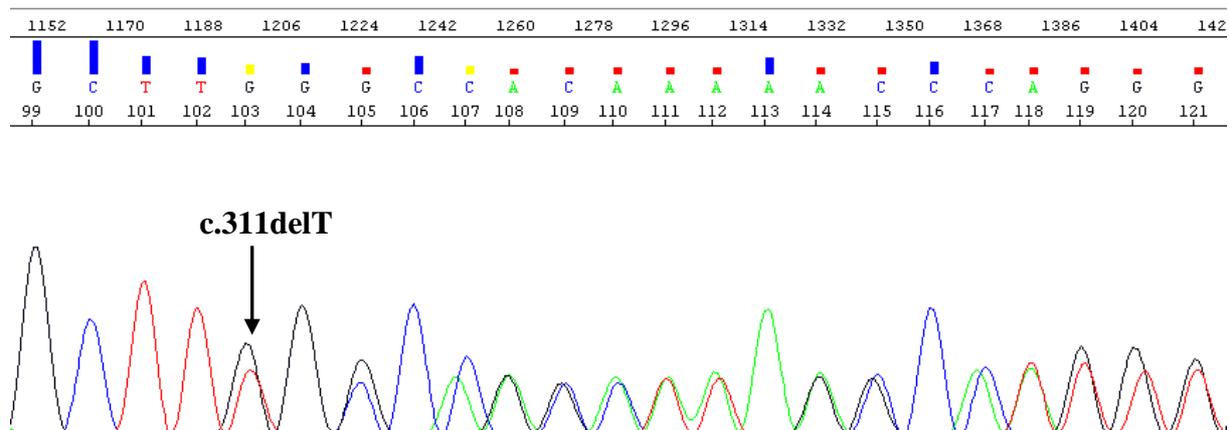


Figure 40 : Chromatogramme montrant la mutation c.311delT du gène *MLH1* à l'état hétérozygote.

La délétion c.311delT (*MLH1* (NM_001258271), p.Leu104TrpfsX4) est située sur le domaine responsable de l'activité ATPasique de la protéine MLH1 (Pang et al., 1997). Elle entraîne un décalage du cadre de lecture, qui mène à la génération d'un codon stop prématuré après 4 codons. Il en résulte une protéine non-fonctionnelle qui manque les principaux domaines d'interaction avec les protéines ; MutS, EXO1 et le complexe PMS2/PMS1/MLH3 (Figure 40) (Raevaara et al., 2005). La perte de ces domaines influence le recrutement de la machinerie réparatrice nécessaire pour la réparation des dommages d'ADN de type mismatch. Ainsi, la défaillance du système de réparation MMR, entraîne l'accumulation des erreurs au niveau du tissu, et favorisera par conséquent la cancérogénèse.

➤ **Le variant c.910dupG**

La mutation c.910dupG (*MLH1* (NM_001258271), p.D304fsX306) a été observée chez une femme âgée de 50 ans, suivie pour un adénocarcinome mucineux moyennement différencié du côlon droit (Figure 41).

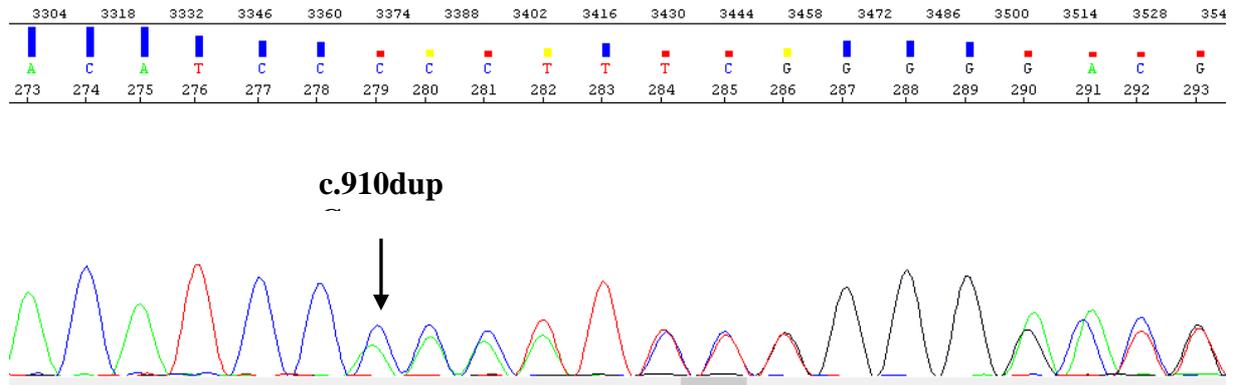


Figure 41 : Chromatogramme montrant la duplication c.910dupG du gène *MLH1* à l'état hétérozygote.

La patiente présente une histoire familiale du cancer du côlon et d'une tumeur cérébrale. En effet, son frère et sa mère ont décédé d'un CCR à l'âge de 56 et 50 ans respectivement. Tandis que, sa fille est décédée à l'âge de 18 ans d'un cancer cérébrale. Son fils âgé de 31 ans est suivi pour un cancer du côlon (Figure 42).

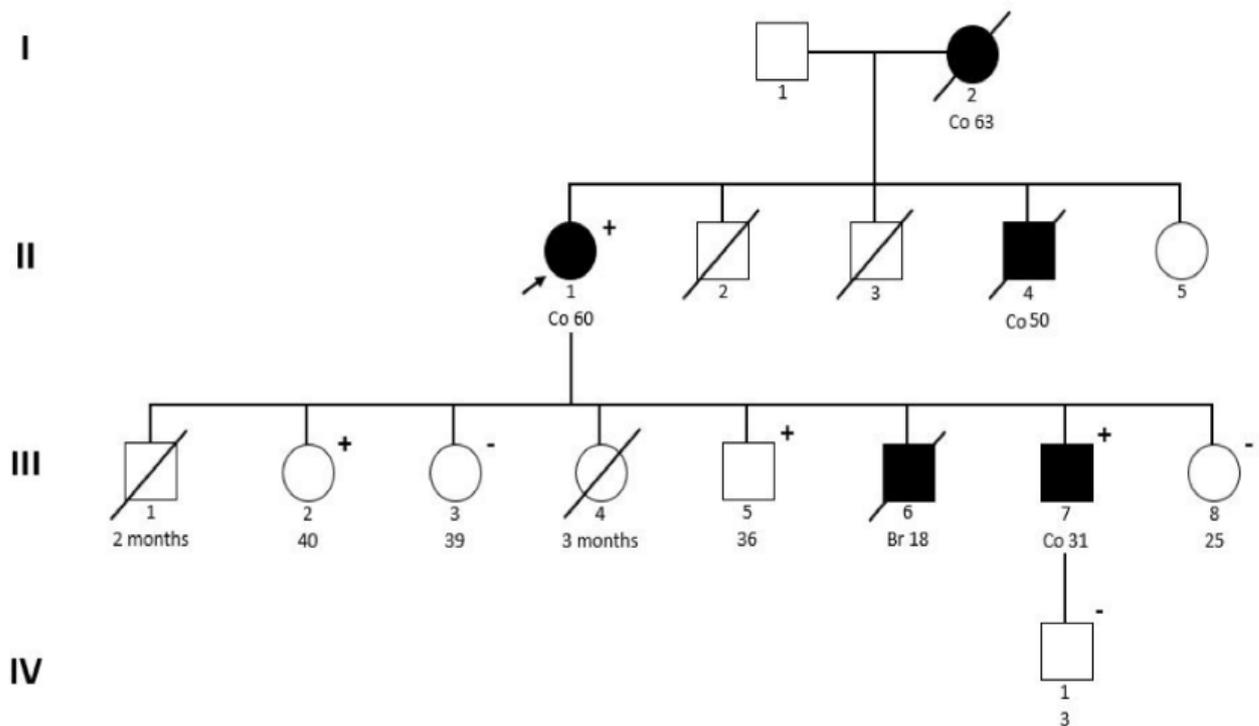


Figure 42 : Arbre généalogique simplifiée de la famille du patient porteur de la duplication c.910dupG.

La flèche indique le patient index (II-1), les symboles colorés indiquent les membres de la famille diagnostiqués par un cancer (Br pour cancer cérébral, Co pour cancer colorectal), les signes Plus/Moins indiquent la présence ou l'absence de la duplication chez les membres de la famille.

En cherchant dans les bases de données des mutations ainsi que dans la littérature, nous avons constaté que la duplication c.910dupG constitue une nouvelle mutation décrite pour la première fois chez la population Marocaine. En effet, cette mutation n'a pas été mentionnée dans les bases de données descriptives HGMD (Human genome database), 1000 genomes, dbSNP (SNP database), ESP (exome sequencing project) et ExAC (Exome Aggregation Consortium).

Dans le but de prouver le caractère pathogénique de cette mutation sur la protéine MLH1, nous avons :

- Étudié la ségrégation de la mutation au sein de la famille.
- Recherché la mutation chez une population de contrôles.
- Évalué l'impact de la mutation sur la protéine à l'aide de l'outil bioinformatique MutationTaster.

L'étude de la ségrégation de la mutation avec le phénotype a été réalisée en recherchant la nouvelle duplication chez six membres de la famille par la technique de PCR-allèle spécifique. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 43.

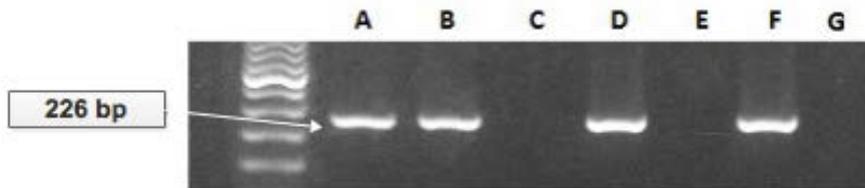


Figure 43 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR allèle-spécifique de la région contenant la duplication c.910dupG.

Une bande spécifique de 226pb a été identifiée chez le cas index et d'autres apparentés indiquant la présence de la duplication (A: II-1, B: III-2, D: III-5, F: III-7), l'absence de la bande montre l'absence de la duplication chez les autres membres de la famille (C: III-3, E: III-8, G: IV-1)

La duplication a été identifiée chez trois membres de la famille ; le fils âgé de 31 ans déjà suivi pour un cancer du côlon, et deux autres apparentés asymptomatiques pour la maladie. À l'issue de ces résultats, nous avons transféré les cas asymptomatiques au service de Gastro-entérologie pour commencer la surveillance par coloscopie. Il s'est avéré que les deux cas asymptomatiques présentaient des lésions précancéreuses au niveau du côlon. En effet, la coloscopie de la femme a révélé un polype de 7 mm au niveau du côlon sigmoïde. Le résultat de l'anatomo-pathologie a confirmé qu'il s'agit d'un adénome tubulaire de dysplasie à haut grade. Tandis que l'homme a révélé un polype sessile de 2 mm. L'analyse de la

ségrégation au sein de la famille a montré que la duplication co-ségrège avec le phénotype, ce qui laisse suggérer que la duplication peut être responsable du phénotype chez la famille.

D'un autre côté, la recherche de la duplication chez une population contrôle, constituée de 50 individus sains, a montré l'absence totale de la mutation, ce qui signifie qu'il ne s'agit pas d'un polymorphisme fréquent.

Pour mieux étudier le caractère pathogénique de la nouvelle duplication c.910dupG (*MLH1*(NM_001258271), p.D304fsX306), nous nous sommes servis de l'outil de prédiction MutationTaster. L'avantage de ce programme réside dans sa capacité à prédire l'effet des petites délétions et insertions sur les fonctions biologiques de la protéine, chose que d'autres programmes comme SIFT et UMD-predictor ne peuvent pas réaliser. Les résultats obtenus montrent que le programme MutationTaster a prédit la nouvelle duplication comme étant délétère, et responsable du phénotype (disease-causing mutation). En plus, le programme a pu montrer que la position de l'acide aminé affectée par la mutation était conservée dans la phylogénie (Figure 44).



Figure 44 : Alignement multiple des séquences protéiques MLH1 de différentes espèces au niveau du codon 304.

Tous les arguments avancés nous mènent à conclure que la duplication c.910 dupG est une mutation pathogène qui pourrait aboutir à l'inactivation du système MMR, et par conséquent, à l'apparition du cancer du côlon chez le patient index. En effet, la duplication du nucléotide G en position 910 (codon 304) introduit un codon stop prématuré à 3 codons en aval. La protéine qui en résulte manque l'un de ses principaux domaines d'interaction avec le complexe PMS2/MLH3/PMS1. Ce domaine est indispensable au recrutement des protéines

PMS2 et MLH3 qui jouent un rôle important dans la cascade des réactions menées au cours de la réparation d'ADN. Ce qui va par conséquent mener à un système MMR défaillant.

En considérant la perte de la protéine MLH1 au niveau du tissu tumorale en combinaison avec la co-ségrégation de la duplication avec le phénotype dans la famille, et son absence dans la population générale, on peut conclure que la nouvelle mutation décrite dans cette étude est responsable du phénotype chez la famille.

Discussion

Dans le but de déterminer la prévalence des mutations germinales des gènes *MLH1/MSH2* chez la population Marocaine, nous avons adopté une stratégie de dépistage moléculaire universelle pour sélectionner les patients éligibles pour l'analyse génétique. Au premier lieu, nous avons recherché l'expression des protéines MMR par IHC chez 215 patients atteints de CCR en général. Le but de cette étape est d'identifier un sous-groupe de patients suspectés d'être porteurs du SL sur des bases moléculaires précises et fiables que les critères cliniques. Dans une seconde étape, les cas montrant un phénotype MMR-déficient ont bénéficié de l'analyse génétique constitutionnelle visant à rechercher les mutations au niveau des gènes *MLH1* et *MSH2*. La stratégie de dépistage, adoptée dans ce travail, nous a permis d'identifier 5 patients porteurs des mutations parmi 215 cas de CCR. La prévalence des mutations germinales des gènes *MLH1* et *MSH2* rapportée dans ce travail correspond donc à 2.33 %.

La prévalence des mutations des gènes MMR employant la stratégie moléculaire de dépistage du syndrome de Lynch a été rapportée dans différentes populations (Figure 45). Ainsi, dans une étude espagnole, la fréquence des mutations *MLH1/MSH2* chez une cohorte de 2093 patients atteints de CCR était de 0.5 % (Pérez-Carbonell et al., 2012). Dans une autre étude Japonaise qui a porté sur 1234 cas de CCR, seulement 5 patients étaient porteurs des mutations germinales des gènes *MLH1/MSH2* (Chika et al., 2016). La seule étude qui a été effectuée en moyen orient par Siraj et al en Arabie Saoudite, a rapporté une fréquence des mutations de 0.7 % (Siraj et al., 2015). Ces valeurs restent inférieures à la prévalence de 2.33 % estimée dans ce travail. Par ailleurs, d'autres études ont décrit des pourcentages très élevées de ces mutations. Dans une étude française, 7 porteurs de mutations *MLH1/MSH2* ont été identifiés sur une cohorte de 214 CCR, ce qui correspond à un pourcentage de 3.27 % (Julié et al., 2008). La plus forte incidence a été documentée en Finland, la stratégie de dépistage universelle du SL adoptée par l'équipe Finlandaise de Salovaara et al, a permis d'identifier 18 mutations *MLH1/MSH2* dans une population de 535 atteints de CCR en général (3.4 %) (Salovaara et al., 2000).

Globalement, la prévalence décrite chez la population Marocaine était plus proche de celle de la population Américaine que les autres. Deux études ont été menées aux États-Unis, la première de Hampel et al a porté sur une large cohorte de 1566 patients CCR, 2.04 % étaient positifs vis-à-vis les mutations *MLH1/MSH2* (Hampel et al., 2008). L'autre étude plus

récente de Yurgelun et al, a décrit une incidence de 1.89 % (Yurgelun et al., 2017) (Figure 45).

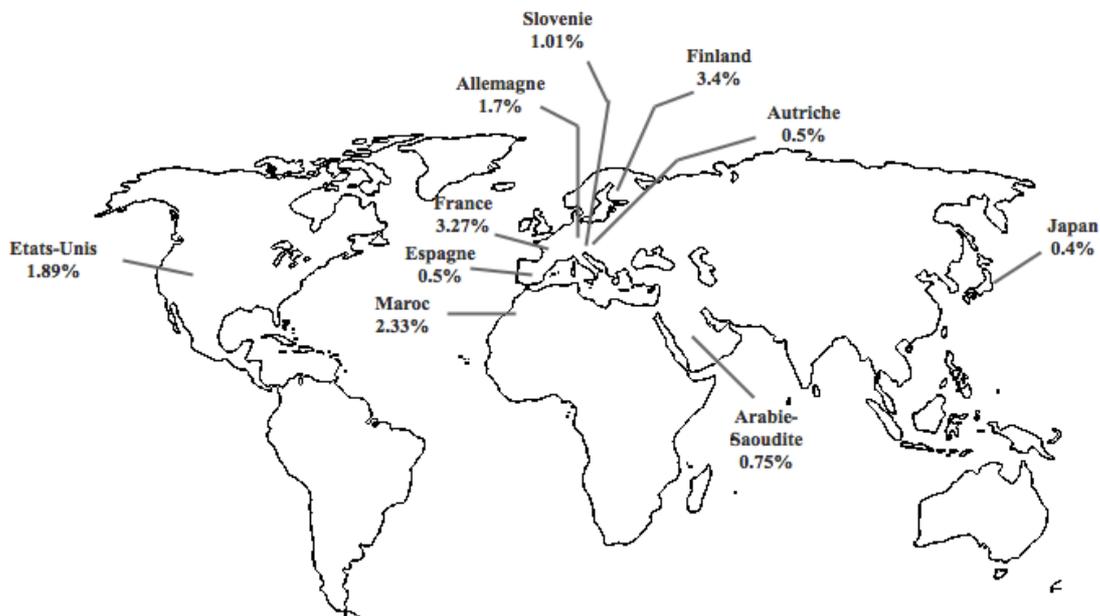


Figure 45 : Prévalence des mutations germinales des gènes *MLH1/MSH2* chez la population Marocaine et d'autres populations.

La variation de la prévalence des mutations associées au syndrome de Lynch observée dans les populations peut être attribuée aux : variations inter-population, la présence des gènes modificateurs, l'ethnicité, le régime alimentaire et le mode de vie (de la Chapelle, 2005).

À l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement curatif pour guérir le syndrome de Lynch, seules les mesures de dépistage et de prévention permettent d'éviter l'apparition du cancer ou de diminuer ses conséquences.

La coloscopie est le seul examen actuellement recommandé pour le dépistage des lésions néoplasiques colorectales chez les sujets atteints de syndrome Lynch. Les recommandations des différentes sociétés savantes sont homogènes sur ce point (Dunlop et al., 2002) (Winawer et al., 2003) (Lindor et al., 2006) (Vasen et al., 2007a). La surveillance constitue une mesure préventive efficace, qui repose sur une coloscopie totale avec chromoendoscopie à l'indigo carmen accompagnée d'une résection des polypes précancéreux (Brown et al., 2016). Elle doit être renouvelée tous les deux ans, à partir de l'âge de 20 ans. Quand un CCR est révélé, deux options chirurgicales peuvent être envisagées : une colectomie subtotala avec anastomose iléo-réctale ou la colectomie segmentaire (Vasen et al., 2007b)(Manceau et al., 2011).

Les femmes atteintes d'un syndrome Lynch sont à risque accru de cancer de l'endomètre et de cancer de l'ovaire. En effet, pour ces femmes, le risque de développer un cancer de l'endomètre au cours de l'existence a été évalué globalement entre 40 et 60 % et serait plus élevé en cas de mutation du gène *MSH6* qu'en cas de mutation des gènes *MLH1* et *MSH2* (Aarnio et al., 1999a) (Goecke et al., 2006) (Vasen et al., 2001) ; celui de développer un cancer de l'ovaire, entre 10 à 12 % (Aarnio et al. 1999) (Dunlop et al., 1997). La surveillance endométriale repose sur l'échographie endovaginale renouvelable tous les deux ans à partir de l'âge de 30 ans. Il est aussi recommandé de surveiller les ovaires lors de cette échographie. En cas de dysplasie mise en évidence, une hystérectomie doit être réalisée.

Dans notre contexte, l'identification de la mutation causale chez la patiente (CR136) nous a permis de réaliser le diagnostic presymptomatique de ses apparentés asymptomatiques. Deux membres de la famille, porteurs de la mutation causale, ont bénéficié d'un dépistage par coloscopie. Les résultats de l'examen coloscopique ont montré des polypes précancéreux chez la fille et le fils âgés respectivement de 36 et 40 ans. Le dépistage nous a donc permis de prévenir la survenue du cancer en identifiant des lésions avant la transformation maligne.

Les résultats obtenus dans cette étude montrent le bénéfice qu'apporte l'identification du syndrome de Lynch au malade et sa famille en proposant une prise en charge adaptée au risque individuel. Le suivi endoscopique régulier des patients présentant un syndrome de Lynch et de leurs apparentés permet de réduire de façon importante la morbidité, la mortalité due au CCR (diminution d'environ 65 % dans le groupe dépisté), le taux de CCR (diminution de 62 %) et d'augmenter l'espérance de vie (Järvinen et al., 2000) (de Jong et al., 2006).

Conclusion

Le syndrome de Lynch, maladie autosomique dominante, résulte de mutations constitutionnelles portant sur un des gènes du système de réparation des mésappariements de l'ADN (*DNA mismatch repair* – MMR). Les patients portant ces mutations sont à très haut risque de développer un cancer colorectal ou de l'endomètre et, dans une moindre mesure, d'autres tumeurs malignes épithéliales. Les quatre principaux gènes impliqués sont les gènes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* et *PMS2*. Ils empêchent la propagation d'irrégularités de la séquence nucléotidique qui peut survenir durant la réplication de l'ADN, et assurent ainsi le maintien de l'intégrité du génome. Les mutations des gènes *MLH1* et *MSH2* regroupent, à elles seules, 90 % des prédispositions génétiques identifiées à ce jour.

Le diagnostic du syndrome de Lynch repose initialement sur les critères d'Amsterdam et les critères révisés de Bethesda. Le syndrome demeure sous-diagnostiqué malgré l'existence de recommandations internationales permettant son identification. Les critères d'Amsterdam, bien que très spécifiques, ne sont pas suffisamment sensibles. Les recommandations de Bethesda, plus utiles pour les cliniciens dans leur pratique quotidienne, demeurent difficilement généralisables. Pour ces diverses raisons, des groupes d'experts ont élaboré un programme de dépistage systématique du syndrome de Lynch, basé sur un pré-criblage moléculaire des tumeurs (IHC/MSI), chez les patients présentant un CCR en général.

La première phase de ce travail consiste à rechercher l'expression des protéines MMR chez une population de 215 patients nouvellement diagnostiqués de CCR, quel que soit l'âge. Les résultats de l'IHC montrent un phénotype MMR-déficient chez 25 cas CCR (11.6 %). Une perte conjointe des protéines *MLH1/PMS2* a été observée chez 17 cas (68 %). Tandis que, 8 cas (32 %) ont montré une absence des protéines *MSH2/MSH6*.

Durant la deuxième phase de cette étude, nous avons sélectionné les cas ayant montré une extinction des protéines MMR pour rechercher les mutations constitutionnelles au niveau des gènes *MLH1/MSH2*. L'analyse moléculaire des deux gènes du système MMR, a pu identifier une mutation germinale pathogène au niveau du gène *MSH2*. Il s'agit de la substitution c.1759C>G (*MSH2* (NM_000251), p.Gly587Arg) qui altère un site d'épissage, causant ainsi la perte de l'exon 11 durant le processus d'épissage alternative.

Une deuxième mutation frameshift a été également détectée au niveau du gène *MLH1*. La délétion c.311delT (*MLH1* (NM_001258271), p.Leu104TrpfsX4) rapportée chez deux patients CCR non apparentés, induit la génération d'un codon stop prématuré. Cette mutation

serait responsable de la défaillance du système de réparation MMR en entraînant la synthèse d'une protéine incomplète et non fonctionnelle.

À côté de ces mutations, nous avons également identifié une nouvelle duplication jamais décrite dans la littérature et les bases de données. La duplication c.910dupG (*MLH1* (NM_001258271), p.D304fsX306) entraîne la création d'un codon stop prématuré. Dans le but de prouver le caractère pathogénique de cette mutation, nous avons étudié dans un premier temps la ségrégation de la mutation au sein de la famille. Les résultats obtenus montrent la présence de la duplication chez trois membres de la famille (un cas symptomatique et deux autres asymptomatiques). Dans un second temps, nous avons recherché la nouvelle duplication chez une population contrôle saine. L'absence totale de la mutation chez la population saine signifie qu'il ne s'agit pas d'un polymorphisme fréquent. L'analyse *in silico* a prédit la nouvelle duplication comme délétère.

D'après les résultats obtenus, nous avons pu mettre en évidence que 2.33 % des patients, atteints de cancer colorectal, étaient porteurs de mutations germinales associées au syndrome de Lynch. En comparant avec différentes populations du monde, on constate que la prévalence identifiée chez la population Marocaine est légèrement élevée par rapports à certains pays occidentaux (Japon et l'Espagne), tandis qu'elle est proche de la prévalence décrite aux États-Unis et en Allemagne.

Nous avons également réalisé le diagnostic presymptomatic chez les apparentés d'un patient porteur d'une mutation délétère sur le gène *MLH1*. L'analyse génétique a détecté deux membres de la famille asymptomatiques porteurs de la même mutation. Le dépistage par coloscopie a révélé des polypes précancéreux chez les deux cas. Ces résultats démontrent l'intérêt majeur apporté par l'identification des mutations germinales sur le patient et sa famille. Les recommandations spécifiques de prise en charge ont fait preuve d'un grand bénéfice en termes de coût et de santé. En effet, une surveillance adaptée peut prévenir la survenue de la moitié des CCR et réduit le taux de mortalité global de 65 %, grâce à un traitement précoce des lésions cancéreuses.

Ce travail correspond à la première étude Marocaine et nord-Africaine qui a permis d'estimer la prévalence de ces mutations sur une large population de CCR, en sélectionnant les patients sur des bases moléculaires et non pas cliniques. Les travaux réalisés ont pu, d'une part, donner une description détaillée du profil mutationnel des patients marocains. D'autre part, les résultats obtenus illustrent une contribution significative des gènes *MLH1* et *MSH2* dans la prédisposition génétique au cancer colorectal chez la population Marocaine.

Cette étude est une étape importante et primordiale pour la standardisation de la prise en charge du cancer colorectal au Maroc, et pour la réalisation d'un registre national. Ces résultats permettront certainement une prise en charge adéquate répondant aux recommandations internationales.

Néanmoins les résultats de ce travail constituent les bases d'un travail à poursuivre et à améliorer pour une étude beaucoup plus approfondie qui va permettre l'élaboration d'une stratégie de dépistage à l'échelle national du syndrome de Lynch.

Ainsi, les perspectives futures sont la mise en place d'études prospectives de grande envergure employant une stratégie de dépistage comprehensive, incluant d'une part, l'analyse mutationnelle de tous les gènes du système MMR, et d'autre part, le test MSI dans la stratégie de pré-screening.