



HAL
open science

**L'inactivation de
l'O6-méthylguanine-DNA-méthyltransférase (MGMT)
constitue un événement précurseur de la cancérogénèse
MSI**

Isabelle Sourrouille-Gervais

► **To cite this version:**

Isabelle Sourrouille-Gervais. L'inactivation de l'O6-méthylguanine-DNA-méthyltransférase (MGMT) constitue un événement précurseur de la cancérogénèse MSI. Biologie cellulaire. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS365 . tel-03008643

HAL Id: tel-03008643

<https://theses.hal.science/tel-03008643>

Submitted on 16 Nov 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Sorbonne Université

Ecole Doctorale 394 - Physiologie, physiopathologie et thérapeutique

Centre de Recherche Saint Antoine

Equipe de recherche « Instabilité des microsatellites et cancers »

L'inactivation de l'O6-méthylguanine-DNA-méthyltransférase (MGMT) constitue un événement précurseur de la cancérogénèse MSI

Par **Isabelle SOURROUILLE-GERVAIS**

THESE DE DOCTORAT

Présentée et soutenue publiquement le 27 mai 2019,

Devant un Jury composé de :

Pr Pierre AUCOUTURIER	Président
Pr Frédéric BIBEAU	Rapporteur
Pr Antoine BROUQUET	Rapporteur
Dr Fanny JAULIN	Examinatrice
Dr Olivier CARON	Examineur
Dr Martine MULERIS	Directrice de thèse
Pr Magali SVRCEK	Directrice de thèse

RESUME

L'inactivation du système de réparation des mésappariements de l'ADN (Mismatch Repair, MMR) favorise un processus oncogénique d'instabilité des séquences microsatellites du génome (MicroSatellite Instability, MSI). Les cancers colorectaux (CCR) MSI peuvent s'observer dans un contexte familial (syndrome de Lynch, SL) ou sporadique. Les cryptes MMR déficientes (MMR-Deficient Crypt Foci, MMR-DCF), lésions de la muqueuse non tumorale perdant l'expression d'une protéine MMR, pourraient constituer un événement préneoplasique de la carcinogénèse colorectale MSI chez les patients SL. Dans certains CCR MSI, les cas dits «Lynch-like», le diagnostic de SL ne peut être posé avec certitude car aucune mutation germinale pathogénique MMR n'est identifiée, malgré une forte suspicion clinique et/ou phénotypique.

Nous avons confirmé que les MMR-DCF ne s'observaient que chez les patients SL. Par ailleurs, nous avons montré qu'elles étaient 3 fois plus fréquentes dans la muqueuse adjacente à la tumeur que dans la muqueuse distante. Nous avons identifié des MMR-DCF chez un patient «Lynch-like», ce qui est un argument diagnostique supplémentaire en faveur d'un authentique SL. Les MMR-DCF devraient donc être systématiquement recherchées dans la muqueuse adjacente dans ce contexte.

Par ailleurs, un défaut de champ en MGMT (O6-méthylguanine-DNA-méthyltransferase, une enzyme impliquée dans la réparation de l'ADN) dans la muqueuse non néoplasique pourrait favoriser la cancérogénèse MSI, par un mécanisme de tolérance à la méthylation. En évaluant l'expression de la MGMT comparativement à l'expression des protéines MMR, nous avons pu constater que les MMR-DCF étaient plus fréquemment identifiées en cas de perte d'expression de la MGMT ($p=0.004$), et préférentiellement en cas de présence d'un défaut de champ en MGMT. L'inactivation de la MGMT constituerait donc un événement précurseur favorisant l'apparition de MMR-DCF chez les patients atteints de SL.

TABLE DES MATIERES

RESUME	2
TABLE DES MATIERES	3
LISTE DES FIGURES.....	5
LISTE DES ABREVIATIONS	6
INTRODUCTION	8
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	9
I. Le système <i>MisMatch Repair</i> (MMR)	9
A. Rôle dans la réparation des mésappariements des bases de l'ADN.....	9
1. Chez les procaryotes.....	9
2. Chez les eucaryotes	10
B. Rôle dans la signalisation apoptotique de certaines altérations induites de l'ADN	13
1. Altérations de l'ADN liées à la méthylation	13
a. Composés générant des lésions de méthylation de l'ADN.....	13
b. Prise en charge des lésions de méthylation par la MGMT	16
c. Prise en charge par MMR et tolérance à la méthylation	19
2. Altérations de l'ADN induites par les thiopurines	21
a. Définition et mode d'action.....	21
b. Prise en charge par MMR et tolérance aux thiopurines.....	22
II. Cancer colorectal MSI	23
A. Déficience du système MMR.....	23
B. Classifications des cancers colorectaux	24
1. Familles phénotypiques de cancers colorectaux	24
2. Classification moléculaire CMS.....	25
C. Particularités du CCR MSI	27
1. Caractéristiques clinico-pathologiques.....	27
2. Mutations induites par l'inactivation du système MMR	28
3. Implications thérapeutiques.....	30
a. Chimiothérapie	30
b. Immunothérapie.....	31
D. Détermination du statut MSI.....	34
1. En immunohistochimie.....	34
2. En biologie moléculaire	37
E. Contextes cliniques	39
1. Formes familiales.....	39
a. Syndrome de Lynch	39
(1) Historique	39
(2) Caractéristiques cliniques.....	40
(i) Spectre clinique du SL.....	40
(ii) Critères diagnostiques	41
(3) Caractéristiques moléculaires.....	42
(i) Altérations constitutionnelles.....	43
(ii) Altérations somatiques.....	43
(4) Diagnostic du syndrome de Lynch	44
(5) Surveillance clinique des patients atteints du SL	45

2.	CMMRD	45
3.	CCR MSI sporadiques	46
4.	Contextes cliniques particuliers.....	47
a.	Situations diagnostiques difficiles	47
(1)	Variants de signification inconnue	47
(2)	Syndrome « Lynch-like ».....	48
b.	CCR MSI induits dans un contexte de MICI	50
F.	Lésions précancéreuses.....	52
1.	Séquence de transformation classique	52
a.	Adénomes.....	52
b.	Cryptes aberrantes	52
2.	Cryptes MMR-déficientes.....	53
III.	MGMT et oncogénèse MSI	55
A.	Inactivation de la MGMT	55
1.	Mécanismes en cause.....	55
2.	Détermination de l'inactivation de la MGMT	56
a.	Niveau d'expression de la MGMT	56
(1)	Immunohistochimie.....	56
(2)	Imagerie.....	57
b.	Statut de méthylation du promoteur	58
B.	Conséquences d'une inactivation de la MGMT	59
1.	Etudes <i>in vitro</i>	59
2.	Etudes <i>in vivo</i>	59
3.	Rôle de la MGMT dans l'oncogénèse colorectale MSI	61
a.	MGMT et cancer colorectal.....	61
b.	MGMT et tumeurs MSI	61
4.	Notion de défaut de champ en MGMT.....	62
C.	Implications thérapeutiques	62
	TRAVAUX DE RECHERCHE.....	64
I.	Etude Morphologique	64
II.	Etude <i>in vivo</i>	93
A.	Rationnel.....	93
B.	Protocole expérimental	93
C.	Résultats	95
III.	Autres travaux.....	97
	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	121
I.	Détection de cryptes MMR déficientes (MMR-DCF)	121
A.	Mise en évidence des MMR-DCF	121
B.	Différenciation syndrome de Lynch et CCR sporadique	122
C.	Implications thérapeutiques.....	126
II.	Survenue de MMR-DCF et défaut de champ en MGMT	127
A.	Scénario physiopathologique	127
B.	Prise en charge du syndrome de Lynch.....	128
1.	Prévention chez les patients Lynch.....	128
2.	Implications thérapeutiques.....	129
	CONCLUSION	130
	REFERENCES	131

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Le système de réparation des mésappariement des bases (système MMR)	12
Figure 2: Alkylation (méthylation) des bases de l'ADN.....	13
Figure 3: Risque de cancer colorectal associé à une consommation excessive de viande rouge et transformée	14
Figure 4: Réparation des lésions de méthylation de l'ADN	17
Figure 5: Action de la MGMT.....	18
Figure 6: Tolérance à la méthylation	19
Figure 7: Mode d'action des thiopurines.....	22
Figure 8: Classification CMS des cancers colorectaux	27
Figure 9: Immunothérapie anti-tumorale et inhibition de PD-1, PD-L1 ou CTLA-4	32
Figure 10: Modèle immunitaire pour le pronostic des cancers colorectaux.....	33
Figure 11: Immunohistochimie (IHC) pour les 4 protéines principales du système MMR	36
Figure 12: Exemples de profils individuels d'amplification.....	37
Figure 13: Modèle des "Two-hits" selon Knudson.....	42
Figure 14: Immunohistochimie d'un foyer de cryptes MMR déficientes	54
Figure 15: Evaluation de l'expression de la MGMT par immunohistochimie	57
Figure 16: Technique de pyroséquençage.....	58
Figure 17: Scénario de carcinogénèse MSI favorisée par la déficience MGMT.....	65
Figure 18: Analyse MSI des tumeurs observées sur le modèle murin.....	96
Figure 19: Algorithme diagnostique pour les patients ayant un CCR MSI difficilement classable	125

LISTE DES ABREVIATIONS

ACF : *Aberrant Crypts Foci*

ACVR2 : *Activin type II Receptor*

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : Acide DésoxyriboNucléique Complémentaire

AM : Agent Méthylant

MNNG : Méthyl-N'-nitro-N-NitrosoGuanidine

AOM : AzOxyMéthane

APC : *Adenomatous Polyposis Coli*

BAX : *Bcl2-Associated-X*

CCR : Cancer ColoRectal

CD : Cluster de Différenciation

CIMP : *CpG Island Methylator Phenotype*

CIN : *Chromosomal INstability*

CMMRD : *Constitutional MisMatch Repair Deficiency*

cMS : *coding MicroSatellites*

CMS : *Consensus Molecular System*

CTLA4 : *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*

dMMR : MMR Deficiency

DNMT : *DNA MethylTransferase*

DSS : Dextran Sulfate Sodium

EGFR : *Epidermal Growth Factor Receptor*

EPCAM : *EPithelial Cell Adhesion Molecule*

EXO : EXOnucléase

FDA : *Food and Drug Administration* (Agence Nord-Américaine des produits alimentaires et médicamenteux)

HNPCC : *Hereditary Non Polyposis Cancer*

HSP110 : *Heat Shock Protein 110*

ICK : *Immune CheckPoint*

IHC : Immuno Histo Chimie

InSiGHT : *International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumors*

ko : *Knock Out*

LOH : *Loss of Heterozygosity*

MGMT : O6-MéthylGuanine-MéthylTransférase
MICI : Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin
MLH : *MutL Homolog*
MMR : *MisMatch Repair*
MMR-DCF : *MisMatch Repair Deficient Crypts Foci*
MNU : N-Méthyl-N-NitrosUrea
MRE11 : *Meiotic Recombination 11*
MSH : *MutS Homolog*
MSI : *MicroSatellite Instability*
MSI-H : *MicroSatellite Instability-High*
MSI-L : *MicroSatellite Instability-Low*
MSS : *MicroSatellite Stability*
NBI : *Narrow Band Imaging*
NOC : *N-Nitroso Compounds*
O6BzG : O6-Benzyl-Guanine
O6MeG : O6-Methyl-Guanine
PCNA : *Proliferating Cell Nuclear Antigen*
PD-1 : *Programmed cell Death 1*
PD-L1 : *Programmed cell Death Ligand 1*
pMMR : MMR Proficiency
PMS : *Post Meiotic Segregation*
RCH : RectoColite Hémorragique
SCNA : *Somatic Copy Number Alteration*
Séquence NR : Séquence Non Répétée
Séquence R : Séquence Répétée
SL : Syndrome de Lynch
TGFβ : *Transforming Growth Factor β*
TGFβR2 : *Transforming Growth Factor β Receptor2*
TMZ : TeMoZolomide
UTR : *Untranslated Transcribed Region*
VSI : Variant de Signification Inconnue
wt : *Wild Type*
5-FU : 5-FluoroUracile
6TG : 6-ThioGuanine

INTRODUCTION

L'instabilité des microsatellites (MSI, *MicroSatellite Instability*) est un phénotype tumoral qui témoigne d'une déficience du système de réparation des mésappariements de l'ADN (MMR, *MisMatch Repair*). Le phénotype MSI concerne environ 15% des cancers colorectaux (CCR), que ce soit dans un contexte héréditaire (Syndrome de Lynch) ou sporadique. Le CCR étant le 4^{ème} cancer le plus fréquent, avec 45000 nouveaux cas annuels en France, il constitue un modèle privilégié pour l'étude de l'oncogénèse MSI.

Au cours de ma thèse je me suis intéressée aux facteurs génétiques et environnementaux favorisant l'émergence de lésions précancéreuses de la cancérogenèse MSI, les cryptes MMR-déficientes (MMR-DCF, *MMR Deficient Crypt Foci*). Ces structures, identifiées au sein de la muqueuse non néoplasique, ont un aspect morphologique normal, mais elles présentent une absence de marquage MMR (MMR deficiency, dMMR) et un phénotype MSI. Ces lésions surviennent exclusivement chez les patients atteints de syndrome de Lynch, ce qui en fait un outil diagnostique intéressant pour les situations cliniques dans lequel le diagnostic est douteux. Des études ont rapporté l'association entre oncogénèse MSI et la déficience en une autre enzyme de réparation de l'ADN, la MGMT (O6-MéthylGuanine-Méthyltransférase). La MGMT répare les lésions de méthylation de l'ADN mais en cas de déficience de la MGMT, ces lésions sont prises en charge par le système MMR ce qui aboutit à la mort cellulaire. Dans ces conditions, une déficience MMR confère à la cellule un avantage sélectif puisqu'elle lui permet d'échapper à la mort *via* le mécanisme de tolérance à la méthylation. Nous avons étudié au cours d'une étude morphologique le lien entre le défaut de champ en MGMT et la survenue de MMR-DCF. Nous avons dans un second axe cherché à élaborer un modèle murin de carcinogénèse MSI.

Je présenterai dans ce manuscrit tout d'abord une revue bibliographique rapportant l'état actuel des connaissances sur le rôle du système MMR, les mécanismes sous-tendant la carcinogénèse colorectale MSI et le rôle de la MGMT. Je présenterai ensuite les travaux réalisés au cours de mon doctorat, puis proposerai quelques perspectives de réflexion.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Le système *MisMatch Repair* (MMR)

A. Rôle dans la réparation des mésappariements des bases de l'ADN

Le système de réparation des mésappariements (MMR, *MisMatch Repair*) intervient de façon post-répllicative pour prendre en charge les erreurs non réparées par l'ADN polymérase au cours de la réplication. Le taux d'erreurs passe de $1/10^7$ à $1/10^9$ bases après correction par le système MMR.

Ce système agit sur le brin fille néosynthétisé qui est reconnu du brin matrice notamment par la présence des cassures entre les fragments d'Okazaki.

1. Chez les procaryotes

Le système MMR est très conservé au sein des espèces, et il a été initialement décrit et étudié chez la bactérie *Escherichia Coli*. Le complexe MMR procaryote (Mut HLS) est composé de 3 protéines principales: MutS, MutL et MutH (Claverys & Lacks 1986; Modrich & Lahue 1996). Ce système agit selon un processus post-répliatif d'excision-resynthèse d'une portion d'ADN contenant un mésappariement (Wagner & Meselson 1976; Wildenberg & Meselson 1975) ; il est en charge de la réparation du brin néosynthétisé, facilement détecté chez les procaryotes grâce à un léger retard de méthylation (Glickman et al. 1978; Marinus & Konrad 1976; Schlagman et al. 1986).

Chaque protéine du complexe MutHLS est impliquée dans une étape du processus de réparation (Cooper et al. 1993; Viswanathan et al. 2001; Natrajan et al. 2003; Robertson et al. 2006) [Figure 1] :

- Un homodimère de protéines MutS permet la reconnaissance du mésappariement,
- Un homodimère de protéines MutL est recruté dans une phase intermédiaire d'activation,
- MutH est alors activée ; elle reconnaît le brin fille (non méthylé) et permet le clivage des brins et l'excision des bases erronées, grâce à l'action de MutU (hélicase) et d'une exonucléase

- Les sites manquants sur le néobrin sont alors réparés par l'ADN polymérase et l'ADN ligase.

2. Chez les eucaryotes

Le système MMR est très conservé mais il est plus complexe chez les eucaryotes, où il existe plusieurs protéines homologues de MutS et MutL (G.-M. Li 2008 ; Hewish et al. 2010) [Figure 1]:

Six homologues de MutS ont été décrits : MSH1 à MSH6 (*MutS Homolog*), dont un (MSH1) est spécifique de la levure. Chez l'homme, ces protéines interviennent dans la reconnaissance des mésappariements, sous forme de deux complexes d'hétérodimères (Genschel et al. 1998; Edelman et al. 2000; Li & Martin 2016) :

- le complexe principal MutS α (MSH2-MSH6), qui reconnaît les mésappariements par substitution d'une base et les boucles d'insertion/délétion courtes
- le complexe accessoire MutS β (MSH2-MSH3), qui reconnaît principalement les boucles insertion/délétion longues (plus de 10 nucléotides).

Les fonctions des complexes MutS α et MutS β semblent donc être redondantes vis-à-vis de la réparation de certaines boucles d'insertion/délétion de bases. Leur action permet l'activation des étapes ultérieures de la réparation par interaction avec les homologues de MutL.

MSH4 et MSH5 jouent un rôle spécialisé dans le contrôle de la recombinaison méiotique chez la levure et l'homme, (Paquis-Flucklinger et al. 1997; Winand et al. 1998) mais sont dépourvues de domaine N-terminal, nécessaire à la reconnaissance des mésappariements (Her & Doggett 1998; Hollingsworth et al. 1995; Ross-Macdonald & Roeder 1994).

Quatre homologues de MutL ont été décrits : MLH1, MLH3 (*MutL Homolog*), PMS1 et PMS2 (*Post Meiotic Segregation*) (Buermeyer et al. 1999; Kolodner & Marsischky 1999) Chez l'homme, ces protéines interviennent dans la phase intermédiaire d'activation, sous forme de trois complexes d'hétérodimères (Kondo et al. 2001) :

- le complexe principal MutL α (MLH1-PMS2), qui participe à la réparation des mésappariements d'une base et des boucles d'insertion/délétion,
- le complexe accessoire MutL γ (MLH1-MSH3) qui serait principalement impliqué dans les réparations des boucles insertion/délétion,

- le rôle du dernier complexe MutL β (MLH1-PMS1) dans la réparation de l'ADN est incertain.

Aucun homologue de MutH n'a été décrit chez l'eucaryote ; la discrimination du néo brin implique notamment la protéine PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), dont l'interaction avec MLH1 et les complexes MutS α et MutS β a été mise en évidence *in vitro* (Umar et al, 1996; Yang, 2007) *via* un motif N-terminal très conservé des protéines MSH6 et MSH3 (qui n'existe pas dans MSH2) (Johnson et al, 1996; Umar et al, 1996 ; Gu et al, 1998 ; Clark et al, 2000; Flores-Rozas et al, 2000). En plus de son rôle dans la discrimination du brin néosynthétisé, PCNA est aussi impliquée dans l'excision, puisqu'un de ses partenaires est l'exonucléase 1 (EXO1). La découverte de l'activité endonucléasique de MutL α , suggère que ce complexe serait également impliqué dans la discrimination du brin néosynthétisé (Kadyrov et al, 2006).

La phase d'excision implique l'exonucléase 1 (EXO1) qui interagit avec MLH1, MSH2 et MSH3, *via* un processus d'excision bidirectionnel (Zhang et al, 2005): l'excision est initiée à partir d'une cassure simple ou double brin de l'ADN puis se poursuit en direction du mésappariement. Paradoxalement, alors que la protéine EXO1 n'a qu'une activité exonucléasique 5'-3' reconnue, elle est nécessaire à l'excision 3'-5'. Ceci a conduit à suggérer que EXO1 pourrait posséder une activité exonucléasique 3'-5' cryptique qui ne serait activée que dans un contexte de réparation par le système MMR (Genschel et al, 2002 ; Dzantiev et al, 2004).

D'autres protéines interviennent également dans l'excision bidirectionnelle de l'ADN, tels le facteur de réplication C (RFC) et PCNA qui modulent l'activité de EXO1 en fonction du point d'initiation et du mésappariement (Xie et al, 1999). La participation de EXO1 dans la réparation des mésappariements est sujette à controverse, puisqu'une reconstruction *in vitro* d'un système fonctionnel ne contenant pas EXO1 a été réalisée (Kadyrov et al, 2009). Par ailleurs, d'autres protéines possédant une activité exonucléasique 3'-5' sont susceptibles d'être impliquées dans ce processus, du fait que leur absence d'expression conduisait à un taux accru de mutations. C'est notamment le cas de MRE11 (meiotic recombination 11) ou des ADN polymérase δ et ϵ qui possèdent une activité de relecture 3'-5' (Longley et al, 1997; Vo et al, 2005).

La réparation du brin excisé est ensuite réalisée par les ADN polymérase δ et ϵ

(activité polymérase 5'-3'), et de la protéine PCNA, puis l'ADN ligase 1, qui est un partenaire d'interaction avec la polymérase δ et PCNA (Kunkel & Erie, 2005; Modrich, 2006).

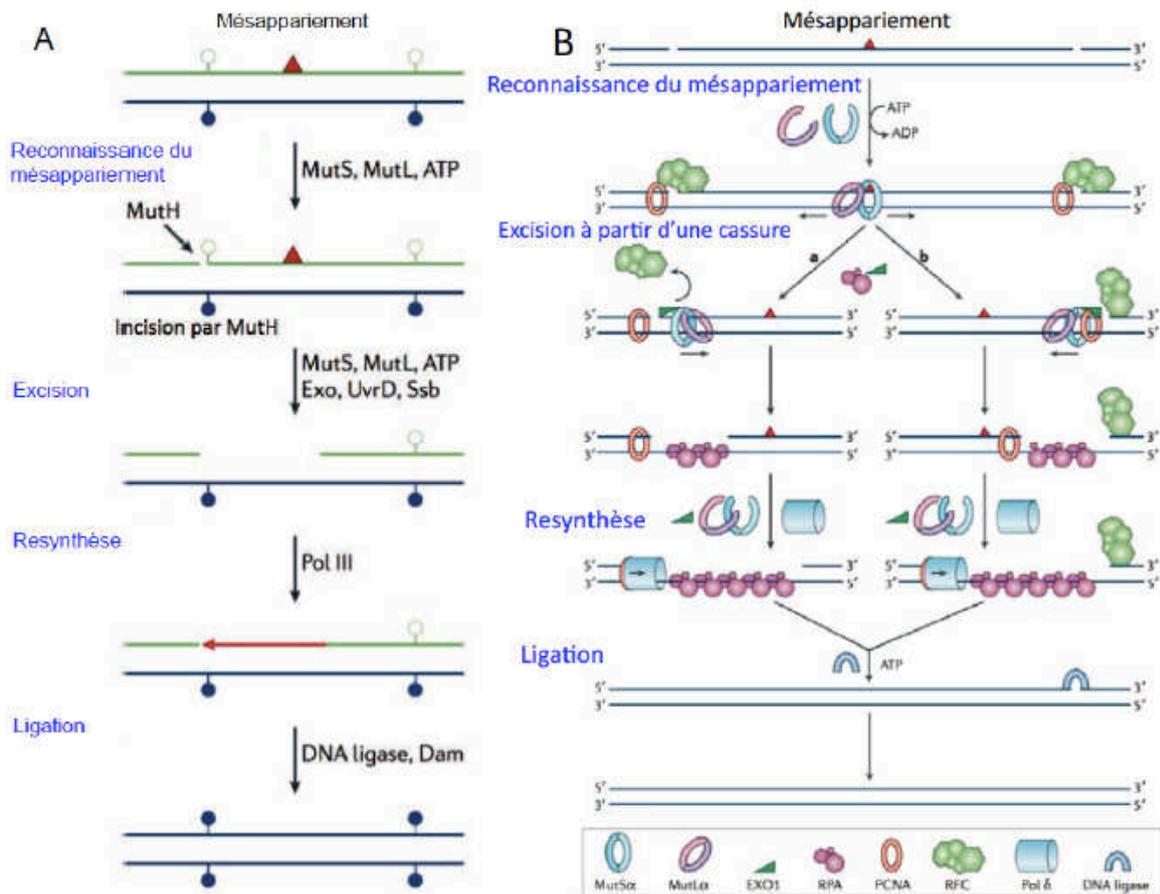


Figure 1: Le système de réparation des mésappariements de bases ou système MMR (mismatch repair), d'après Jiricny, 2006.

- (A) Chez *E. coli*, l'ADN néo-synthétisé (vert) est transitoirement non méthylé (cercles vides). Le mésappariement (triangle rouge) active le complexe MutS-MutL-ATP et l'endonucléase MuthH incise le brin d'ADN. L'hélicase UvrD, avec l'une des exonucléases, génèrent une portion d'ADN simple brin stabilisée par la protéine de liaison à l'ADN. Cette région est re-synthétisée (en rouge) par l'ADN polymérase III (Pol III) puis soudée par l'ADN ligase. Les sites de GATC sont ensuite méthylés (cercles bleus) par l'enzyme déoxyadénine méthylase (Dam).
- (B) Chez l'homme, le mésappariement active les complexes MutS α (ou MutS β) et MutL α . L'activité endonucléasique de MutL favorise le recrutement d'EXO1 (exonucléase 1), puis Pol δ (ADN polymérase delta) effectue la re-synthèse et l'ADN ligase termine le processus de réparation.

B. Rôle dans la signalisation apoptotique de certaines altérations induites de l'ADN

Le rôle du système MMR ne se limite pas à la reconnaissance des mésappariements de l'ADN ; il intervient également dans la réponse cellulaire à certains agents génotoxiques incluant entre autres, les agents alkylants et les thiopurines. Il prend en charge les adduits de l'ADN, en activant des voies de signalisation conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire ou à la mort cellulaire. L'inactivation du système MMR conduit à un phénotype de tolérance cellulaire vis-à-vis de certains agents génotoxiques et permet ainsi la survie cellulaire

1. Altérations de l'ADN liées à la méthylation

a. Composés générant des lésions de méthylation de l'ADN

Les composés méthylants (ou alkylants) favorisent la méthylation (Shen et al. 2005), avec un ajout d'un groupement éthyl ou méthyl sur une base de l'ADN, conduisant à la formation d'une base modifiée [Figure 2] (Pourquier 2011).

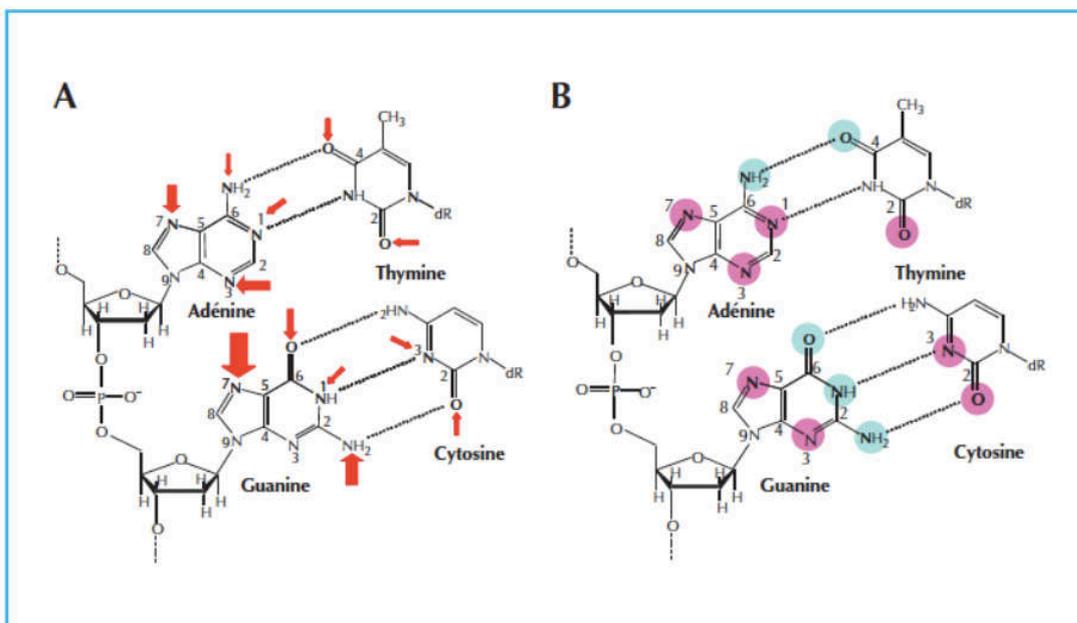


Figure 2: Alkylation (méthylation) des bases de l'ADN, d'après Pourquier, 2011

- (A) Les différents groupements des bases de l'ADN ciblés par l'alkylation. La taille des flèches est proportionnelle à la fréquence de l'alkylation par les agents classiques.
- (B) Stabilité des produits d'alkylation formés au niveau de chaque groupement de l'ADN. Bleu: adduits chimiquement stables; Rose: adduits chimiquement instables.

Les principaux composés alkylants auxquels l'homme est exposé sont les composés nitroso, ou NOC selon le terme anglosaxon (*N-nitroso Compounds*) [Figure 3] qui engendrent des lésions de méthylation de l'ADN, qui peuvent se situer :

- sur des atomes d'azote (N):

Ces lésions sont les plus fréquentes (environ 75 à 80% des lésions induites), elles sont très cytotoxiques mais ne sont pas mutagènes ; les bases modifiées sont notamment N1-Me-A, N3-Me-A ou N7-Me-G

- sur des atomes d'oxygène (O)

Ces lésions sont moins fréquentes, elles sont aussi cytotoxiques mais sont plus stables et plus mutagènes

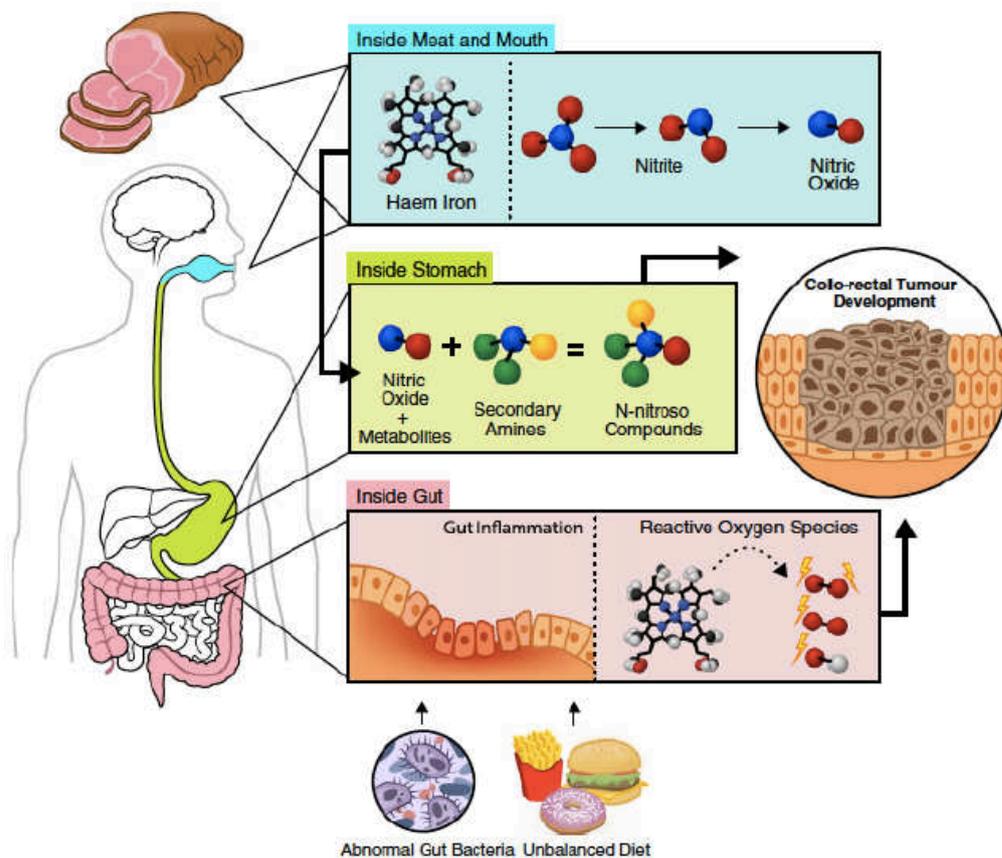


Figure 3: Risque de cancer colorectal associé à une consommation excessive de viande rouge et transformée, d'après Oostindjer 2014

Les nitrates et nitrites présents dans la viande sont métabolisés en oxydes d'azote, qui réagissent à leur tour avec les amines secondaires dans l'estomac et forment les composés N-nitroso (NOC). Les NOC sont associés à une augmentation du risque de cancer colorectal.

Le fer hémique catalyse la formation des NOC dans l'estomac, et réagit par ailleurs avec les acides gras polyinsaturés dans le tube digestif, entraînant la formation de dérivés réactifs de l'oxygène, responsables de lésions de l'ADN et d'anomalies de la division cellulaire. Ces réactions sont favorisées par l'inflammation chronique qui peut elle-même être favorisée par des anomalies du microbiote intestinal et une alimentation déséquilibrée.

Les NOC sont formés dans l'estomac et le côlon au cours du métabolisme cellulaire normal (NOC d'origine endogène), au cours de la nitrosation, qui est une réaction entre un nitrite et une amine.

Certains facteurs environnementaux peuvent augmenter la formation de bases méthylées, soit directement par l'exposition à des agents méthylants, soit par l'exposition à des substrats de réactions de nitrosation, entraînant la formation de NOC, comme dans:

- Certains produits chimiques (polluants atmosphériques, produits cosmétiques)
- La fumée de cigarette
- L'alimentation riche en nitrosamines

Concernant les facteurs alimentaires, on considère que 30 à 70% des décès par cancer colorectal sont évitables et liés au régime alimentaire :

- Certains aliments contiennent des NOC en grande quantité, comme la bière, les poissons fumés, la charcuterie ou certains fromages (Lijinsky 1999).
- La consommation de viande rouge entraîne la formation de NOC.

Cela a été démontré chez l'animal mais aussi chez l'homme (Bingham et al. 1996) où l'enrichissement de l'alimentation en viande rouge augmente la concentration de NOC dans les selles et entraîne une augmentation des lésions O6MeG dans les cellules coliques (Lewin et al. 2006). Une autre étude sur modèle animal a montré que ces effets peuvent être contrés par un enrichissement de l'alimentation en calcium (Pierre et al. 2008).

La formation de NOC dans le côlon est également favorisée par l'inflammation (Kaina et al. 2007); dans le cadre d'inflammation colique chronique il est observé une augmentation de l'activité de la NO synthase qui participe à la formation de NOC après réaction avec les amines (Kimura et al. 1998 ; Hussain et al. 2000). Cela a été démontré chez la souris, grâce à un modèle d'inflammation colique (administration de dextran sulfate sodium, ou DSS, par voie orale) dans lequel une augmentation de la concentration de NOC dans les selles des souris était observée (Mirvish et al. 2003). Dans ce contexte, il existe probablement également une influence du microbiote intestinal, car les bactéries présentes dans le tube digestif interviennent dans les réactions de nitrosation.

Enfin, les agents méthylants sont à la base de nombreux traitements médicamenteux, (Ghissassi et al. 1995; Povey et al. 2007) notamment de nombreuses chimiothérapies

utilisées dans les lymphomes, les tumeurs cérébrales, les mélanomes, les sarcomes, les adénocarcinomes du pancréas ou encore les tumeurs neuroendocrines. On retrouve parmi ces agents méthylants, la Dacarbazine, le Temozolomide et la Procarbazine.

b. Prise en charge des lésions de méthylation par la MGMT

Plusieurs systèmes de réparation de l'ADN sont impliqués dans la réparation des lésions de méthylation des bases de l'ADN : le système de réparation par excision de bases et les systèmes de réparation directe (déméthylases), qui permettent un retour à l'état antérieur, par réparation de la lésion sur le brin matrice, et sont spécifiques d'une altération donnée. Le principal système de ce type chez l'homme repose sur l'action de l'O6-MéthylGuanine-MéthylTransférase (MGMT), qui a pour fonction de retirer spécifiquement les groupements méthyle situés en position O6 de la guanine (O6MeG) [Figure 4].

La base modifiée O6MeG est un produit majeur de la méthylation de l'ADN, qui possède des effets toxiques, mutagènes et carcinogènes (Pegg et al. 1995) notamment du fait d'erreurs fréquentes de la polymérase qui l'apparie avec la Thymine 10 fois plus souvent que pour une Guanine non modifiée (Spratt & Levy 1997).

Les lésions O6MeG, qui sont les plus mutagènes, ne peuvent être réparées que par la MGMT, ce qui suggère un rôle crucial de la MGMT dans l'oncogenèse liée aux agents méthylants. En réparant les lésions O6MeG, la MGMT prévient les mésappariements et mutations qui surviennent consécutivement à ces lésions lors de la réplication de l'ADN.

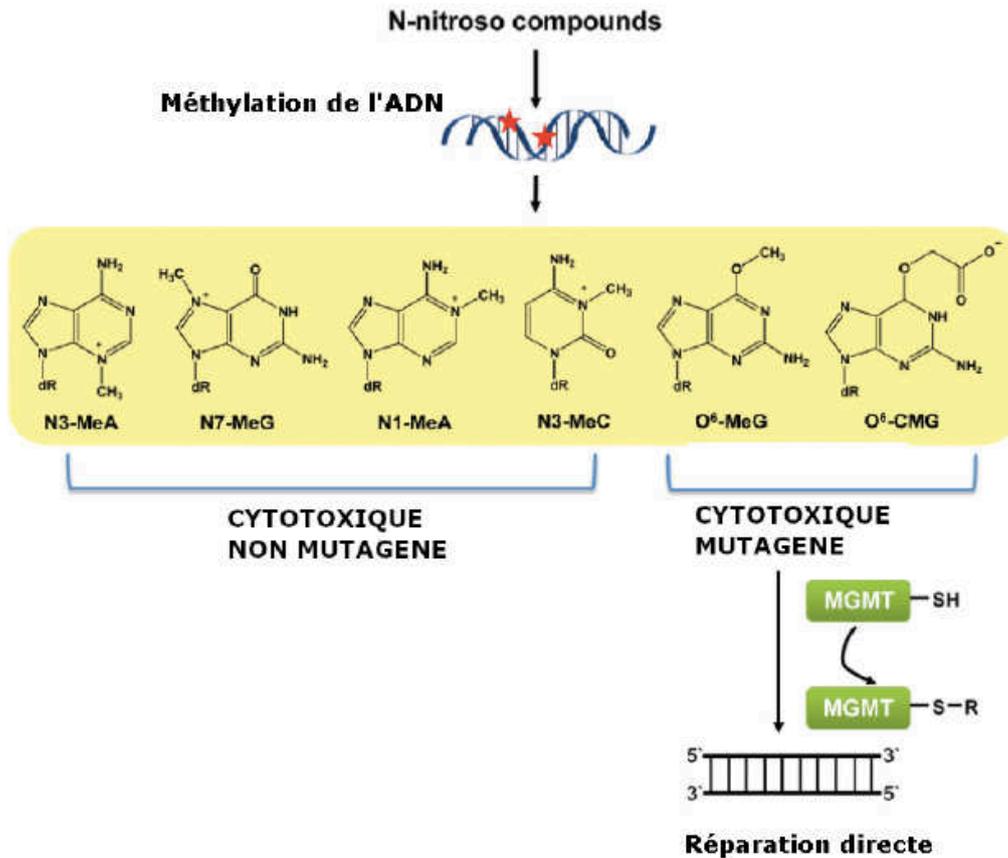


Figure 4: Réparation des lésions de méthylation de l'ADN, d'après Fahrer 2013.

Les composés N-nitroso (NOC) attaquent l'ADN au cours d'une réaction SN1, générant des bases méthylées.

Les adduits les plus fréquents sont les bases N-alkylées: N7-méthylguanine (N7-MeG) et N3-méthyladenine (N3-MeA), représentant 75% des adduits. Les adduits N1-méthyladenine (N1-MeA) et N3-méthylcytosine (N3-MeC) sont des adduits mineurs (1.5% des lésions).

Un autre adduit important est l'O6-méthylguanine O6-MeG, représentant 8% des lésions de méthylation. Seule la MGMT répare ces lésions O6-MeG, par un mécanisme de réparation directe par transfert du groupement méthyle sur une cystéine de sa portion catalytique. La MGMT peut également réparer les adduits O6-CMG.

La MGMT possède un site accepteur du groupement méthyle ; elle transfère ce groupement de l'O6MeG vers un de ses propres résidus cystéines (cystéine en position 145). Cette enzyme est ubiquitaire et possède un mode d'action singulier par rapport aux autres voies de réparation de l'ADN puisqu'elle ne nécessite aucune autre protéine ou cofacteur. La réparation d'une lésion O6MeG consomme une molécule MGMT, ce qui implique que l'activité MGMT soit directement liée à la quantité de protéine présente dans la cellule, et que dans le contexte d'un nombre de lésions très élevé, le système puisse être saturé. Le produit issu de cette réaction étant inactif elle est qualifiée d'enzyme « suicide » [Figure 5].

L'inactivation de la MGMT peut être également due à la méthylation du promoteur du gène *MGMT*, qui en empêche la traduction.

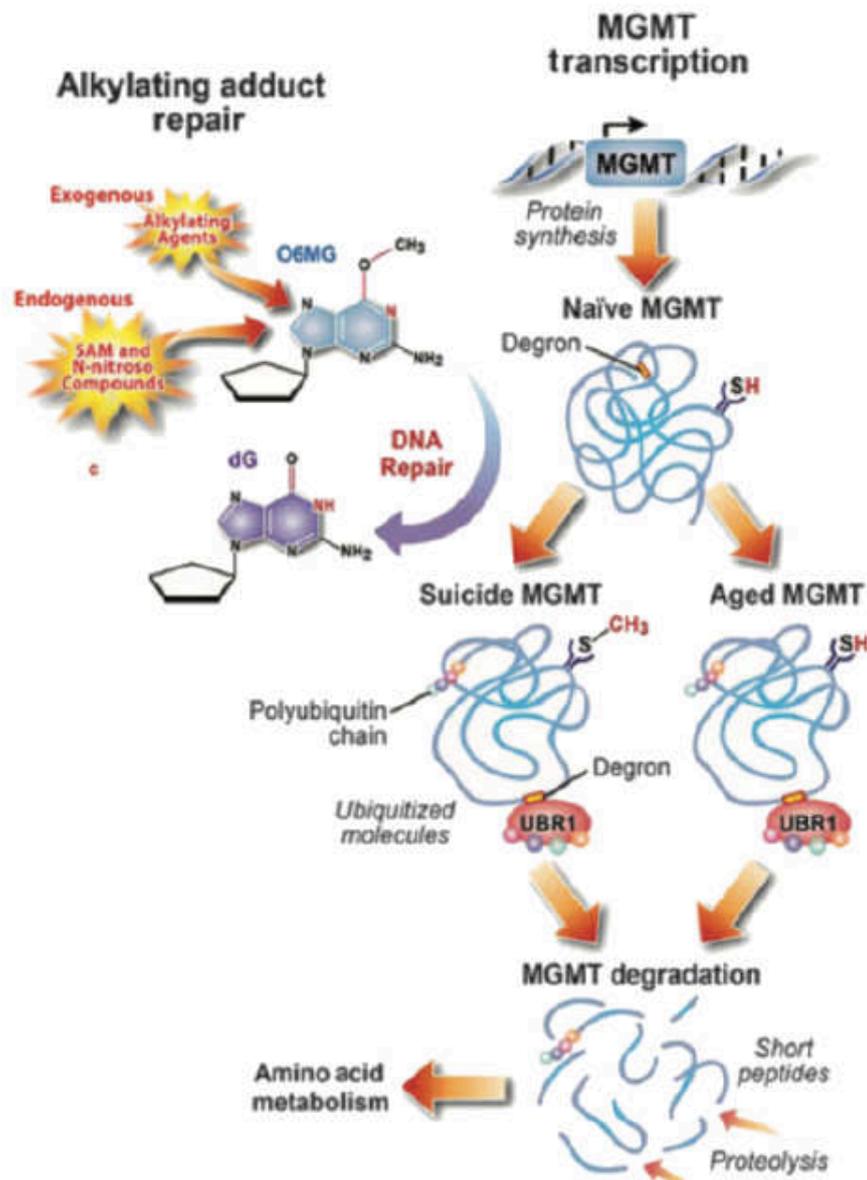


Figure 5: Action de la MGMT, d'après Leng 2015.

La MGMT répare les lésions de méthylation et agit comme une enzyme suicide. La forme inactive de la MGMT est prise en charge par UBR 1 puis dégradée.

c. Prise en charge par MMR et tolérance à la méthylation

La tolérance à la méthylation est le processus par lequel des cellules MMR-déficientes sont à même de survivre à l'accumulation de lésions de l'ADN non réparées dans un contexte de déficience en MGMT. En effet, dans une cellule MMR-proficiente, en cas de déficience de la MGMT, le système MMR prend en charge les lésions de l'ADN résultant des mésappariements générés par les lésions O6MeG (qui auraient du être réparées par la MGMT) mais il est incapable de les réparer, ce qui conduit à la mort de la cellule. Le mécanisme sous-jacent est encore discuté : il s'agit soit d'une signalisation directe par MMR, soit d'un mécanisme indirect lié à l'induction de cycles futiles de réparation (le système MMR agit uniquement sur le brin néosynthétisé, alors que les lésions sont présentes sur le brin matrice et conduisent toujours, lors de la resynthèse, aux mêmes mésappariements) entraînant des cassures simple puis double brins de l'ADN et conduisant à la mort cellulaire (Karran 2001). A l'inverse, dans une cellule MMR-déficiente, les mésappariements induits par les lésions non réparées par la MGMT ne sont pas reconnus et pris en charge, ce qui permet à la cellule de survivre, au prix d'une accumulation de mutations en transition au niveau des sites des bases modifiées, (Karran & Bignami 1992; Karran 2001; Allan & Travis 2005; Roos et al. 2007) qui peuvent aboutir à sa transformation [Figure 6].

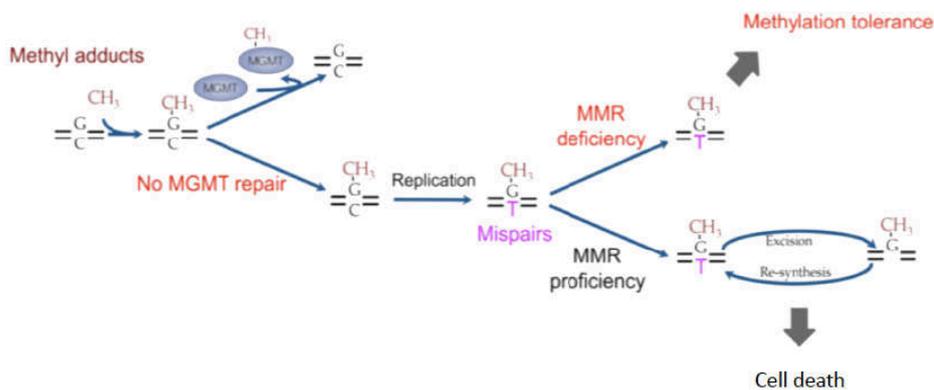


Figure 6: Tolérance à la méthylation

Lorsque les lésions de méthylation ne sont pas réparées par la MGMT, elles conduisent à des mésappariements. Si le système MMR est proficient, il prend en charge ces lésions, mais la réparation se fait sur le brin néosynthétisé, et la lésion de méthylation persiste sur le brin matrice; cela entraîne un cycle futile d'excision/resynthèse qui conduit à la mort cellulaire.

Si au contraire le système MMR est déficient, la lésion n'est pas prise en charge; la cellule échappe alors à la mort cellulaire au prix d'une mutation persistante.

Indépendamment d'une inhibition de la MGMT, les cellules MMR-déficientes sont jusqu'à 100 fois plus résistantes aux agents méthylants (AM) que les cellules MMR-proficientes (Jiricny 2006). Cela a été démontré sur des lignées cellulaires établies à partir de tumeurs MSI (*MicroSatellite Instable*) comme HCT116, LoVo, HCT15... qui sont plus résistantes aux AM tels que le MNNG ou le MNU que les lignées MMR proficientes (Branch et al, 1995; Bignami et al, 2000 ; Hsieh & Yamane, 2008). De la même façon, il a été démontré dans une culture de fibroblastes embryonnaires murins de souris *Msh2*^{+/-}, que l'exposition aux AM sélectionnait les clones ayant perdu l'allèle sauvage *Msh2*, soit par perte d'hétérozygotie, soit par mutation selon l'agent utilisé (Branch et al, 1995).

L'avantage sélectif donné aux cellules MMR déficientes par l'exposition aux AM a été démontré dans une étude récente sur des lignées cellulaires issues de cancer colorectal MMR proficientes, traitées par Temozolomide (TMZ) jusqu'à apparition de clones résistants, dont l'analyse moléculaire a montré qu'ils étaient MMR déficients. Cela a été confirmé dans la même étude par l'étude de tissu tumoral chez 5 patients traités par une chimiothérapie à base de TMZ pour un cancer colorectal métastatique. Des biopsies ont été réalisées après progression sous TMZ, et ont montré chez 2 patients une tumeur MMR déficiente avec mutation de *MSH6*, alors que la biopsie pré-thérapeutique montrait une tumeur MMR proficiente (Germano et al. 2017). Ces données montrent que la prise de TMZ peut rendre MMR déficiente une tumeur qui ne l'était pas, par le phénomène de tolérance à la méthylation.

2. Altérations de l'ADN induites par les thiopurines

a. Définition et mode d'action

Les thiopurines sont des agents analogues des bases, qui ont une structure proche des bases de l'ADN et peuvent être incorporés dans le brin-fille en remplacement de celles-ci, avec des propriétés d'appariement différentes.

Elles comprennent notamment l'azathioprine, la 6-mercaptopurine (Purinethol) et la 6-thioguanine, qui sont des pro-drogues dont les métabolites issus de l'activation (principalement la Me-6-ThioG) (Elion et al, 1960; Elion et al, 1962; Elion et al, 1963; Elion, 1972) agissent par deux modes d'action [Figure 7]:

- par incorporation dans les acides nucléiques (ADN ou ARN) dans lesquels ils exercent leur action cytotoxique par le biais de mésappariements, car la ThioG s'apparie préférentiellement avec la thymine (Abbott & Saffhill, 1979).
- par inactivation de la voie de synthèse *de novo* des purines (Bertino, 1991; Dervieux et al, 2001; Coulthard et al, 2002), notamment dans les lymphocytes où elles entraînent un arrêt de la prolifération lymphocytaire.

De ces deux modes d'action découlent les deux grandes indications thérapeutiques de ces drogues:

- en tant que chimiothérapie anticancéreuse: la première utilisation clinique des thiopurines était le traitement des leucémies aiguës chez l'enfant (Burchenal et al, 1953).
- en tant qu'immunosuppresseur, notamment dans les maladies inflammatoires intestinales chroniques (MICI), et chez les patients transplantés d'organe.

Les bases ThioG sont incorporées dans l'ADN au cours de la phase S, et donc les mésappariements ThioG:T ne peuvent survenir qu'au cours du cycle suivant (deuxième phase S). En conséquence, l'arrêt du cycle cellulaire induit par la 6-TG est retardé. Le mésappariement est reconnu par le système MMR qui tente de le réparer, mais celui-ci ne pouvant agir que sur le brin néo-synthétisé, c'est la base T du brin matrice qui est excisée et cela conduit à la mort cellulaire (Yamane et al, 2004; Mojas et al, 2007).

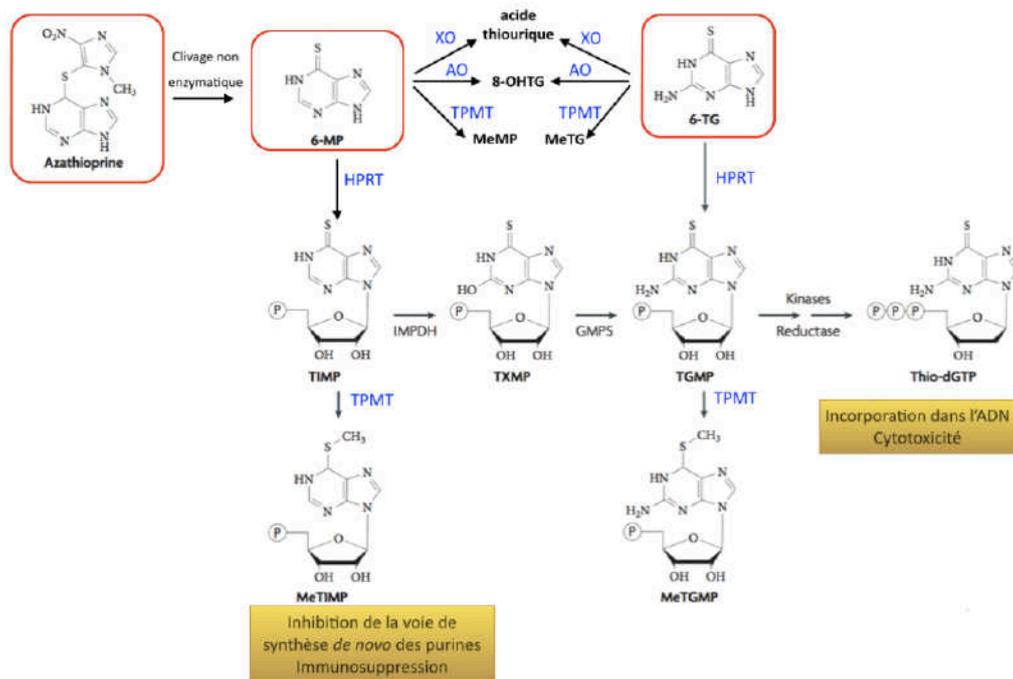


Figure 7: Mode d'action des thiopurines, d'après Karran 2008

- (A) Incorporation dans les acides nucléiques (agent analogue des bases): Action cytotoxique
- (B) Inactivation de la voie de synthèse *de novo* des purines: Action immunosuppressive

b. Prise en charge par MMR et tolérance aux thiopurines

De la même façon, en cas d'inactivation MMR, les lésions mutagènes induites par les thiopurines persistent dans l'ADN, ce qui permet aux cellules d'échapper à l'apoptose. Les lésions O6MeG sont structurellement similaires aux lésions ThioG (Swann et al. 1996; Waters & Swann 1997), et les mécanismes impliqués sont identiques (Branch et al. 1993; Mello et al. 1996; Fishel 1999; Moreland et al. 1999; Kaina et al. 2007).

Les cellules déficientes pour le système MMR sont plus tolérantes à la 6-TG que les cellules MMR proficientes environ d'un facteur 10 (Stojic et al, 2004a). Le rôle du système MMR dans la cytotoxicité induite par les thiopurines a été mis en évidence *in vitro*, notamment dans les cellules souches issues de souris *Msh2^{ko}* résistantes à la 6-TG (Berry et al, 2000; Borgdorff et al, 2005). L'exposition de cellules souches embryonnaires *Msh2^{+/-}* à la 6-TG conduit à la sélection de clones résistants qui dans la majorité des cas ont perdu l'allèle sauvage (Borgdorff et al, 2005). Par ailleurs, les lignées cancéreuses MMR déficientes (HEC59 *MSH2^{ko}* et HCT116 *MLH1^{ko}*) sont également résistantes à la 6-TG.

Un modèle murin a été mis au point dans notre équipe et a montré que l'exposition de souris *Msh2*^{+/-} à l'Azathioprine induisait massivement des lymphomes MSI, surtout à des doses élevées (Chalastanis et al. 2010; Bodo et al. 2015).

Cet avantage sélectif donné aux cellules MMR-déficientes a également été décrit chez l'homme avec les thiopurines qui seraient impliquées dans l'apparition de tumeurs MSI iatrogènes (Offman et al, 2004).

II. Cancer colorectal MSI

A. Déficience du système MMR

L'oncogenèse MSI (*MicroSatellite Instable*) est une conséquence directe de la déficience du système MMR qui entraîne l'accumulation d'altérations dans les séquences microsatellites. Ces séquences sont des répétitions en tandem d'un motif de 1 à 6 bases réparties dans le génome, le plus souvent dans les régions non codantes, mais aussi parfois dans les régions codantes ; elles représentent 3% du génome (Ellegren 2004). Du fait de leur caractère répété, ces séquences sont sujettes à de fréquentes erreurs de réplication, par glissement de l'ADN polymérase (Jiricny 2006). Le produit de la réplication de ces séquences contient alors des erreurs du nombre de répétitions, par insertion ou délétion, et aboutit à la production de microsatellites de longueurs différentes, dits instables, et donc à un phénotype MSI; si le microsatellite est situé dans une région codante cela est susceptible d'altérer la fonction d'un gène, en entraînant un décalage du cadre de lecture conduisant à la production d'une protéine tronquée, avec une extrémité C-terminale aberrante (Linnebacher et al. 2001).

L'inactivation du système MMR dans les cellules tumorales résulte de l'inactivation bi allélique d'un de ses principaux gènes, notamment *MLH1* ou *MSH2*, ou plus rarement *MSH6* ou *PMS2* (Fishel et al. 1993; Bronner et al. 1994; Nicolaidis et al. 1994; Akiyama et al. 1997) :

- soit par une inactivation germinale d'un allèle par une mutation, suivie d'une inactivation somatique du 2^{ème} allèle (dans le cadre d'un syndrome de prédisposition génétique)
- soit par une inactivation somatique des 2 allèles (dans le cadre d'une tumeur sporadique), le mécanisme étant dans l'immense majorité des cas une

modification épigénétique touchant le promoteur du gène *MLH1* (Kane et al. 1997; Veigl et al. 1998).

Les séquences microsatellites sont majoritairement situées dans des régions non codantes du génome, pour lesquelles le phénotype instable sert au diagnostic phénotypique mais n'a pas de conséquences fonctionnelles au niveau cellulaire. En revanche, si des mutations (insertions ou délétions de nucléotides) atteignent les régions codantes microsatellitaires (cMS, *Coding MicroSatellites*), cela peut aboutir à une altération fonctionnelle des protéines (Furlan et al. 2002; Woerner et al. 2006).

La déficience du système MMR n'est pas en soi un évènement transformant, mais du fait de l'instabilité microsatellitaire, l'accumulation de mutations secondaires affectant des gènes impliqués dans l'oncogenèse favorise la transformation et la sélection des clones MMR-déficients. Ces mutations peuvent affecter des gènes impliqués dans des processus biologiques divers (Yamamoto & Imai 2015; Kondelin et al. 2017), tels que la régulation du cycle cellulaire, de la prolifération cellulaire, de l'apoptose, ou la réparation des altérations de l'ADN.

B. Classifications des cancers colorectaux

1. Familles phénotypiques de cancers colorectaux

Sur le plan histologique, les cancers colorectaux (CCR) sont en très grande majorité des adénocarcinomes, dont on distingue trois grandes familles, résultant de trois mécanismes différents de la cancérogenèse :

- CCR avec instabilité chromosomique (CIN : *Chromosomal Instability*)

Ce phénotype concerne environ 80% des CCR, et est caractérisé par des pertes chromosomiques (LOH : Loss Of Heterozygoty) notamment sur le bras court des chromosomes 17 et 8 et sur le bras long des chromosomes 18, 5 et 22. Les CCR CIN+ présentent des mutations fréquentes des gènes suppresseurs de tumeurs (*RAS*, *TP53*, *APC*).

- CCR avec instabilité nucléotidique ou microsatellitaire (MSI: *MicroSatellite Instable*)

Ce phénotype concerne environ 12 à 15 % des CCR. Les CCR MSI présentent des mutations fréquentes de BAX, de la β -caténine, de TGF β R2 et de BRAF.

- **CCR avec instabilité épigénétique (CIMP: CpG Island Methylator Phenotype).**

Les modifications épigénétiques sont définies comme des mécanismes qui modulent l'expression des gènes sans en affecter la séquence nucléotidique (Wolffe & Matzke 1999). Les trois principaux phénomènes épigénétiques sont l'hypoacétylation et la méthylation des histones (modification de la conformation de la chromatine) et la méthylation de l'ADN lui-même (Nakao 2001). La méthylation de l'ADN correspond à l'ajout d'un groupement méthyl (CH₃) sur le carbone 5 d'une cytosine, aboutissant à la présence d'une base modifiée appelée 5-méthyl-cytosine et à une modification de la structure moléculaire de l'ADN. La méthylation est effectuée par une ADN méthyl-transférase (DNMT), majoritairement au niveau de dinucléotides CpG. Ces dinucléotides sont parfois regroupés au sein de régions riches en CpG, appelées îlots CpG (définis comme composés à plus de 50% de GC) et situées essentiellement au niveau des séquences promotrices des gènes. L'hyperméthylation de ces séquences inhibe l'expression du gène en question, alors que l'absence de méthylation permet la transcription ; ce phénomène est donc impliqué dans la régulation d'expression « tissu-spécifique » de certains gènes. La méthylation de l'ADN est réversible par l'action d'une déméthylase (Bhattacharya et al. 1999), et héritable (Goel et al. 2010).

Le phénotype CIMP est caractérisé par une hyperméthylation de l'ADN au niveau de certaines régions promotrices des gènes, les îlots CpG (CIMP : CpG Island Methylation Phenotype) induisant une inactivation transcriptionnelle de gènes suppresseurs de tumeur. Cette dernière catégorie n'est pas totalement exclusive par rapport aux 2 autres dans la mesure où les CCR CIMP+ peuvent présenter également un phénotype MSI ou CIN+.

2. Classification moléculaire CMS

Un groupe international d'experts a récemment défini une nouvelle classification dénommée CMS (*Consensus Molecular System*), qui a permis d'uniformiser les différentes classifications moléculaires existantes (Guinney et al. 2015).

Cette classification distingue 4 groupes de CCR [Figure 8]:

- Groupe CMS-1 (MSI, Immune) : environ 13%
 - Phénotype : MSI, infiltration lymphocytaire marquée, CIMP high (CpG Island Methylator Phenotype)

- Mutations souvent identifiées: BRAF
- Clinique : souvent côlon droit, bon pronostic au stade localisé mais mauvais en situation métastatique
- Groupe CMS-2 (Canonical) : environ 35 %
 - Phénotype : MSS (*MicroSatellite Stable*), SCNA high (Somatic Copy Number Alteration)
 - Mutations souvent identifiées : surexpression de l'EGFR, activation de la voie Wnt/MYC
 - Clinique : souvent côlon gauche, pronostic intermédiaire
- Groupe CMS-3 (Metabolic) : environ 11 %
 - Phénotype : épithélial, le plus souvent MSS, SCNA low, CIMP low
 - Mutations souvent identifiées : RAS
 - Clinique : pas de localisation préférentielle, pronostic intermédiaire.
- Groupe CMS-4 (Mesenchymal) : environ 20 %
 - Phénotype : MSS, SCNA high
 - Mutations souvent identifiées : activation fréquente du TGFβ et de l'angiogenèse
 - Clinique : souvent côlon gauche, mauvais pronostic en situation métastatique.

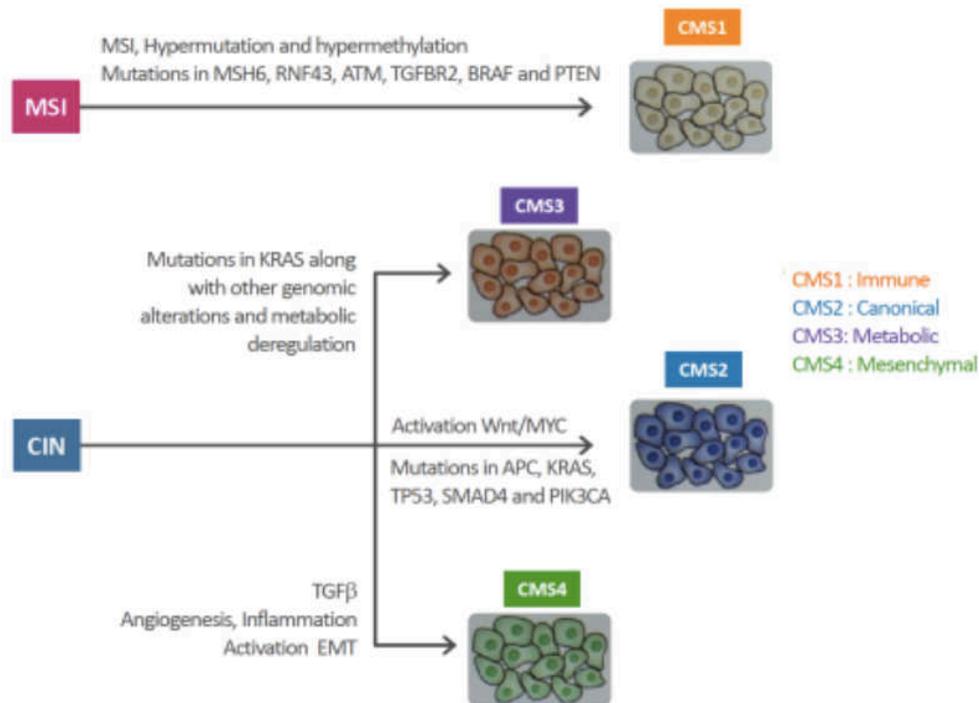


Figure 8: Classification CMS des cancers colorectaux, d'après Stintzing, 2017

C. Particularités du CCR MSI

1. Caractéristiques clinico-pathologiques

Sur le plan clinique, les CCR de phénotype MSI sont le plus souvent localisés dans le côlon proximal. En ce qui concerne le pronostic, de nombreuses études rétrospectives (Thibodeau et al. 1993; Halling et al. 1999; Gryfe et al. 2000; Samowitz et al. 2001) ont rapporté des survies prolongées chez les patients ayant un CCR MSI. Deux études comparatives ont montré que les patients ayant un CCR MSI présentent une meilleure survie globale (SG) que ceux ayant un CCR MSS ($p = 0,004$) (Ribic et al. 2003; Sargent et al. 2010) et ces données ont été confirmées par une méta-analyse basée sur les données regroupées de 31 études publiées (avec un total de 7 642 patients tous stades confondus, dont 1 277 MSI), qui a démontré une réduction de 35% du risque de décès chez les patients MSI-H par rapport aux patients MSI-L ou MSS (Popat et al. 2005). Les résultats à long terme de l'étude MOSAIC évaluant l'effet de la chimiothérapie adjuvante dans les cancers colorectaux a

également montré que le statut MSI était un facteur prédictif indépendant d'une meilleure survie globale (HR=2,02; 95% CI [1,15-3,55] ; p=0,014) (Andre et al. 2015).

Sur le plan histologique, ils présentent souvent un faible degré de différenciation et sont souvent mucineux ou en bague à chaton. Les CCR MSI ont par ailleurs un phénotype immunitaire particulier, avec un infiltrat lymphocytaire important, et un aspect parfois qualifié de "Crohn like" (Xiao et al. 2013; Sargent et al. 2014). Cet aspect immunitaire est une piste qui pourrait expliquer le meilleur pronostic associé aux CCR MSI (Pagès et al. 2005).

2. Mutations induites par l'inactivation du système MMR

Les mutations surviennent de façon aléatoire dans le génome, et plus fréquemment dans les « *hotspots* » que sont les séquences répétées. La fréquence mutationnelle observée au niveau de différentes séquences microsatellitaires est très variable (même pour des microsatellites de longueur similaire), ce qui suggère une sélection des mutations frameshift pro-tumorales durant la carcinogenèse et la progression des CCR MSI (Duval et al. 2001). Selon le gène dans lequel elles surviennent, leur rôle peut être :

- Bénéfique pour la cellule tumorale, c'est le modèle classique d'oncogenèse de sélection positive
- Délétaire pour la cellule tumorale, c'est ce qu'on appelle la sélection négative dont le rôle est plus difficile à mettre en évidence, la plupart de ces mutations délétères n'étant jamais identifiées dans les tumeurs car elles sont létales.

Un exemple de mutation délétère retrouvé dans les tumeurs MSI est la mutation de HSP110. Cette protéine appartient à la famille *Heat Shock Protein*, il s'agit d'une protéine chaperonne qui prend en charge en conditions physiologiques des protéines néo-synthétisées et participe à des modifications post-transcriptionnelles, au transport sub-cellulaire, au repliement protéique ou encore à certaines voies de signalisation. L'expression de HSP110 peut être induite par certaines conditions de stress au sein de la cellule, et elle joue alors un rôle dans l'inhibition de l'apoptose (Macario & Conway de Macario 2005; Lanneau et al. 2008). Chez les patients atteints de cancer colorectal, la surexpression de HSP110 est classiquement

associée à un mauvais pronostic (Slaby et al. 2009). Cependant, dans les cancers colorectaux MSI une étude de notre équipe a mis en évidence la mutation systématique d'une séquence répétée de *HSP110* (T17 dans l'intron 8), qui aboutit à un transcrit mutant HSP110ΔE9, dont l'expression altère les fonctions anti-apoptotique de HSP110 (Dorard et al. 2011). L'expression de HSP110ΔE9 est associée à un meilleur pronostic et une meilleure réponse à la chimiothérapie (Collura et al. 2014).

Les mutations peuvent survenir dans des séquences non répétées (NR), ce sont alors surtout des mutations par substitution, avec essentiellement des mutations sélectionnées positivement (par exemple la mutation BRAF V600E). Elles surviennent cependant surtout dans des séquences répétées (R), plus fréquemment dans des régions codantes, et sont alors principalement des délétions/insertions de 1bp (ou plus rarement 2), avec décalage du cadre de lecture, dont la fréquence dépend de :

- La longueur de la séquence (100% si >14)
- La composition de la séquence (plus fréquent sur GC que sur AT)

Une étude récente de notre équipe (Jonchere et al. 2018) a étudié des CCR MSI par une analyse d'exome; les séquences R représentaient 3% des séquences analysées, réparties dans les régions introniques (56%), exoniques codantes (19%) et UTR (25%). Les mutations somatiques identifiées étaient situées pour 60% dans les séquences R, et 40% dans les séquences NR, ce qui correspond à une fréquence beaucoup plus importante (x24) étant donné la faible proportion de séquences R analysées. A partir de cette analyse, les auteurs ont développé un modèle fonctionnel bâti sur la probabilité de survenue de mutation dans une séquence donnée, et ont décrit ainsi 3 catégories de mutations : les mutations sélectionnées positivement (taux observé supérieur au taux prédit), les mutations sélectionnées négativement (taux observé inférieur au taux prédit), et les mutations neutres. Au total 1050 mutations sélectionnées positivement ont été identifiées (dont 222 dans les régions codantes), ce qui est cohérent avec le rôle pro oncogénique de mutations précédemment décrites dans les CCR MSI, comme celles de TGFβR2 (prolifération cellulaire) dont la séquence A10 est retrouvée mutée dans plus de 90% des tumeurs colorectales MSI (Markowitz & Roberts 1996), de ACVR2 (transduction du signal), ou de BAX (pro-apoptotique) (Ionov et al. 2000; Duval & Hamelin 2002; Hempen et al. 2003). En ce qui concerne les mutations sélectionnées négativement, 561 mutations ont été identifiées (dont

13 dans régions codantes). Elles surviennent uniquement dans des séquences longues (>9) qui sont essentiellement situées dans les UTR, ce qui explique la faible proportion observée dans les régions codantes. Ces mutations ont un effet pronostique négatif, avec une diminution de la survie (HR 3, p=0.03).

3. Implications thérapeutiques

Les CCR MSI répondent différemment des CCR MSS aux thérapies anticancéreuses. La détermination du statut MSI est donc un élément indispensable à la décision thérapeutique collégiale.

a. Chimiothérapie

Indépendamment du statut MMR, les recommandations concernant la réalisation d'une chimiothérapie adjuvante après une résection chirurgicale d'un CCR reposent sur le stade de la tumeur ; l'indication est retenue en cas de stade III (avec métastase ganglionnaire), ou de stade II (sans métastase ganglionnaire) en cas de facteurs de risque de récurrence (Stades II « à haut risque »), soit :

- Critères cliniques
 - Tumeur perforée
 - Tumeur révélée par une occlusion
- Critères anatomopathologiques
 - Tumeur T4
 - Présence d'embols vasculaires ou lymphatiques
 - Présence d'engainements périnerveux
 - Phénomène de « budding » (bourgeonnement tumoral au front d'invasion)

Le caractère MSI d'un CCR lui confère un pronostic favorable, et constitue un facteur prédictif de non réponse à une chimiothérapie par 5-FU. Plusieurs méta-analyses ont montré que comparativement à une simple surveillance postopératoire, un traitement par 5-FU n'apportait pas de bénéfice, voire s'accompagnait d'une moins bonne survie globale. Les données américaines de la base ACCENT (7803 patients) ont confirmé ces résultats pour les

CCR stade II, (Sargent et al. 2014) ne montrant aucun impact positif ou délétère, mais il existait un effet positif significatif pour les stades III. Ces résultats justifient des recommandations spécifiques aux CCR MSI quant à la réalisation d'une chimiothérapie adjuvante, qui est indiquée dans les stades III mais pas dans les stades II quels que soient les facteurs de risque.

Plusieurs hypothèses ont été évoquées pour expliquer la résistance des CCR MSI à la chimiothérapie. Une de ces hypothèses est que l'effet immunosuppresseur de la chimiothérapie diminuerait la réponse immunitaire spontanée contre la tumeur, et péjorerait ainsi le pronostic de patients ayant une tumeur de bon pronostic du fait du contexte immunogène. Une autre hypothèse, spécifique au 5-FU, serait une diminution de l'effet cytotoxique par l'absence d'accumulation intracellulaire de la drogue qui se produit habituellement lors de la réparation par le système MMR de l'ADN lésé par le 5-FU. Cette hypothèse a été étayée par la démonstration *in vitro* d'une diminution de la résistance au 5-FU de cellules de CCR MSI par hyperméthylation du promoteur traitées par l'ajout d'agents déméthylants (Arnold et al. 2003).

En ce qui concerne les autres drogues de chimiothérapie, l'étude MOSAIC a montré qu'une bi-chimiothérapie par 5-FU et oxaliplatine donne de meilleurs résultats dans les CCR MSI qu'une chimiothérapie par 5FU ; c'est donc cette bi-chimiothérapie qui est retenue pour la chimiothérapie adjuvante pour les stades III (Andre et al. 2015). L'effet des autres chimiothérapies couramment utilisées dans le CCR métastatique, comme l'Irinotécan ou les thérapies ciblées (Bevacizumab, Cetuximab) est en revanche plus controversé avec des résultats contradictoires (Klingbiel et al. 2014; S. T. Kim et al. 2017; S. T. Kim et al. 2018; Bendardaf et al. 2018).

b. Immunothérapie

Les tumeurs MSI présentent un fort infiltrat lymphocytaire, notamment CD3+ et CD8+, et sont associées à une plus forte réponse immunitaire que les tumeurs MSS (Lothe et al. 1993; H. Kim et al. 1994; Smyrk et al. 2001). Cela peut s'expliquer par le fait que ces tumeurs sont hypermutées et présentent 20 fois plus de mutations immunogènes que les tumeurs MSS. Le processus oncogénique MSI génère dans les cellules tumorales de

nombreux peptides présentant une extrémité C-terminale aberrante aux propriétés néo-antigéniques. Ces néoantigènes sont susceptibles d'être à l'origine du déclenchement d'une réponse immunitaire spécifique de l'hôte contre les cellules tumorales MSI (Saeterdal et al. 2001; Saeterdal et al. 2001; Schwitalle et al. 2008).

Cependant, ces mutations peuvent aussi concerner les points de contrôle immunitaires (Immune Checkpoints, ICK) impliqués dans la réponse immunitaire antitumorale ; les tumeurs MSI surexpriment par exemple fortement PD-1 (77% vs 39% par rapport à des tumeurs MSS) et PDL-1 (32% vs 13%), ou encore CTLA-4 (Gatalica et al. 2014). PD-1 et son ligand PDL-1 sont impliqués dans la phase effectrice de la réponse immunitaire (régulation négative de l'action cytotoxique des lymphocytes vis à vis de la tumeur) ; CTLA-4 est lui impliqué dans la phase activatrice (signal inhibiteur du recrutement des lymphocytes par les cellules dendritiques) [Figure 9].

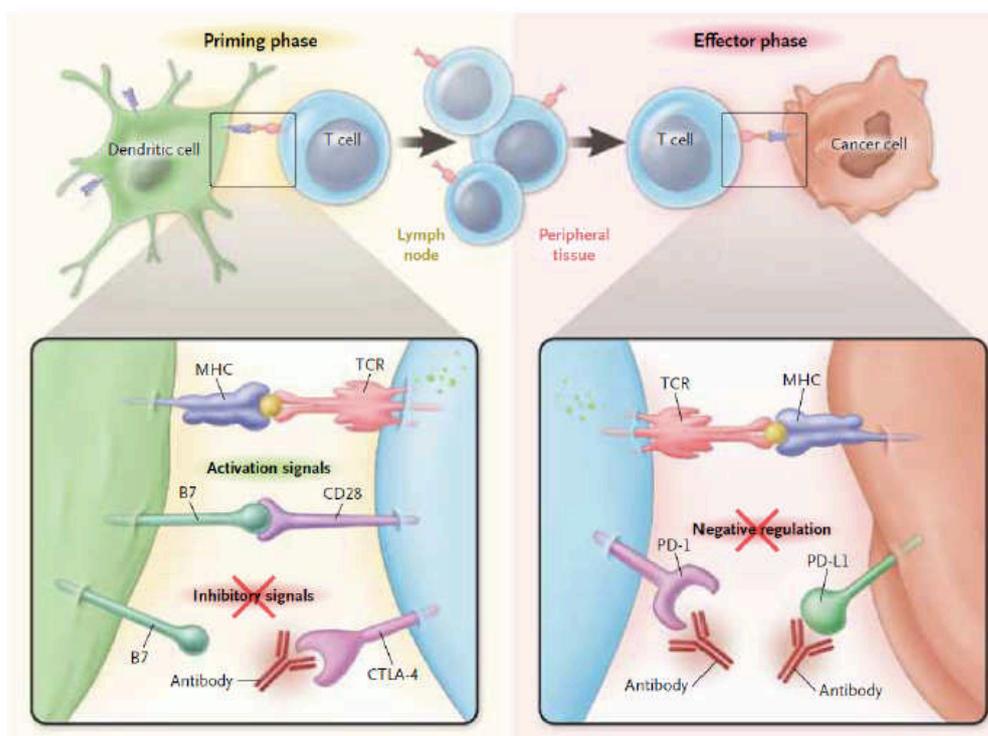


Figure 9: Immunothérapie anti-tumorale et inhibition de PD-1, PD-L1 ou CTLA-4, d'après Ribas 2012
 Les cellules T reconnaissent les antigènes présentés par le CMH à la surface des cellules tumorales *via* leur TCR. Le second signal apporté par la molécule de co-stimulation B7 est nécessaire à l'activation lymphocytaire. La molécule CTLA-4 est rapidement surexprimée par les cellules T après leur activation et induit une régulation négative de celles-ci en se liant aux molécules de co-stimulation B7 exprimées par les cellules présentatrices d'antigènes qui induisent un signal activateur ou inhibiteur selon qu'elles se lient à CD28 ou à CTLA-4 (encadré de gauche). Le récepteur inhibiteur PD-1 est exprimé par les cellules T en cas d'expositions antigéniques prolongées et induit une régulation négative lors de sa fixation à ses ligands PD-L1 et PD-L2 qui sont exprimés dans le microenvironnement tumoral ; cette interaction PD-1/PD-L1(-L2) a lieu durant la phase effectrice de la cellule T, dans les tissus périphériques (encadré de droite).

La surexpression de ces ICK contrebalance l'activité antitumorale caractéristique de leur environnement, et provoque un échappement tumoral immunitaire qui annule l'impact pronostique positif lié à l'infiltrat inflammatoire comme cela a été démontré dans une étude récente de notre équipe qui a proposé un nouveau modèle pronostique pour les cancers colorectaux [Figure 10] (Marisa et al. 2018).

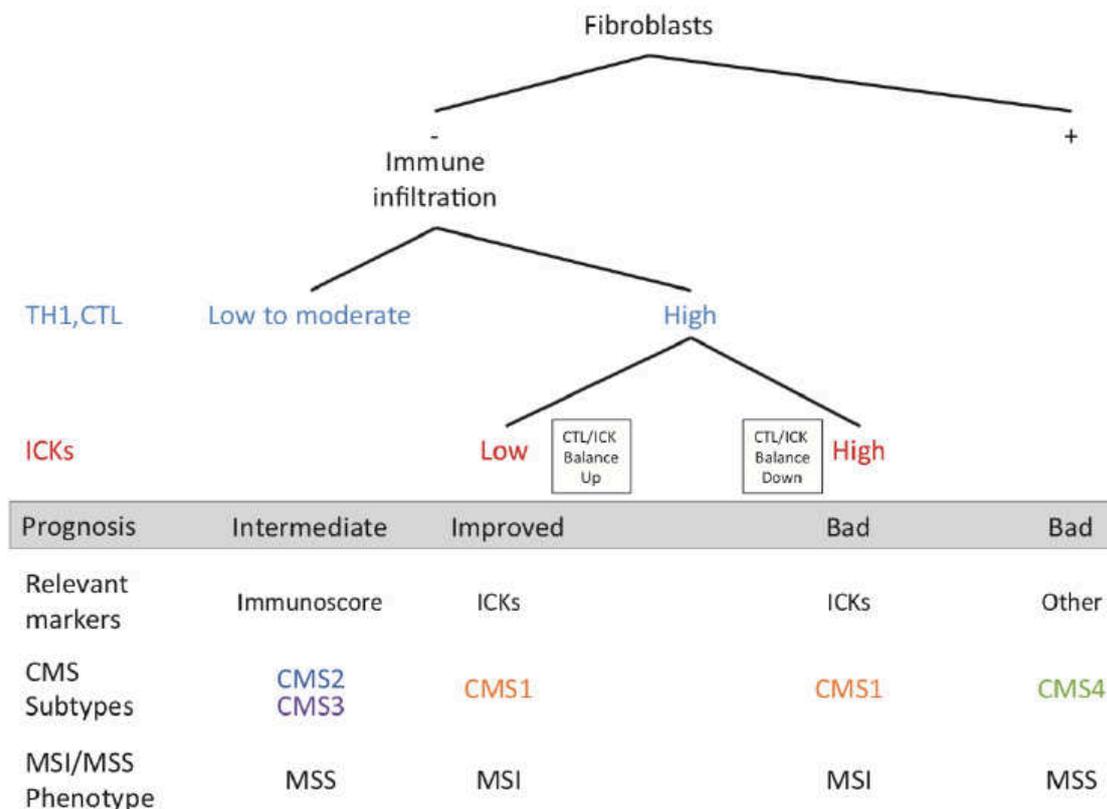


Figure 10: Modèle immunitaire pour le pronostic des cancers colorectaux, d'après Marisa 2018
 Arbre décisionnel basé sur trois critères: présence de fibroblastes, infiltration immunitaire, points de contrôle immunitaires.
 CMS: Consensus Molecular Subgroups; CTL: cytotoxic T lymphocytes; ICK: immune checkpoint genes; High: high expression level; MSI: microsatellite instable; MSS: microsatellite stable.

Ce contexte a incité à des essais thérapeutiques afin d'évaluer l'effet de drogues d'immunothérapie ciblant les ICK (immunothérapie adoptive), utilisées habituellement dans le traitement du cancer du poumon ou du mélanome. Une 1^{ère} étude a évalué l'effet d'un antiPD-1 (Pembrolizumab) chez 3 groupes de patients (CCR MSI, non CCR MSI et CCR MSS), et a montré un excellent taux de réponse dans les CCR MSI (de 40% à la 1^{ère} évaluation à 78% à 20 semaines) (Diaz & Le 2015). Une autre étude évaluant un autre anti PD1

(Nivolumab) a montré des résultats similaires (Overman et al. 2017), qu'il soit utilisé seul ou en association avec l'Ipilimumab (anti-CTLA4) ; les effets sont de plus durables dans le temps, et associés à une amélioration de la qualité de vie.

Cette grande efficacité clinique des inhibiteurs d'ICK a d'ailleurs conduit pour la première fois à une approbation accélérée par la FDA (*Food and Drug Administration*) nord-américaine, retenant une indication thérapeutique non plus tissu-spécifique mais biomarqueur-spécifique, pour toute tumeur MSI (Boyiadzis et al. 2018).

L'effet bénéfique de l'immunothérapie n'est pas retrouvé dans les CCR MSS (Topalian et al. 2012) mais plusieurs essais sont en cours pour l'évaluer dans un contexte de maladie métastatique réfractaire à la chimiothérapie classique.

D. Détermination du statut MSI

Le phénotype MSI des tumeurs peut être déterminé de deux façons : soit en immunohistochimie, en étudiant l'expression des protéines du système MMR, soit en biologie moléculaire, en étudiant le degré d'instabilité de différents marqueurs microsatellites.

1. En immunohistochimie

L'immunohistochimie (IHC) permet de déterminer indirectement le phénotype MSI en mettant en évidence l'absence d'expression d'un des gènes du système MMR dans la cellule tumorale (Jourdan et al. 2003) ; on parle alors de tumeur MMR déficiente (dMMR) en cas de perte d'expression ou proficiente (pMMR) si l'expression est conservée.

Cette technique permet de déterminer l'expression des protéines grâce à des anticorps dirigés spécifiquement contre des antigènes (ou séquences peptidiques) présents sur une protéine donnée. Les altérations des gènes MMR peuvent conduire à une perte de l'expression de la protéine, par la synthèse d'une protéine tronquée.

La détermination du statut MSI des tumeurs par IHC sur coupes tissulaires est réalisée en comparant l'expression des 4 principales protéines du système MMR (MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2) dans le tissu tumoral et dans la muqueuse saine environnante [Figure 11]. Cette analyse nécessite la présence d'au moins un témoin interne positif sur la lame étudiée, afin d'affirmer que l'absence de marquage des cellules tumorales est bien dû à la perte d'expression de la protéine, et non à un défaut technique. Ces témoins, qui doivent être marqués, sont les lymphocytes du stroma tumoral et les cellules de la muqueuse non tumorale environnante.

Certains auteurs suggèrent que l'analyse de PMS2 et MSH6 serait suffisante (Shia et al. 2009). On observe en effet dans la majorité des cas des extinctions conjointes : une perte d'expression de MLH1 est quasiment toujours associée à une perte d'expression de PMS2, et une perte d'expression de MSH2 quasiment toujours associée à une perte d'expression de MSH6. Cela est lié au fonctionnement en complexes d'hétérodimères : en l'absence d'une des 2 protéines, le complexe ne fonctionne plus et l'autre protéine est également éteinte. Cela n'est en revanche pas le cas en cas d'absence d'expression de PMS2 ou de MSH6, dont la perte d'expression en IHC est le plus souvent isolée en raison de la redondance des deux protéines principales MLH1 et MSH2 qui sont impliquées dans d'autres complexes (cf. paragraphe IA2 de ce manuscrit sur le fonctionnement des différents complexes MMR) et sont donc toujours exprimées en l'absence de leur binôme. L'interprétation de l'IHC PMS2 et MSH6 est cependant parfois difficile, et la plupart des équipes en France réalisent systématiquement l'analyse des 4 protéines en IHC. L'approche à deux anticorps a d'ailleurs été récemment remise en cause par une publication Nord-Américaine qui a montré qu'un tiers des cas ayant une perte d'expression de MSH2 pouvait être méconnue par l'IHC MSH6 (Pearlman et al. 2018).

L'IHC est une méthode qui présente de nombreux avantages : elle est facile à mettre en place, rapide, peu onéreuse, et peut être utilisée en routine. Elle permet par ailleurs de « cibler » le gène MMR en cause et, le cas échéant de rechercher une mutation constitutionnelle sur ce gène. C'est une technique fiable, avec 92% de sensibilité (Shia 2008) ; des faux négatifs peuvent être observés avec cette technique notamment si la mutation du gène MMR ne conduit pas à la synthèse d'une protéine tronquée (mutation non sens), mais à la synthèse d'une protéine non fonctionnelle (mutation faux sens).

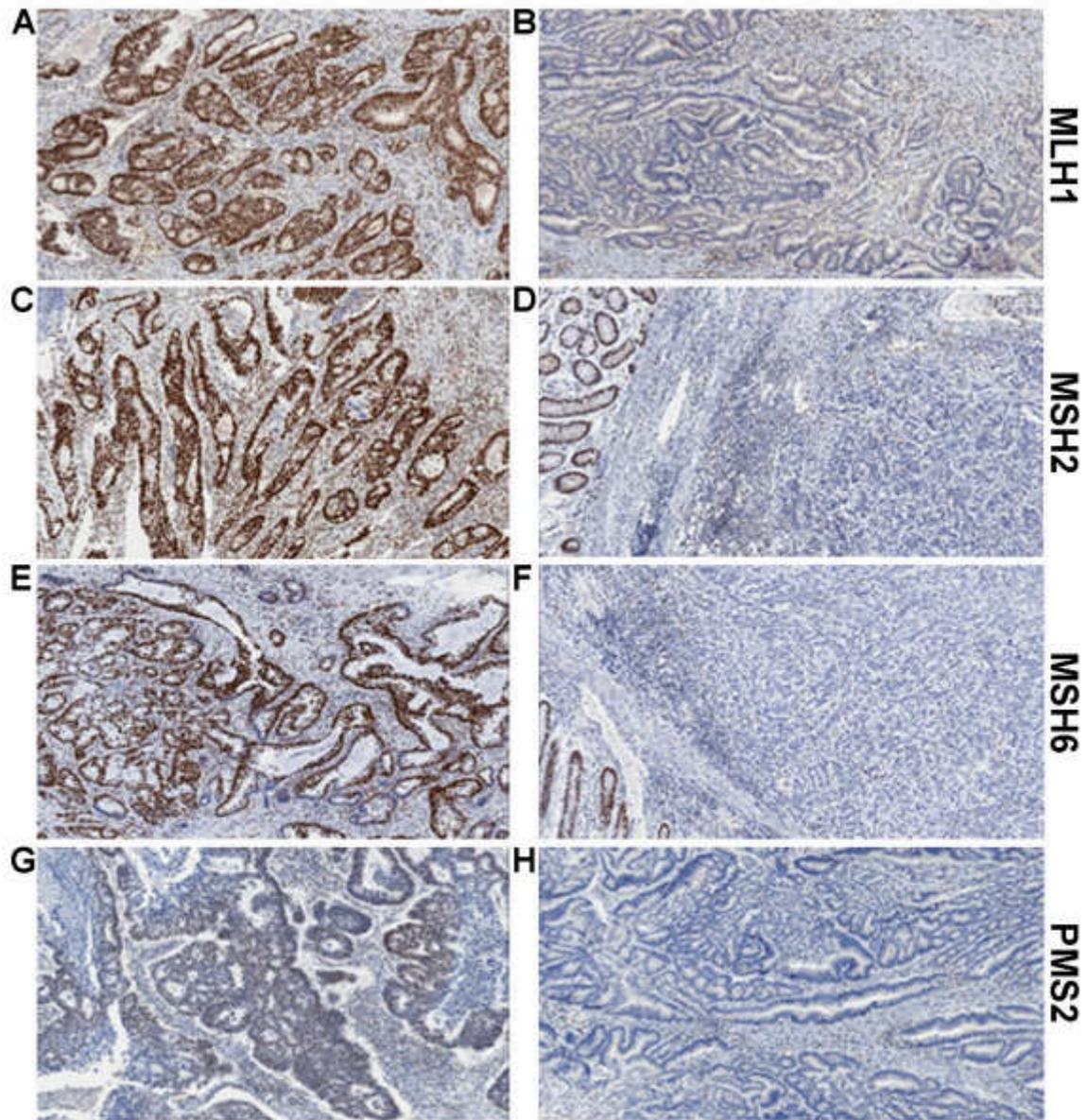


Figure 11: Immunohistochimie (IHC) pour les 4 protéines principales du système MMR, d'après Richman 2015
 IHC positive (A) vs négative (B) pour MLH1; IHC positive (C) vs négative (D) pour MSH2; IHC positive (E) vs négative (F) pour MSH6; IHC positive (G) vs négative (H) pour PMS2.

2. En biologie moléculaire

La technique actuellement utilisée est la « PCR pentaplex », constituée d'un panel de cinq marqueurs mononucléotidiques quasi-monomorphes dans la population mondiale (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 et NR-27) (Buhard et al. 2006), [Figure 12]. La PCR pentaplex est hautement sensible et spécifique, et ne nécessite pas de comparaison de l'ADN tumoral avec l'ADN non tumoral (Shia 2008). Cette méthode présente une sensibilité de 93% (Zhang 2008), elle requiert très peu de matériel biologique et est hautement reproductible (Hampel et al. 2005); des faux négatifs peuvent être observés en cas par exemple de prélèvements comportant une trop faible quantité d'ADN (carcinomes mucineux, cancers du rectum après radiothérapie néo-adjuvante) (Karran 2001), ou une importante contamination de la muqueuse tumorale (MSI) par de la muqueuse normale (MSS).

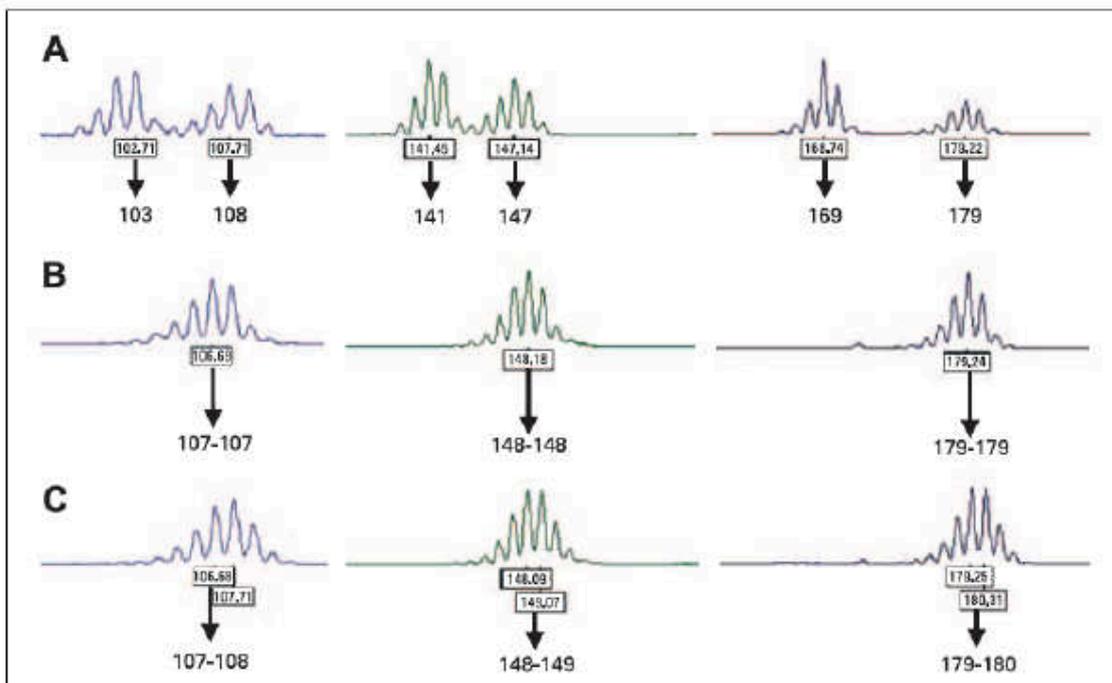


Figure 12: Exemples de profils individuels d'amplification, d'après Buhard 2006

- (A) Deux allèles distincts
- (B) Deux allèles homozygotes
- (C) Deux allèles homozygotes avec variation quasimonomorphe de NR-21 (bleu), BAT-25 (vert) ou BAT-26 (noir)

Une tumeur est considérée comme MSI si au moins 2 des 5 marqueurs sont instables. On parlait auparavant de tumeurs MSI-H (MSI *High*), en opposition aux tumeurs MSI-L (MSI *Low*) qui présentaient une instabilité sur moins de 3 marqueurs, mais cette notion n'est plus utilisée car les spécificités cliniques, biologiques et morphologiques des tumeurs MSI ne concernent que les tumeurs MSI-H et non les MSI-L dont les caractéristiques sont similaires aux tumeurs MSS.

L'IHC et la biologie moléculaire donnent des résultats similaires dans la grande majorité des cas mais une discordance peut être observée dans près de 10% des cas, comme cela a été décrit dans une étude incluant 1040 cancer colorectaux (Canard et al. 2011) : 7 patients avaient une tumeur dMMR mais MSS, et 3 patients une tumeur pMMR mais MSI. Ces discordances justifient pour de nombreuses équipes la réalisation systématique des deux techniques en routine pour les cancers colorectaux non métastatiques. Une étude récente de notre équipe préconise également une double détermination du statut MSI/dMMR également en situation métastatique, notamment en raison de son importance prédictive de réponse traitement; en effet la plupart des cas de résistance à l'immunothérapie chez des patients ayant un cancer colorectal MSI dans les essais thérapeutiques étaient dues à des erreurs de diagnostic du statut MSI (Cohen et al. 2018).

Dans les cas discordants ou de diagnostic douteux (dans les cas où l'interprétation de la Pentaplex est difficile), un autre marqueur quasi-monomorphique (HT-17) peut être utilisé : une étude récente de notre équipe a montré que ce marqueur a une meilleure sensibilité (98% vs 95%) et une spécificité identique par rapport aux marqueurs de la pentaplex (Buhard et al. 2016). HT-17 est extrêmement bien conservé, ce qui rend son analyse plus fiable et plus facile à interpréter que la pentaplex ; son analyse pourrait même être recommandée en routine afin d'améliorer la détection des tumeurs MSI.

E. Contextes cliniques

1. Formes familiales

a. Syndrome de Lynch

Le syndrome de Lynch (SL) est l'un des syndromes héréditaires de prédisposition au cancer les plus fréquents. La prévalence de ce syndrome est élevée ; il est responsable de 2 à 7% de l'ensemble des CCR, et sa prévalence est estimée entre 1/500 et 1/1000 dans la population générale (Moreira et al. 2012).

(1) Historique

Dès la fin du XIX^{ème} siècle, Alfred Warthin, professeur d'Anatomie Pathologique à l'Université américaine de Michigan (H. T. Lynch et al. 2015) s'est étonné de multiples décès par cancer (en particulier du côlon, de l'estomac et de l'utérus) survenus dans une même famille (la « family G ») (Warthin 1913). Il a noté que la transmission de la susceptibilité au cancer au sein de ces familles était compatible avec la proposition d'hérédité autosomique dominante de Mendel (H. T. Lynch et al. 2015).

En 1962, Henry Lynch a rencontré un patient avec une histoire familiale similaire à celle de la « family G », et en colligeant des données sur l'ensemble des cancers observés dans cette famille, il a mis en évidence plusieurs cas de CCR et de cancer de l'endomètre sur plusieurs générations. Il a appelé cette famille la « famille N » (pour Nebraska). En 1966 il publie son premier article en utilisant les données de deux familles (N et M, pour Michigan) (H. T. Lynch et al. 1966). Dans la suite de ses publications, Lynch a décrit ce syndrome comme le « syndrome des cancers familiaux » (H. T. Lynch & Krush 1971a; H. T. Lynch & Krush 1971b).

Ce syndrome a été renommé « syndrome de Lynch » par Boland et Troncale en 1984 (Boland & Troncale, 1984) qui ont confirmé, à travers l'analyse de ségrégation des familles, le mode de transmission autosomique dominant (Boland & Troncale 1984). Durant cette même année, le terme HNPCC (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer) a été utilisé pour la première fois (Tempero et al. 1984). Cet acronyme a été utilisé jusqu'à très récemment, mais cette appellation est inappropriée car elle se limite au spectre tumoral restreint (ou SL de type I), caractérisé principalement par les tumeurs coliques, alors que le

SL de type II, recouvre également d'autres localisations tumorales (Aaltonen et al. 1993; Kalady 2013; H. T. Lynch et al. 2015).

Le diagnostic de SL est actuellement basé sur la présence d'un phénotype clinique compatible, des données anatomo-pathologiques et du screening génétique (Boland & H. T. Lynch 2013; H. T. Lynch & P. M. Lynch 2013; H. T. Lynch et al. 2015).

(2) Caractéristiques cliniques

(i) Spectre clinique du SL

Les tumeurs du spectre clinique du SL surviennent en moyenne au cours de la quatrième décennie ; on distingue classiquement (Vasen et al, 1999):

- le spectre restreint, incluant les cancers les plus fréquents:
Cancer colorectal (70 à 80% de risque de CCR cumulé pour les hommes, et 40 à 60% pour les femmes (Liljegren et al. 2008; Jasperson et al. 2010) ; cancer de l'endomètre (risque de 42% à 70 ans (Dunlop et al. 1997; Win et al. 2012) ; cancers urothéliaux (vessie et voies urinaires) ; cancers de intestin grêle
- le spectre élargi: cancers de l'estomac, des voies biliaires, des ovaires.

Le SL présente une hétérogénéité dans son expression clinique, et il existe une corrélation entre le gène muté et le phénotype clinique. Ainsi, il est établi que les mutations constitutionnelles du gène *MSH6* sont associées à un moindre risque de cancers colorectaux et à un risque majoré de cancers de l'endomètre (Akiyama et al, 1997; Kolodner et al, 1999; Watson et al, 2008; Wijnen et al, 1999). Il est également 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* qu'en cas de mutation du gène *MLH1*. La mutation du gène *PMS2* conduit par ailleurs à un phénotype atténué avec un risque réduit de cancer et un âge moyen au diagnostic plus tardif que dans les autres SL (Senter et al, 2008).

Le syndrome de Muir-Torre est une variante rare du SL (Lynch et al, 1981) caractérisée par l'association de lésions sébacées (adénomes sébacés, carcinomes sébacés) avec des cancers du spectre du SL, le plus souvent des CCR (Muir et al. 1967; Torre 1968). Dans ce syndrome, les mutations des gènes *MSH2* et *MSH6* sont les plus fréquentes (90%) et

10% des patients sont porteurs d'une mutation germinale de *MLH1* (Mercader 2010).

Désormais, la notion de spectre clinique est un peu dépassée car l'étude moléculaire systématique de différents types de tumeurs a montré que le syndrome de Lynch peut être impliqué dans de nombreux types tumoraux, même si l'incidence est moindre que pour les cancers colorectaux ou endométriaux (Lupinacci et al. 2018; Latham et al. 2019).

(ii) Critères diagnostiques

L'identification des malades atteints d'un SL est un enjeu majeur car la morbidité et la mortalité par cancer chez les malades et leurs apparentés peuvent être réduites par un dépistage précoce (Järvinen et al. 2000; de Jong et al. 2006). En 1991, un consortium international, réuni à Amsterdam, a énoncé des critères, dits d'Amsterdam, définissant ce syndrome sur le plan clinique (Vasen et al. 1991). Les critères d'Amsterdam I ne prenaient en compte que les CCR et ont été actualisés en 1998 (Amsterdam II) tenant également compte d'autres localisations tumorales (endomètre, estomac, ovaire, SNC, intestin grêle, voies urinaires, hépato-biliaire) (Vasen et al. 1999).

Les critères d'Amsterdam étant très spécifiques mais peu sensibles, (Vasen et al. 2007) de nouveaux critères (critères de Bethesda), moins stricts que ceux d'Amsterdam, et incluant les caractéristiques anatomopathologiques des CCR, ont été proposés afin de guider les cliniciens pour la sélection des malades devant bénéficier d'un test MSI avant la recherche de mutations constitutionnelles des gènes MMR, en particulier ceux ne présentant pas les critères d'Amsterdam. Ces recommandations (Rodriguez-Bigas et al. 1997) ont été révisées en 2004 afin d'améliorer encore la reconnaissance des malades pour lesquels l'âge de début de la maladie est plus tardif et/ou n'ayant pas d'histoire familiale de cancer (Umar et al. 2004). Bien que ces critères soient moins stricts que ceux d'Amsterdam, leur sensibilité est seulement de 40 à 80% dans des populations à haut risque de cancers (H. T. Lynch & la Chapelle 2003; Gologan et al. 2005; Wolf et al. 2006), et de 50% ou moins dans des populations non sélectionnées (Aaltonen et al. 1998; Salovaara et al. 2000; Piñol et al. 2005; Julié et al. 2008).

Ces critères ne sont plus utilisés pour décider du screening des CCR pour MSI, car celui-ci est désormais systématique selon les recommandations de nombreuses sociétés

savantes. En effet, le caractère MSI des CCR n'est pas seulement nécessaire au diagnostic du syndrome de Lynch, il a aussi des implications thérapeutiques (indications de chimiothérapie adjuvante dans les cancers colorectaux stades II et III, indications aux immunothérapies dans les stades IV) ; il donc est important de le déterminer quels que soient le stade et le contexte clinique. Une fois un CCR MSI diagnostiqué, les critères cliniques peuvent en revanche orienter vers une origine héréditaire plutôt que sporadique et justifier une recherche de mutation germinale.

(3) Caractéristiques moléculaires

Le SL se transmet selon un mode autosomique dominant. Les patients atteints du SL sont porteurs d'une mutation mono-allélique germinale d'un gène du système MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* ou *PMS2*) qui les prédispose au cancer. Une altération somatique de l'allèle sauvage suffit à inactiver le système MMR selon le modèle de carcinogenèse des « two hits » de Knudson et peut conduire à la transformation cellulaire par un processus d'instabilité nucléotidique (Knudson 1985), [Figure 13].

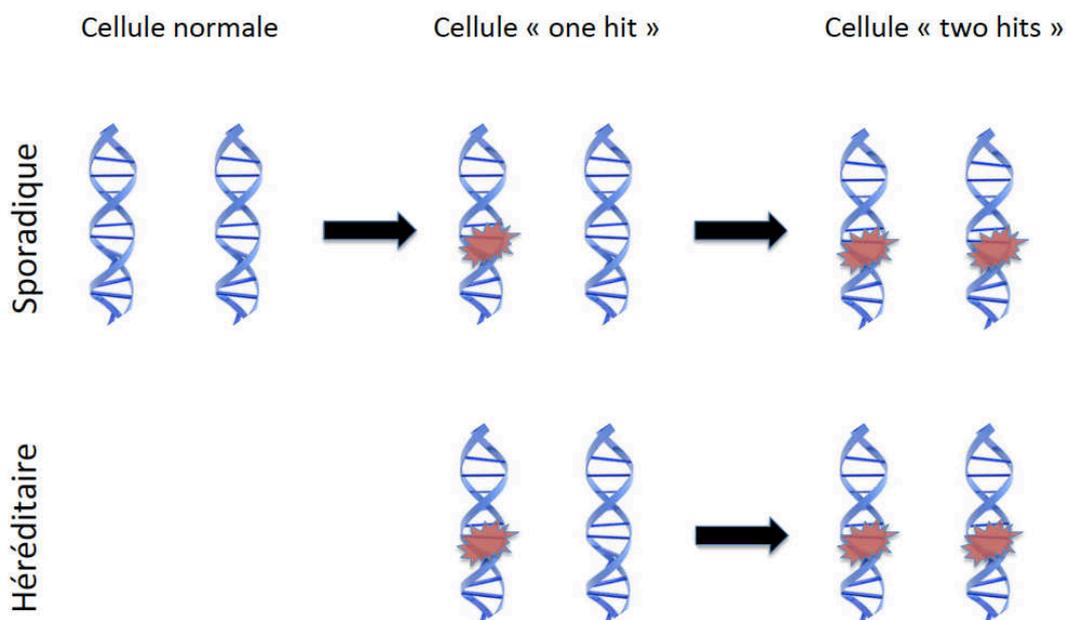


Figure 13: Modèle des « two hits » selon Knudson

(i) Altérations constitutionnelles

En 2004, une base de données répertoriant l'ensemble des mutations responsables d'un cancer chez les patients avec un SL a été créée ; elle est actualisée continuellement par l'« International Society for Gastrointestinal and Hereditary Tumors » (InSiGHT) (Plazzer et al. 2013). En 2015, la répartition des altérations génétiques était la suivante : 40% de mutations affectant le gène *MLH1*, 34% *MSH2*, 18% *MSH6*, et 8% *PMS2* (Peltomäki 2016) ; les mutations de *MLH3* et *PMS1* sont exceptionnelles et leur rôle délétère n'est pas démontré.

Certaines familles présentent un phénotype de SL typique avec un phénotype MSI associé à une perte d'expression de la protéine MSH2, mais sans aucune mutation germinale identifiée sur les gènes du système MMR. Dans ces familles, il a été montré que la délétion germinale du gène *EPCAM* (*Epithelial Cell Adhesion Molecule*) provoque une fusion des transcrits *EPCAM-MSH2* (situés sur le même chromosome) conduisant à l'inactivation de la protéine MSH2 (Ligtenberg et al. 2009). Cette mutation serait responsable d'environ 1 à 3% des SL (Niessen et al. 2009).

Il existe de rares cas de méthylation constitutionnelle du promoteur du gène *MLH1* (Hitchins & Ward 2009), et plus rarement encore de *MSH2* (T. L. Chan et al. 2006), responsable de SL.

(ii) Altérations somatiques

Les mécanismes moléculaires sous-tendant l'inactivation somatique de l'allèle sauvage ne sont pas parfaitement connus car ils sont rarement étudiés au niveau tumoral; cette inactivation peut résulter d'une délétion, d'une mutation ponctuelle ou d'une méthylation du promoteur du gène (Potocnik et al. 2001).

La méthylation du promoteur du gène *MLH1*, évoquée dans les cancers MSI sporadiques, ne permet cependant pas d'exclure formellement un SL, notamment chez les patients présentant des antécédents familiaux et une tumeur survenant à un âge précoce, ces deux éléments évoquant un SL. En effet, dans le SL, la méthylation du gène *MLH1* peut constituer le second hit chez un patient porteur d'une mutation germinale (Bellizzi & Frankel 2009; Niessen et al. 2009). Par ailleurs, une méthylation somatique de *MSH2* a été décrite

comme étant le second hit chez 24% des patients présentant une mutation germinale de *MSH2*, sans que cela ne soit jamais rapporté dans les CCR sporadiques (Nagasaka et al. 2010).

Une autre donnée dont l'importance est actuellement établie pour les CCR MSI concerne l'oncogène *BRAF*. Ce dernier appartient à la famille des gènes *RAF* et participe à la voie de signalisation des MAP kinases. Les mutations de *BRAF* sont observées de manière significativement plus fréquente dans les CCR de phénotype MSI que dans les CCR de phénotype MSS (35% versus 5%) (Oliveira et al. 2003). De façon plus spécifique, les mutations oncogéniques *BRAF-V600E* surviennent presque exclusivement dans des CCR MSI sporadiques présentant une méthylation de la région promotrice du gène *MLH1* ; la présence de cette mutation peut donc aider à différencier les CCR sporadiques des CCR associés au SL (McGivern et al. 2004; H. T. Lynch et al. 2015) dans les cas douteux.

(4) Diagnostic du syndrome de Lynch

Le diagnostic de syndrome de Lynch est définitivement posé lorsqu'une mutation délétère germinale d'un des gènes MMR est identifiée chez le patient. Cette recherche peut être longue et coûteuse, ce qui justifie une sélection en amont des patients présentant une tumeur de phénotype MSI. En France, une quinzaine de laboratoires sont habilités à réaliser l'analyse constitutionnelle des gènes *MLH1*, *MSH2* et *MSH6* et seulement trois pour le gène *PMS2*. Les laboratoires adaptent leur stratégie d'analyse en fonction du résultat du pré-criblage somatique. L'analyse constitutionnelle comprend une recherche de mutations ponctuelles et de réarrangements de grande taille, orientée par les résultats de l'IHC ou d'emblée sur les quatre gènes MMR selon les techniques utilisées. Il existe en IHC fréquemment des pertes conjointes de *MLH1/PMS2* d'une part et de *MSH2/MSH6* d'autre part, en raison du fonctionnement de ces protéines en hétérodimères.

(5) Surveillance clinique des patients atteints du SL

Les recommandations et la surveillance gastro-intestinale dans le SL sont fondées sur des études prospectives impliquant de grandes séries de patients. Elles sont générales pour les deux localisations tumorales les plus fréquentes (côlon, endomètre), et adaptée aux types de tumeurs observées dans la famille pour les autres localisations.

La surveillance recommandée actuellement comporte :

- Une coloscopie totale tous les 2 ans à partir de 20 ans
Cela permet de réduire le risque de CCR, et diminue de 65% la mortalité (Järvinen et al. 2009). Il est nécessaire de réaliser une chromoendoscopie, afin de ne pas méconnaître des adénomes plans, difficiles à identifier et fréquents dans ce contexte.
- Une fibroscopie oesogastroduodénale tous les 2 ans, et une éradication d'*Helicobacter Pylori* (dans les cas où la recherche est positive)
- Une échographie endovaginale avec prélèvement endométrial tous les ans
Cela permet de réaliser une surveillance de l'endomètre et des ovaires

La chirurgie prophylactique colorectale n'est actuellement pas recommandée, mais une hystérectomie prophylactique avec ovariectomie prophylactique doit être envisagée chez les femmes après accomplissement du projet parental.

2. CMMRD

Le syndrome de déficience constitutionnelle du système MMR (CMMRD, pour *Constitutional MisMatch Repair Deficiency*) (Scott, Mansour, et al. 2007; Scott, Homfray, et al. 2007), anciennement appelé syndrome de Lynch III (Felton et al. 2007), est défini par la présence de mutations germinales délétères bialléliques à l'état homozygote ou hétérozygote composite affectant un des gènes du système MMR.

Il s'agit d'un syndrome de prédisposition majeur aux cancers pédiatriques dont la première description clinique a été faite en 1959, sous la dénomination de syndrome de Turcot, associant une polypose colique et des tumeurs cérébrales (Turcot et al. 1959) chez des membres d'une même fratrie. Ce syndrome est rare avec seulement une centaine de familles identifiées, avec une notion fréquente de consanguinité.

Plus de la moitié des patients CMMRD (60%) sont porteurs de mutations germinales

bialléliques de *PMS2* (Wimmer et al. 2014) les 40% restant étant répartis plus ou moins équitablement entre *MSH6* d'une part et *MLH1/MSH2* d'autre part. Cette répartition des gènes mutés est l'inverse de celle qui est observée dans le syndrome de Lynch dans lequel la majorité des patients sont porteurs de mutation germinale sur *MLH1* ou *MSH2*. Cette différence de répartition des gènes mutés peut s'expliquer d'une part par la pénétrance réduite des mutations hétérozygotes *PMS2*, qui entraîne une sous-estimation de la fréquence de patients atteints du syndrome de Lynch impliquant *PMS2* (Truninger et al. 2005; Senter et al. 2008), et d'autre part par le fait que les mutations bialléliques des gènes *MLH1* et *MSH2* sont possiblement létales à l'état embryonnaire (Wimmer & Etzler 2008).

Le spectre clinique de ce syndrome est, comme dans le syndrome de Lynch, corrélé au gène MMR impliqué (Wimmer et al. 2014), et comporte, à parts égales: des tumeurs du spectre du syndrome de Lynch (adénomes ou adénocarcinomes), des hémopathies (lymphomes, leucémies) et des tumeurs cérébrales.

Des critères cliniques faisant suspecter un CMMRD chez un enfant ou un jeune adulte, et devant inciter à la recherche des mutations germinales ont été définis dans le cadre d'un consortium européen (Wimmer et al. 2014) sous la forme d'un score à partir notamment des critères suivants :

- Le type de tumeur (hautement spécifique, très représentée, ou occasionnelle)
- La survenue d'un second cancer à un âge pédiatrique,
- La survenue d'une tumeur du spectre du syndrome de Lynch chez un apparenté,
- La consanguinité parentale.
-

3. CCR MSI sporadiques

Les cancers MSI sporadiques représentent 12 à 15% des CCR du côlon, de l'estomac et de l'endomètre (Boland et al. 1998; Grady & Carethers 2008). Ces CCR sont de survenue plus tardive que dans un contexte de syndrome de Lynch, avec un âge moyen d'environ 75 ans.

Dans 90% des cas, le mécanisme en cause est une modification épigénétique, avec hyperméthylation des cytosines des îlots CpG du promoteur du gène *MLH1* (Veigl et al. 1998). Cette inactivation somatique et biallélique conduit à la répression transcriptionnelle

(silencing) du gène dans le tissu tumoral et donc à la perte d'expression de la protéine. Seule la méthylation de la région proximale du promoteur de *MLH1* induit un « silencing » du gène ; si la méthylation se situe dans la région distale, il n'y a pas d'impact sur l'expression (Capel et al. 2007).

Dans de rares cas, ces CCR peuvent être dus à une inactivation biallélique d'un gène du système MMR par une perte d'hétérozygotie ou une double mutation somatique (Haraldsdottir et al. 2014).

4. Contextes cliniques particuliers

a. Situations diagnostiques difficiles

(1) Variants de signification inconnue

Si une mutation connue comme délétère est identifiée sur un des gènes MMR, le diagnostic de SL est posé mais certains cas peuvent poser des problèmes diagnostiques. C'est le cas notamment des patients chez qui on identifie des « variants de signification inconnue », ou VSI (Sijmons et al, 2013), qui peuvent être des mutations faux-sens, des mutations introniques, des petites délétions ou insertions en phase. L'ensemble de ces variants ont pour point commun de ne pas générer de codon stop prématuré, ce qui ne permet pas de préjuger de la pathogénicité de la mutation. D'après la base de données InSiGHT (Peltomäki 2016) près de 2 950 VSI ont été rapportés jusqu'à présent (932 pour *MLH1*, 842 pour *MSH2*, 449 pour *MSH6* et 137 pour *PMS2*). Il existe plusieurs approches permettant de déterminer la pathogénicité des VSI, soit :

- De façon indirecte, par :
 - L'utilisation de logiciels de prédiction *in silico* (Chao et al, 2008; Doss & Sethumadhavan, 2009; Pastrello et al, 2011; Thompson et al, 2013; Wielders et al, 2014), qui se basent sur la conservation de l'acide aminé muté, la différence physicochimique entre l'acide aminé d'origine et l'acide aminé résultant de la mutation, et la position de cet acide aminé dans les domaines protéiques importants pour la fonction de la protéine.
 - L'analyse de la co-ségrégation entre le VSI et la maladie au sein d'une même famille.

- L'analyse des mutations somatiques des gènes MMR décrites dans les études sur les CCR MSI peut également aider à prédire leur caractère pathogène (Shirts et al. 2018).
- De façon directe, par un test fonctionnel qui est la seule façon de démontrer leur caractère pathogène ; en France, il est recommandé de ne pas tenir compte des VSI pour le conseil génétique dans la famille en l'absence de validation fonctionnelle (Rasmussen et al. 2012).

Dans une étude récente, notre équipe propose un test permettant d'évaluer la fonctionnalité des VSI sur la base du phénomène de tolérance à la méthylation (Bouvet et al. 2019); il consiste à transférer une lignée cellulaire MSI, donc tolérante à la méthylation, avec le VSI à tester, puis d'exposer les cellules à un agent méthylant. L'apparition d'un phénotype de mort cellulaire montre que l'introduction du VSI a restauré la fonction MMR et suggère alors que ce variant n'est pas pathogène. Les conditions expérimentales ont été validées par la transfection de 40 variants connus comme pathogène ou non pathogènes afin de déterminer les seuils de survie cellulaire correspondant aux 2 situations. L'étude prospective de 25 VSI du gène *MLH1* (transfectés dans la lignée HCT116 déficiente pour *MLH1*) et 23 VSI du gène *MSH2* (transfectés dans la lignée LoVo déficiente pour *MSH2*) a permis de conclure sur la caractère pathogène ou non pour 40/48 des VSI testés.

(2) Syndrome « Lynch-like »

Un autre problème diagnostique est celui des patients chez qui il existe une forte suspicion clinique, anatomopathologique et moléculaire de SL mais chez qui aucune mutation germinale sur un des gènes MMR n'est identifiée. Ces patients sont classés comme « Lynch-like » ; ils ne peuvent être considérés comme tels que si :

- Une relecture de l'IHC confirme le statut dMMR, afin d'éliminer une erreur d'interprétation initiale,
- Un CCR sporadique a été éliminé ; il faut rechercher de façon systématique une méthylation du promoteur de *MLH1* et une mutation somatique *BRAF*,
- Une recherche de mutation germinale MMR a été réalisée, et ne retrouve pas de

mutation pathogène ni dans un gène MMR ni dans le gène *EPCAM*.

Ce syndrome a été décrit en 2013 (Rodríguez-Soler et al. 2013) et concerne 30 à 50% des patients ayant un CCR MSI non méthylé (Mas-Moya et al. 2015; Antelo et al. 2019). Son incidence a fortement augmenté ces dernières années, depuis l'avènement du screening MSI/dMMR systématique dans les cancers colorectaux, préconisé au cours des recommandations de Jérusalem (Boland & Shike 2010; Moreira et al. 2012). En effet, ces patients ne remplissent pas toujours les critères cliniques (Amsterdam, Bethesda) initialement utilisés pour guider ce screening, et beaucoup de ces patients n'étaient donc pas identifiés. Cette constatation a également été faite chez les patients atteints de cancer de l'endomètre, chez qui le screening MSI/dMMR universel permet d'identifier environ 2% de syndrome de Lynch et 1% de « Lynch-like » (Dillon et al. 2017).

Le groupe des patients « Lynch-like » est hétérogène, et présente un risque de CCR intermédiaire (HR 2,12) entre le risque observé chez les patients SL (HR 6,04) et celui des patients sporadiques (HR 0,48) (Rodríguez-Soler et al. 2013).

En ce qui concerne les apparentés, le risque de CCR semble également être intermédiaire (Win et al. 2015), mais plus élevé qu'en cas de CCR sporadique.

Les caractéristiques cliniques et biologiques des CCR développés dans ce contexte ne sont pas spécifiques :

- L'âge au diagnostic est selon les études, soit similaire à celui des patients SL (Overbeek et al. 2007; Rodríguez-Soler et al. 2013), soit légèrement plus avancé mais inférieur à celui des patients ayant un CCR MSI sporadique (Win et al. 2015).
- Le taux de lésions colorectales synchrones ou métachrones est moins élevé (moins de 10% contre plus de 30%) (Mas-Moya et al. 2015; Porkka et al. 2018).
- L'histoire familiale est souvent peu évocatrice puisque seulement 11% des « Lynch-like » rentrent dans les critères d'Amsterdam contre 66% des LS (Overbeek et al. 2007).
- Certaines séries décrivent des CCR plus souvent localisés à droite dans les « Lynch-like », comme pour les sporadiques (Mas-Moya et al. 2015).
- La protéine MMR en cause est le plus souvent MLH1 ou MSH2 (Mas-Moya et al. 2015), exceptionnellement MSH6.
- Le phénotype est hypermuté et dans la très grande majorité des cas CIMP+ (contre 50% des CCR SL) ; tous sont *BRAF*wt (Porkka et al. 2018).

Ces caractéristiques des CCR « Lynch-like » intermédiaires entre celles des CCR liés au SL et celles des cas sporadiques peuvent s'expliquer de deux façons, non exclusives entre elles :

- Ce groupe est hétérogène et constitué à la fois de patients sporadiques et de patients SL non identifiés formellement
- Ce groupe est constitué de patients présentant un syndrome de prédisposition au CCR de pronostic intermédiaire ; une étude a par exemple montré que les caractéristiques cliniques (âge au diagnostic, taux de deuxième CCR synchrone ou métachrone, histoire familiale) sont comparables à celles qui sont observées dans le cadre du LS lié à une mutation du gène *EPCAM* (Kang et al. 2015), ce qui suggère que le syndrome « Lynch-like » pourrait correspondre à une forme atténuée de LS.

En ce qui concerne la surveillance, les recommandations sont moins claires que dans le SL, en raison de l'hétérogénéité de ce groupe. Le plan de surveillance est alors fonction de la suspicion de forme familiale non identifiée, notamment selon les critères cliniques, qui peut être guidée par des outils prédictifs, comme le score PREMM₅ (Kastrinos et al. 2017). Certains auteurs se sont intéressés à la compliance des patients « Lynch-like » au plan de surveillance qui leur était proposé (Katz et al. 2016) ; ces études ont montré une bonne compliance des patients aux endoscopies personnelles et familiales, mais aussi une mauvaise compréhension du diagnostic par plus de la moitié des patients.

b. CCR MSI induits dans un contexte de MICI

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), comme la maladie de Crohn ou la rectocolite hémorragique (RCH), constituent un facteur de risque de survenue de CCR. Il a été décrit parmi les CCR survenant dans ce contexte une proportion très variable de CCR MSI, de 1% à 45% (Suzuki et al, 1994; Brentnall et al, 1996; Willenbacher et al, 1999; Cawkwell et al, 2000; Fleisher et al, 2000; Lyda et al, 2000; Aust et al, 2005; Schulmann et al, 2005).

Le mécanisme sous-jacent au développement d'une tumeur MSI dans ce contexte ne serait un silencing induit par la méthylation du promoteur du gène *MLH1* que dans environ 20% des cas (Svrcek et al. 2007). Ces lésions peuvent présenter une perte d'expression de *MLH1*, mais aussi de toute autre protéine MMR, et des mutations du gène *BRAF* fréquentes

(Svrcek et al, 2007). Même dans le cas d'une tumeur MSI par méthylation du promoteur de *MLH1*, comme dans les CCR sporadiques, le répertoire des gènes cibles de l'instabilité est différent (Schulmann et al, 2005).

L'augmentation du risque de CCR dans les MICI semble être en partie liée à une voie d'oncogenèse MSI (Brentnall et al, 1996; O'Sullivan et al, 2002), qui peut être favorisée par différents éléments :

- Le stress oxydatif :

La surproduction de radicaux libres saturerait la capacité de la cellule à réparer les dommages oxydatifs de l'ADN (Brentnall et al, 1996 ; Jackson et al, 1998 ; Agoff et al, 2000), qui pourraient lorsque le stress oxydatif est répété et prolongé induire directement l'inactivation d'un des gènes du système MMR (Chang et al, 2002).

- L'inflammation :

Chez des patients atteints de RCH, il a été observé une réponse adaptative à l'inflammation, conduisant à un déséquilibre enzymatique (augmentation de l'activité de la 3-méthyladénine ADN glycosylase et de l'endonucléase apurinique) qui pourrait être associé à un phénotype MSI par des mécanismes encore mal définis (Hofseth et al, 2003). L'hyperméthylation des îlots CpG des promoteurs de différents gènes fréquemment retrouvée dans les CCR compliquant une MICI pourrait également être une conséquence directe de l'état d'inflammation chronique.

- La iatrogénie :

Différentes publications ont permis de démontrer le rôle des thiopurines, une famille d'immunosuppresseurs largement prescrits comme traitement d'entretien des MICI (Atreya & Neurath 2008a; Atreya & Neurath 2008b)

Brièvement, ces travaux établissent :

- que ces médicaments, analogues de bases et agents mutagènes, favorisent la sélection de clones MMR-déficients en culture, puisque l'inactivation de ce système permet aux cellules d'échapper à la toxicité de la drogue et à la mort cellulaire.
- que l'administration de thiopurines induit l'émergence de tumeurs MSI chez les souris dans certaines conditions (Chalastanis et al. 2010; Bodo et al. 2015).

- qu'il existe une association clinique significative entre la prise d'azathioprine (thiopurine) chez les patients et la survenue de cancers secondaires de phénotype MSI chez eux (leucémies, lymphomes) dans différents contextes (greffe de moëlle, greffe d'organes).

Dans le cadre des CCR MSI développés sur MICI, le lien avec un traitement par Azathioprine n'est pas démontré (Svrcek et al. 2007; Svrcek et al. 2016).

F. Lésions précancéreuses

1. Séquence de transformation classique

a. Adénomes

Dans la séquence classique de transformation vers un adénocarcinome, la lésion précurseur est un adénome, dont la forme typique est polypoïde, et facilement identifiée en endoscopie.

Dans le cadre de la cancérogénèse MSI, ces lésions sont souvent des adénomes « plans » qui correspondent à des lésions légèrement surélevées qui se distinguent de la muqueuse normale par une couleur différente. Ces lésions sont difficiles à identifier en coloscopie, surtout lorsqu'elles sont de petite taille. Une analyse attentive de la muqueuse est nécessaire pour les détecter, et leur identification est améliorée par l'utilisation d'optiques grossissants et de colorations vitales (chromoendoscopie). Ces lésions sont définies sur le plan histologique par une hauteur inférieure à 2 fois celle de l'épithélium.

b. Cryptes aberrantes

Les cryptes aberrantes, ou ACF (*Aberrant Crypt Foci*) sont des foyers de cryptes de la muqueuse colique dont l'aspect morphologique est différent des cryptes normales. Elles sont considérées comme des lésions précancéreuses, première étape de la séquence ACF-Adénome-Adénocarcinome. Elles ont été décrites pour la 1^{ère} fois chez des souris traitées par un agent méthylant cancérigène, l'azoxyméthane (AOM).

L'homéostasie cellulaire au sein de la muqueuse colorectale résulte d'un équilibre prolifération/apoptose, suivant le schéma suivant : les cellules souches à la base de la crypte se différencient, migrent vers le haut de la crypte et finissent par se mettre en apoptose au sommet de la crypte. Les ACF se forment lorsque cette balance est déséquilibrée.

Les ACF peuvent présenter des caractéristiques histologiques hyperplasiques ou dysplasiques (Takayama et al. 1998) ; la proportion d'ACF dysplasiques est très variable selon les séries, pouvant aller jusqu'à 30%.

Ces lésions sont détectées en endoscopie, grâce à des techniques plus poussées que l'endoscopie standard, comme l'utilisation d'optiques grossissantes ou de colorations, réelles ou « virtuelles », comme la technologie NBI (*Narrow Band Imaging*). La définition peut être une modification de coloration, et/ou une modification morphologique : diamètre de la crypte augmenté, épithélium épaissi, dilatation de la lumière.

L'hypothèse considérant les ACF comme des lésions précurseurs des adénomes/adénocarcinomes est étayée par le fait que ces lésions présentent des caractéristiques moléculaires phénotypiques similaires à celles identifiées dans les adénomes/adénocarcinomes.

2. Cryptes MMR-déficientes

Les foyers de cryptes MMR déficientes (MMR-DCF) ont été récemment décrites (Kloor et al. 2012a) dans la muqueuse normale de patients atteints de syndrome de Lynch. Il s'agit de cryptes morphologiquement normales, mais qui perdent l'expression d'une des protéines du système MMR [Figure 14]. Elles sont donc à distinguer des cryptes aberrantes, dans la mesure où elles ne présentent pas d'épaississement, de dilatation, d'hyperplasie ou de dysplasie. Ces lésions sont relativement fréquentes puisqu'elles étaient retrouvées chez tous les patients chez qui plus de 100mm² de muqueuse étaient analysées. Sept des 27 MMR-DCF ont pu être analysées en biologie moléculaire, et toutes présentaient une instabilité des microsatellites sur au moins 2 des marqueurs étudiés (BAT 25, BAT26, CAT25, TGFβR2). Plus de 50 foyers de cryptes adjacentes sans perte de protéine MMR analysées comme contrôle ne présentaient aucune instabilité sur les 4 marqueurs.

La découverte de ces lésions supporte l'hypothèse selon laquelle la déficience MMR est un événement très précoce de la cancérogénèse MSI, avant même le stade de l'adénome (Fearon 2011), et elles s'inscrivent dans un schéma de carcinogénèse différent de la séquence classique adénome-adénocarcinome chez ces patients chez qui la prédisposition au cancer colorectal est dite « non polyposique » (Liljgren et al. 2008; Lindgren et al. 2002).

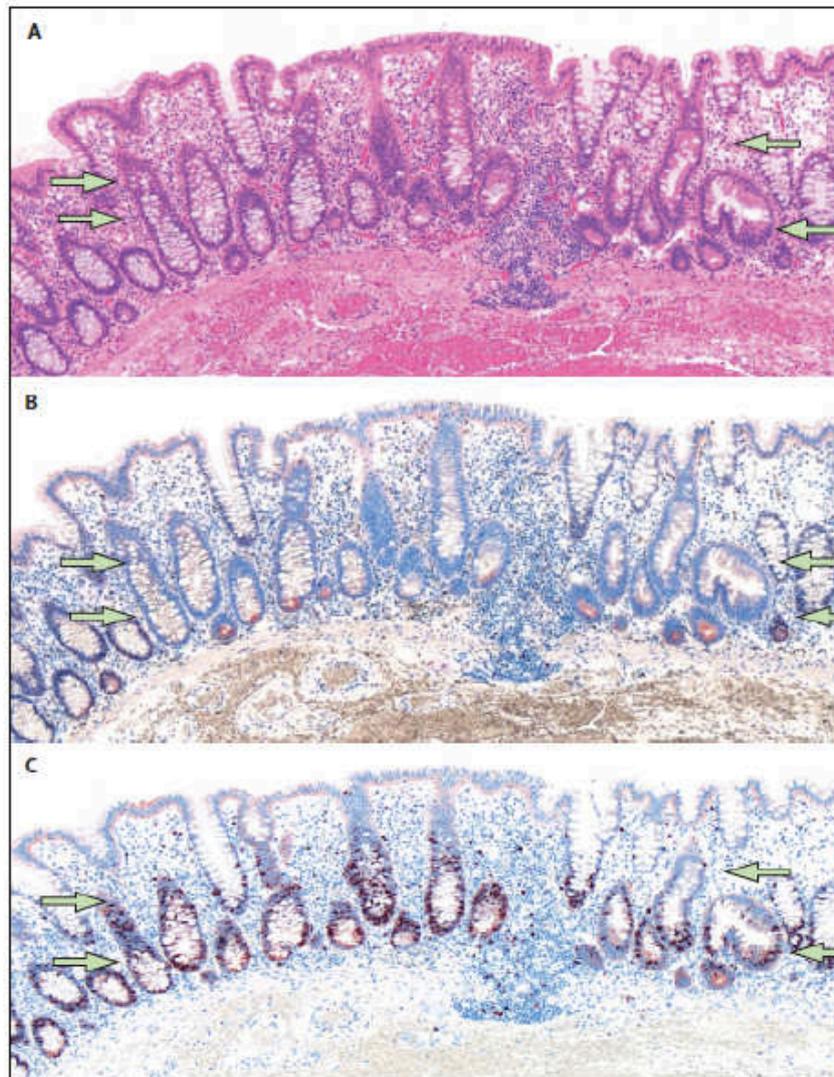


Figure 14: Immunohistochimie d'un foyer de cryptes MMR déficientes (MMR-D), d'après Kloor 2012

(A) Coloration HES (Haematoxylin and eosin stain). (B) Immunohistochimie MLH1 correspondante. (C) Immunohistochimie Ki-67 correspondante.

Sur l'HES, les cryptes MMR-D (flèches de gauche) sont similaires morphologiquement aux cryptes MMR proficientes adjacentes. D'autres cryptes MMR-D (flèches de droite) présentent des anomalies morphologiques.

Une autre étude plus récente de la même équipe (Staffa et al. 2015) a confirmé la présence de MMR-DCF chez les patients atteints de SL, et a montré que ces lésions n'étaient pas retrouvées sur une cohorte de patients atteints de CCR MSI sporadiques, ce qui ferait des MMR-DCF des lésions spécifiques du SL. Des travaux récents d'une autre équipe (Pai et al. 2018) ont confirmé que ces lésions étaient spécifiques du SL, et ont montré qu'elles pouvaient être un outil intéressant dans les cas difficiles des patients "Lynch-like", dans la mesure où l'identification de MMR-DCF chez ces patients (10 dans cette étude) oriente vers le diagnostic d'un authentique SL.

III. MGMT et oncogenèse MSI

L'action de la MGMT est indépendante du système MMR, mais interagit avec lui, et la MGMT joue un rôle crucial pour l'émergence de clones MMR-déficients, par l'intermédiaire de la tolérance à la méthylation, en particulier dans le tube digestif (site primitif majeur par argument de fréquence pour la survenue de cancers MSI).

A. Inactivation de la MGMT

1. Mécanismes en cause

La réparation directe des lésions O6MeG par la MGMT semble être le mécanisme majeur de résistance des cellules aux effets cytotoxiques des agents alkylants, qui sont pourtant fréquemment utilisés de manière efficace dans le traitement de certains cancers. Ce paradoxe a été élucidé par la découverte d'une répression transcriptionnelle fréquente de la MGMT liée à une hyperméthylation du promoteur du gène, dans les cellules tumorales (Qian & Brent, 1997 ; Esteller et al, 1999; Middleton & Margison, 2003 ; Esteller & Herman, 2004). L'hyperméthylation du promoteur de la *MGMT* peut être influencée par des facteurs environnementaux ; celle-ci serait notamment favorisée par une consommation excessive d'alcool, associée ou non à une carence en folates (van Engeland et al. 2003).

La perte de la MGMT n'est cependant pas toujours corrélée à la méthylation, surtout dans le tissu cérébral, (Maxwell et al. 2006) et d'autres facteurs peuvent influencer sur l'expression de la MGMT, sans que le mécanisme soit bien identifié, comme :

- les médicaments : les corticostéroïdes (Ueda et al. 2004), ainsi que certaines plantes antioxydantes (Niture et al. 2006) augmenteraient son expression
- des facteurs alimentaires , comme un régime riche en fibres, qui est associé à une augmentation de l'activité de la MGMT dans le côlon (Billson et al. 2009)

Les mutations de la *MGMT* sont rares et le rôle de ses polymorphismes est peu connu. Un seul cas de mélanome familial lié à une délétion de la *MGMT* a été décrit (Appelqvist et al. 2014). Le polymorphisme Leu84Phe est celui qui a été le plus étudié ; il serait associé à un risque accru de cancer (Sheng et al. 2018), et notamment de CCR (Aggarwal et al. 2017), ainsi qu'à un plus mauvais pronostic et une plus grande résistance au TMZ dans les gliomes (Wang et al. 2017). Certains polymorphismes du promoteur seraient également associés à une augmentation de sa méthylation, et donc à une répression de l'expression de la protéine (Ogino et al. 2007).

2. Détermination de l'inactivation de la MGMT

a. Niveau d'expression de la MGMT

(1) Immunohistochimie

La principale technique utilisée pour déterminer le niveau d'expression de la MGMT est l'immunohistochimie, en utilisant un anticorps spécifique. L'interprétation du marquage IHC de la MGMT est plus difficile que celle des protéines du système MMR, car il peut être hétérogène dans une même tumeur (ou tissu sain). L'analyse d'expression de la MGMT définit quatre degrés d'intensité (Svrcek et al. 2010), [Figure 15] évalués par la comparaison avec l'intensité du marquage des témoins internes (cellules du stroma, lymphocytes), soit :

- 0 : absence de marquage
- 1 : marquage faible
- 2 : marquage modéré
- 3 : marquage fort

L'expression de la MGMT est considérée comme « perdue » en cas de marquage 0 ou 1, et « conservée » en cas de marquage 2 ou 3.

(2) Imagerie

Dans le cadre des tumeurs cérébrales, et de façon plus anecdotique, une technique non invasive a été récemment mise au point : il s'agit d'une imagerie métabolique basée sur le principe du PET-scanner, avec une sonde couplée à l'O6BzG (Koyama et al. 2017). Cette technique, encore préliminaire, pourrait permettre de déterminer l'activité de la MGMT au sein de certaines tumeurs.

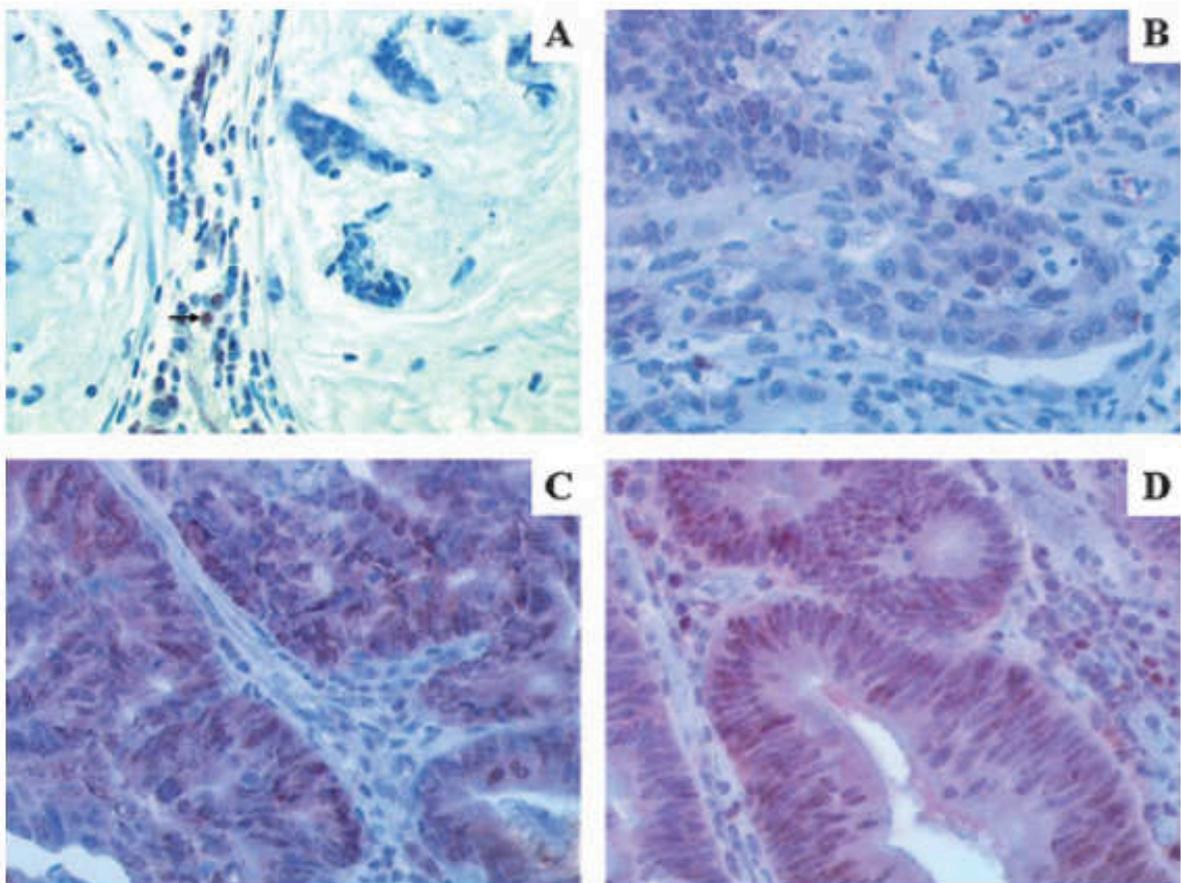


Figure 15: Evaluation de l'expression de la MGMT par immunohistochimie, d'après Svrcek 2010

(A) Absence de marquage (0); (B) Marquage nucléaire faible (1); (C) Marquage nucléaire modéré (2); (D) Marquage nucléaire intense (3)

b. Statut de méthylation du promoteur

Deux techniques principales permettent d'évaluer la méthylation du promoteur de la *MGMT* : la PCR spécifique de la méthylation, et le pyroséquençage (Yamashita et al. 2018).

Ces deux techniques reposent sur une première étape de traitement par du bisulfite de sodium, qui transforme les cytosines non méthylées en Uracile, et transforme ainsi l'information « méthylation » en polymorphisme de séquence.

La PCR spécifique de méthylation est une méthode qualitative (ou semi-quantitative), qui consiste ensuite en la réalisation de 2 PCR séparées, avec des amorces complémentaires de l'une ou l'autre séquence. Les taux rapportés de méthylation du promoteur de la *MGMT* sont très variables, même au sein d'un même type tumoral, ce qui peut en partie être expliqué par la grande variabilité des amorces utilisées selon les études (Håvik et al. 2012; Johannessen et al. 2018).

Le pyroséquençage est une méthode quantitative, qui permet de déterminer la proportion des deux séquences selon l'intensité du pic révélé par le fluorochrome en fonction de la quantité de chaque nucléotide marqué intégré, [Figure 16].

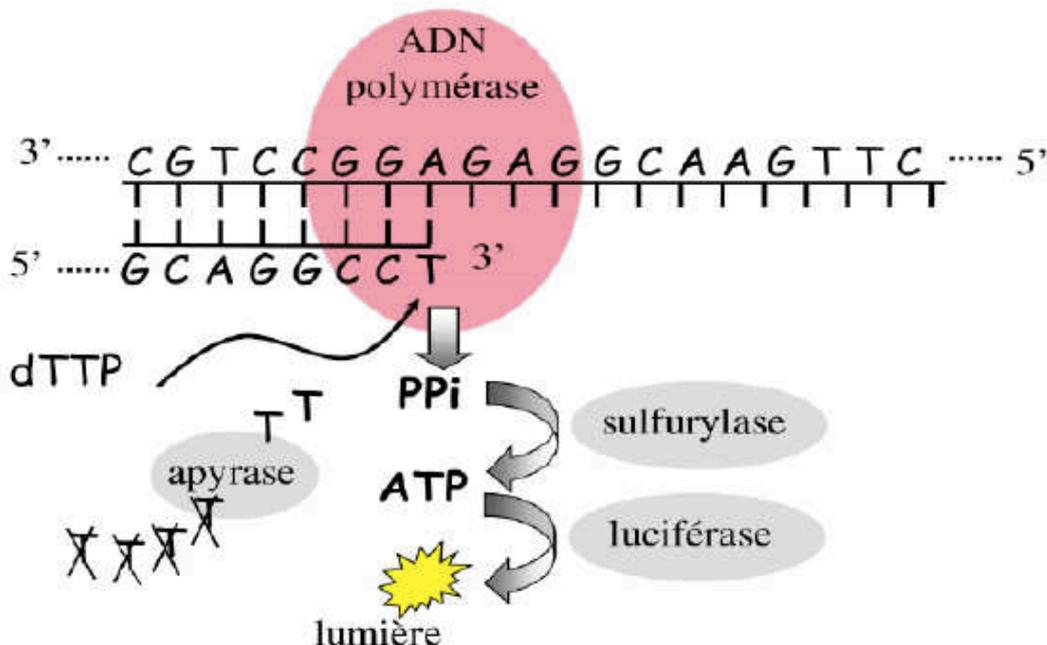


Figure 16: Technique de pyroséquençage, d'après Falque 2011

B. Conséquences d'une inactivation de la MGMT

1. Etudes *in vitro*

Le rôle de la MGMT a été démontré *in vitro* sur des lignées cellulaires. En effet, l'inhibition de la MGMT par la O6-Benzyl-Guanine (O6BzG), provoque une mortalité cellulaire augmentée de 70% après exposition à l'AM MNNG par rapport aux lignées non traitées par O6BzG (Branch et al, 1995; Dolan & Pegg, 1997; Gerson, 2002). Cette mort cellulaire surviendrait essentiellement par apoptose, 2 à 3 cycles après le traitement (Ochs & Kaina 2000).

A l'inverse, la transfection d'un ADNc de la MGMT dans les cellules, en augmentant l'expression de la MGMT, accroît la résistance des cellules au traitement par AM (Kaina et al. 1991; Jansen et al. 2001). Il a également été démontré sur des lignées cellulaires animales (CHO), transfectées avec un ADNc MGMT, que cette augmentation de la survie s'accompagne d'une diminution des mutations en transition liées à l'O6MeG (Psaroudi et al. 2000).

La sensibilité accrue aux AM engendrée par une perte de fonction de la MGMT n'est observée que si le système MMR est proficient (Kaina et al. 1997; Hickman & Samson 1999). Ainsi, les lignées cellulaires présentant à la fois un déficit en MGMT et MSH2 présentent une résistance élevée au MNNG avec une forte diminution de la mort cellulaire (Sanada et al. 2004).

De la même façon, les cellules *Mgmt*^{ko} et *Mlh1*^{ko} sont plus résistantes au MNU que les cellules sauvages, mais les cellules *Mgmt*^{ko} et *Mlh1*^{+/-} sont très sensibles à l'effet mutagène des AM (Takagi et al. 2003).

2. Etudes *in vivo*

Dans des études *in vivo*, il a été démontré initialement que la surexpression de la MGMT chez la souris est un facteur protecteur contre le développement de lymphomes après administration d'un AM (MNU) (Allay et al. 1999). Par la suite, il a été montré que des souris *Mgmt*^{ko} étaient très sensibles aux AM, et notamment à leur cytotoxicité avec une mortalité accrue après traitement (Samson et al. 1997; Tsuzuki et al. 1996; Sekiguchi 1999).

L'administration d'AM à de plus faibles doses (non létales) à des souris *Mgmt^{ko}* provoque une incidence élevée de lymphomes (Glassner et al. 1999; Takagi et al. 2003), ou d'autres tumeurs selon l'AM utilisé (Sakumi et al. 1997). L'inhibition de la MGMT par la O6BzG favorise aussi l'activité anti-tumorale du témozolomide chez la souris (Friedman et al, 1995; Wedge & Newlands, 1996).

Dans des modèles d'oncogénèse spécifique d'organe, il a également été montré :

- Chez des souris chez qui une expression de la MGMT humaine était induite dans les kératinocytes, une diminution de l'incidence des tumeurs cutanées après traitement par AM et promotion tumorale spécifique de la peau (Becker et al. 1996), ainsi qu'une diminution de la transformation de lésions cutanées bénignes en tumeurs malignes (Becker et al. 2003).
- Chez des souris transgéniques exprimant la MGMT dans le côlon à un taux 5 fois plus élevé que les souris sauvages, une diminution significative de la formation de lésions précancéreuses (ACF) après administration d'un AM spécifique du côlon (Azoxy méthane, AOM) (Zaidi et al. 1995). Ce phénomène s'accompagnait d'une diminution des mutations en transition dans l'oncogène *KRAS*.
- De la même façon, l'inhibition de la MGMT par l'O6BzG chez des rats engendre une augmentation de l'incidence des tumeurs coliques après traitement par AOM (Wali et al. 1999), et chez la souris le modèle associant l'administration d'AOM et de DSS entraîne également une incidence élevée de tumeurs coliques chez les souris *Mgmt^{ko}* ce qui suggère un rôle protecteur crucial de la MGMT dans ce contexte d'inflammation chronique.

En cas de déficience du système MMR, les souris *Mgmt^{ko}* et *Mlh1^{ko}* sont très résistantes (sur le plan de la survie) au traitement par MNU, mais présentent un taux très élevé de tumeurs (Kawate et al. 1998). Les souris *Mgmt^{ko}* et *Mlh1^{+/-}* sont en revanche asymptomatiques en l'absence de traitement, mais elles développent des lymphomes MSI lorsqu'elles sont traitées avec un agent méthylant (MNU), alors que les souris *Mgmt^{wt}* et *Mlh1^{+/-}* restent asymptomatiques (Kawate et al, 2000). De la même façon dans le modèle de carcinogénèse colorectale AOM/DSS les souris *Mgmt^{ko}* déficientes pour *Msh6* sont plus résistantes mais développent plus de tumeurs colorectales (Kawate et al. 1998).

3. Rôle de la MGMT dans l'oncogénèse colorectale MSI

a. MGMT et cancer colorectal

Environ 5% des tumeurs présentent une perte d'expression de la MGMT (Preuss et al. 1995; Kaina et al. 2007), quel que soit le type tumoral, et ce taux peut atteindre 30% dans les gliomes.

L'expression de la MGMT présente également une grande variabilité en tissu non tumoral, selon le type de tissu (Margison et al. 2003), mais également selon les individus (la différence peut être d'un facteur 8) (Heighway et al. 2003); cette variabilité pourrait être influencée par les oestrogènes (Chang et al. 1993), et par des facteurs environnementaux et génétiques.

L'hyperméthylation du promoteur du gène *MGMT* est fréquente dans les CCR compliquant une MICI (environ 50%) et dans la muqueuse saine adjacente. Il a été rapporté que la déficience en MGMT était un événement initiateur de la cancérogenèse colorectale (Chai & Brown, 2009; Shen et al, 2005). L'hypothèse est qu'une déficience en MGMT favoriserait l'émergence de clones cellulaires MMR déficients, par un phénomène de tolérance à la méthylation (Svrcek et al, 2010).

L'hyperméthylation du promoteur du gène *MGMT* a également été décrite dans des ACF, ce qui suggère que la perte d'expression de la MGMT pourrait être un événement précurseur très précoce de l'oncogénèse (Chan et al. 2002).

b. MGMT et tumeurs MSI

Des travaux récents de notre laboratoire ont permis d'établir qu'une perte d'expression de la MGMT dans la muqueuse digestive était un événement particulièrement fréquent dans le contexte de la survenue d'un cancer colorectal MSI chez les patients (Svrcek et al. 2010). En d'autres termes, ces données suggèrent que la déficience en MGMT au niveau de la muqueuse colique pourrait constituer un événement précoce favorisant l'émergence de tumeurs MSI, soit par méthylation du promoteur de *MLH1*, soit par la survenue de mutations dans la séquence codante des gènes MMR.

Dans la continuité de ces résultats, il a également été rapporté une perte d'expression très fréquente de la MGMT dans les lymphomes MSI alors que l'expression de cet enzyme restait significative dans des lymphoproliférations MSS (Borie et al. 2009).

4. Notion de défaut de champ en MGMT

Dans le contexte de la survenue d'un cancer colorectal MSI, une étude de notre équipe a démontré que la perte d'expression de la MGMT ne concernait pas seulement la tumeur, mais aussi la muqueuse normale adjacente (Svrcek et al. 2010). Ce phénomène appelé « défaut de champ » en MGMT est plus souvent retrouvé dans les CCR MSI que les CCR MSS, ce qui suggère que la tolérance à la méthylation due à la déficience en MGMT pourrait être une étape précoce menant à la déficience MMR dans le développement des tumeurs MSI, et ce dans différents contextes cliniques, qu'il s'agisse de tumeurs MSI sporadiques, héréditaires ou s'inscrivant dans un contexte de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI).

Ce défaut de champ en MGMT a également été décrit dans le contexte de tumeurs cérébrales perdant l'expression de la MGMT, où il existe également une perte d'expression dans le tissu normal adjacent (Silber et al. 1996).

C. Implications thérapeutiques

Le rôle de la MGMT a été bien étudié chez les patients atteints de glioblastome et traités par Temozolomide. Les patients ayant, au niveau de leur tumeur, une perte d'expression de la MGMT par hyperméthylation du promoteur présentent une sensibilité accrue aux AM ; ils répondent mieux au traitement et ont un meilleur pronostic (Hegi et al. 2005; Nagel et al. 2017). A l'inverse, certaines mutations survenant sur les histones dans les gliomes peuvent provoquer une hypométhylation globale, qui touche également le promoteur de la *MGMT* qui est à nouveau exprimée, ce qui provoque une résistance au Temozolomide (Abe et al. 2018). Dans de nombreux types tumoraux, l'analyse de la

méthylation du promoteur de la *MGMT* permettrait de prédire la réponse des patients aux chimiothérapies qui comportent des agents alkylants (Esteller et al, 2000).

Dans les gliomes, les mutations d'un gène du système MMR sont des événements rares au moment du diagnostic, mais elles sont observées fréquemment dans les tumeurs traitées par Temozolomide qui développent secondairement une résistance au traitement (Yip et al. 2009; Atkins et al. 2015; Gil Del Alcazar et al. 2016; Erasmus et al. 2016) et dans les tumeurs qui récidivent après traitement (Shinsato et al. 2013); ce phénomène est expliqué par une sélection des clones MMR déficients par le biais de la tolérance à la méthylation.

Dans le CCR, ce rôle a été moins étudié ; les agents méthylants comme le temozolomide, procarbazine ou la dacarbazine ne font pas partie des chimiothérapies classiques utilisées dans le traitement du CCR ; leur manque d'efficacité décrit dans un contexte de CCR métastatique (Içli et al. 1999; Akbulut et al. 2004; Khan et al. 2008) peut s'expliquer par le taux relativement élevé de tumeurs conservant l'expression de la *MGMT* (Christmann et al. 2011). Par ailleurs, les CCR MSI ont une forte probabilité de résister aux traitements par AM, à cause du phénomène de tolérance à la méthylation. Cependant dans les CCR MSS qui perdent l'expression de la *MGMT*, une étude pilote a suggéré que ce traitement pourrait être efficace (Hoff et al. 2010). De la même façon, l'inhibition de la *MGMT* par l'O6BzG pourrait être une piste pour augmenter l'efficacité de ce traitement (Kaina et al. 2010). Plusieurs études récentes suggèrent que dans un contexte métastatique et en cas d'échappement thérapeutique, les patients ayant une tumeur MSS avec perte d'expression de la *MGMT* pourraient bénéficier d'une chimiothérapie par des agents alkylants (Shacham-Shmueli et al. 2011; Amatu et al. 2013; Minoo 2013), mais ces résultats restent préliminaires.

TRAVAUX DE RECHERCHE

I. Etude Morphologique

Dans cette étude morphologique nous nous sommes intéressés aux cryptes MMR déficientes dans différents contextes cliniques de cancer colorectal (CCR) MSI : les CCR développés dans le cadre d'un syndrome de Lynch (n=44), les CCR sporadiques (n=27) et les CCR étiquetés « Lynch-like » (n=5). Nous avons pour cela réalisé une étude en immunohistochimie sur des coupes sériées (marquage MGMT et marquage MMR selon la perte observée dans la tumeur), en muqueuse adjacente à la tumeur pour tous les patients, et en muqueuse à distance chez les patients Lynch (n=26) et « Lynch-like » (n=3) pour lesquels le matériel était disponible.

Nous avons cherché dans un premier temps à déterminer si la présence de cryptes MMR déficientes (MMR-DCF) était spécifique du syndrome de Lynch, comme une étude récente le suggérait (Pai et al. 2018). Nous avons identifié des MMR-DCF chez 14 patients Lynch (32%), et confirmé cette spécificité dans notre série puisqu'aucun des 27 patients ayant un CCR sporadique ne présentait de MMR-DCF (p=0,002). Un patient du groupe des « Lynch-like » présentait des MMR-DCF.

Nous avons ensuite cherché à déterminer si ces lésions survenaient plus fréquemment en muqueuse adjacente ou, au contraire, à distance de la tumeur ; les muqueuses adjacente et à distance n'avaient en effet pas été étudiées séparément dans les données de la littérature. Nos résultats montrent que le ratio de MMR-DCF est plus élevé en muqueuse adjacente qu'à distance (7,6 vs 1,9) même si un petit nombre de cas on retrouvait des MMR-DCF à distance et non en adjacent (n=2/49, patients Lynch et « Lynch-like »).

Nous avons également étudié la corrélation entre le défaut de champ en MGMT et la survenue de MMR-DCF. Notre hypothèse était en effet que la déficience en MGMT serait un événement précurseur de la survenue de cryptes MMR-DCF, et donc de la carcinogénèse MSI, *via* le phénomène de tolérance à la méthylation. Nous avons mis en évidence l'existence d'un défaut de champ en MGMT chez 8 (18%) des patients atteints de CCR dans le cadre d'un syndrome de Lynch, et 6 (22%) des patients ayant un CCR sporadique. Nous avons montré que la présence de cryptes MMR-DCF était inversement proportionnelle à

l'intensité d'expression de la MGMT ($R=-0,97$), et était corrélée à l'existence d'un défaut de champ en MGMT (8/13 vs 0/31, $p<0,001$).

Ces résultats suggèrent que la présence d'un défaut de champ en MGMT serait un événement précurseur de l'apparition de cryptes MMR-DCF chez les patients atteints de syndrome de Lynch et nous ont conduits à décrire un scénario en plusieurs étapes du déficit en MGMT à la formation d'un CCR MSI [Figure 17].

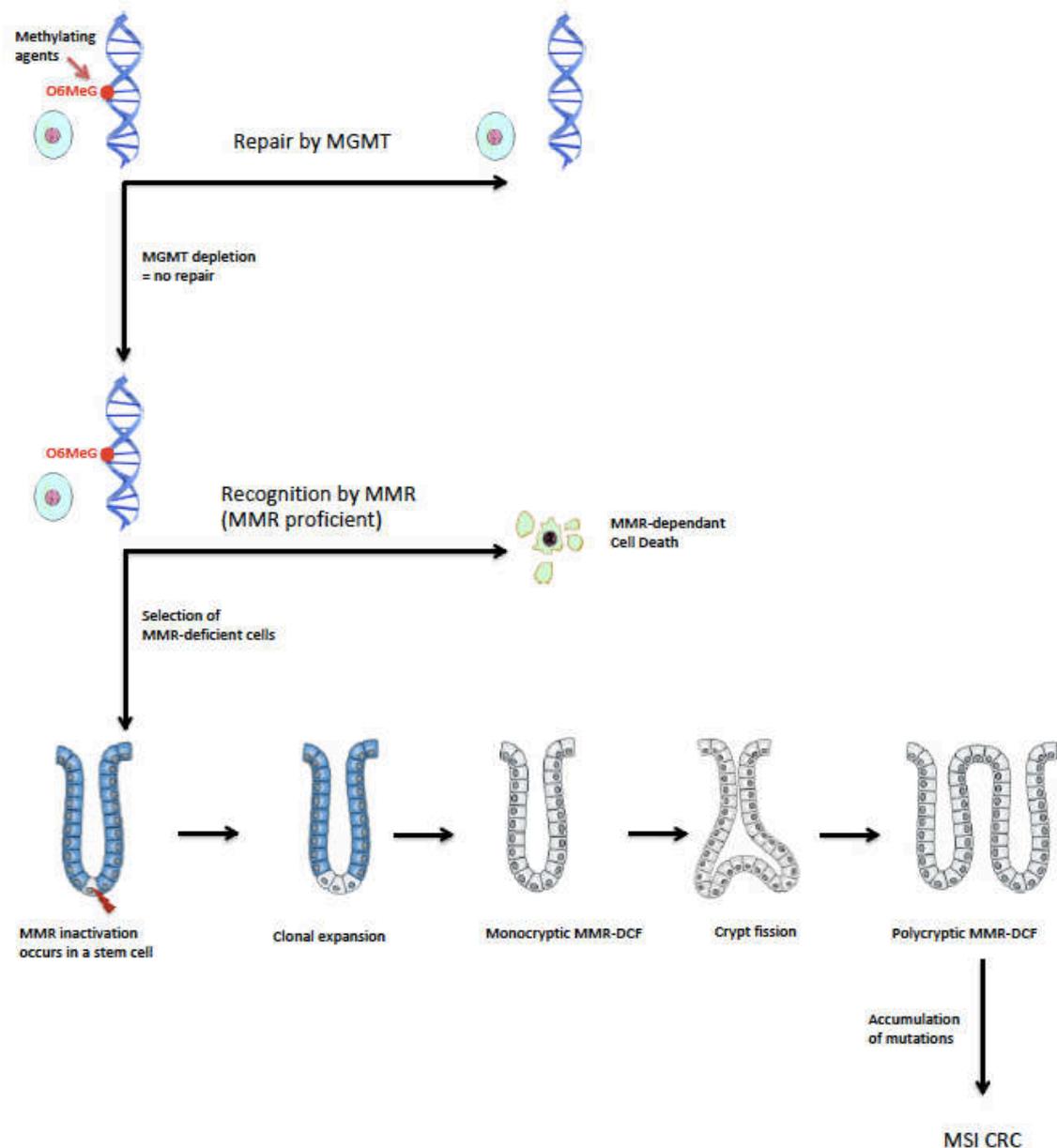


Figure 17 : Scénario de carcinogénèse MSI favorisée par la déficience MGMT

Article en cours de soumission (non finalisé)

The inactivation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) constitutes an initiating step in the occurrence of colonic MisMatch Repair Deficient crypt foci in patients with Lynch syndrome.

Isabelle Sourrouille*, Nathalie Chéreau*, Mouna Chouchène, Delphine Bouvet, Olivier Buhard, Sylvie Dumont, Fatiha Merabtène, Tatiana Ledent, Ada Collura, Olivier Lascols, Pascale Cervera, Jean-François Fléjou, Alex Duval, Martine Muleris\$, Magali Svrcek\$

*Equal contribution

\$ Co-leadership

Abstract word count: 292 (<300 words)

Manuscript word count:

Abbreviations:

MSI: microsatellite instable

LS: Lynch Syndrome

LLS: Lynch-like syndrome

AM: adjacent mucosa

DM: distant mucosa

MMR: mismatch repair

MGMT: O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase

CRC: colorectal cancer

Spo: sporadic

ABSTRACT

The occurrence of an O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) field defect in the colonic mucosa may be a crucial event favoring the selection of mismatch repair (MMR)-deficient cells and the subsequent development of tumors displaying microsatellite instability (MSI). Recently, MMR-deficient crypt foci (MMR-DCF) were described in the non-neoplastic intestinal mucosa of Lynch syndrome (LS) patients, the hereditary form of MSI tumors. Since tolerance of MMR-deficient cells to methylation DNA damage is expected to be a driving force solely in the setting of a loss of the repair enzyme MGMT, we investigated whether MMR-DCF arise preferentially in areas of colonic mucosa displaying loss of MGMT expression. Using immunohistochemistry, the presence of MMR-DCF was screened in non-neoplastic intestinal mucosa from patients with LS-associated CRC (LS-CRC) (n=44), patients with sporadic MSI CRC (Spo-CRC, n=27) and Lynch-like syndrome-associated CRC (LLS-CRC, n=5), distinguishing mucosa adjacent (AM) or distant (DM) from the tumor. The matched MGMT expression was evaluated on a paired serial slide using immunohistochemistry. Overall, MMR-DCF were detected in 14/44 (32%) LS-CRC, 1/5 LLS-CRC and 0/27 Spo-CRC. The incidence of MMR-DCF was four times higher in AM than in DM. MMR-DCF were significantly more frequent in mucosa displaying loss of MGMT expression ($p=0.004$, Fisher exact test). These results confirm that MMR-DCF are only observed in the setting of LS. Moreover, we demonstrate that these precursor lesions occur preferentially within areas of mucosa that lacked MGMT expression. Based on these findings, we depict a functional scenario for the emergence of MSI CRC in the intestinal mucosa of LS patients.

INTRODUCTION

Lynch syndrome (LS) is the most prevalent hereditary colorectal cancer (CRC) predisposition syndrome resulting in approximately 30 000 cases of CRC per year^{1,2}. This syndrome is mostly characterized by early-onset colorectal and endometrial cancer. LS-related tumors show alterations in the length of microsatellites called microsatellite instability (MSI), which highlights a defective DNA mismatch repair (MMR) pathway. The MMR system is responsible for recognition and subsequent elimination of mismatched base pairs and insertion/deletion loops due to strand misalignment that are formed during DNA replication and left behind by the replicative polymerases. LS patients have one inherited defective allele of an MMR gene (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* or *PMS2*) and thus they are cancer-prone since somatic inactivation of the single remaining wild-type allele will cause defective MMR that leads to accumulation of spontaneous genomic mutations and may result in cell transformation. Constitutional deletion of the *EPCAM* (*TACSTD1*) gene that generates epigenetic silencing of the *MSH2* gene as well as germline *MLH1* or *MSH2* epimutations, although rarer, may also cause LS.³ LS patients are not the only group of patients with MMR-deficient CRC and most MSI CRC occur in a sporadic setting (Spo-CRC), in patients with an older age and consecutively to acquired somatic bi-allelic hypermethylation of *MLH1* gene promoter. The *BRAF V600E* mutation is seen in approximately 50 to 70% of CRC with *MLH1* promoter methylation.⁴ In some cases, patients have tumors with deficient MMR protein expression, but no evidence of a pathogenic germline variant in MMR or *EPCAM* genes and, if the tumor is *MLH1*-deficient, no evidence of a *BRAF V600E* mutation or *MLH1* promoter hypermethylation within the tumor. These patients are labeled as having “Lynch-like” syndrome (LLS). Potential explanations for LLS include: (1) failure to detect germline MMR gene alterations

using currently available testing methods, (2) biallelic somatic mutations,^{5,6} and, very rarely (3) somatic mosaicism.⁷

In addition to its role in editing replication errors, the MMR system also mediates the toxicity of certain DNA lesions, such as O⁶MeG adducts.⁸ Such lesions are formed during normal cell metabolism, but can also be generated extensively in certain situations, such as chronic inflammation, nitrosamine-rich diet or treatment with methylating agents, like temozolomide (TMZ), procarbazine and dacarbazine. O⁶meG lesions are regular substrates for the repair enzyme O⁶-methylguanine-DNA-methyl-transferase (MGMT). MGMT directly reverses the damage by excising O⁶Me; in doing so, it turns into an inactive form that is immediately degraded.⁹ Therefore a high number of O⁶MeG lesions could result in excessive uptake in the tissue and loss of MGMT expression.^{10,11} When MGMT repair fails and the lesion is replicated, error-prone polymerases cause misincorporation opposite the O⁶meG, which leads to mismatches that are recognized by the MMR system and processed into cell death.¹²⁻¹⁹ It has been proved *in vitro* that O⁶meG is not toxic anymore for MMR-deficient cells which resist to cell killing, a mechanism called methylation-tolerance. Thus, loss of MGMT expression provides a selective advantage to MMR-deficient cells *in vitro* in the context of DNA methylation lesions.

In a previous study, we showed that loss of MGMT expression was more frequent in tumor tissue from MSI than non-MSI CRC in different clinical contexts, including familial and sporadic settings. Loss of MGMT expression was also observed in the normal colorectal tissue and interestingly, patches of mucosa that lacked MGMT expression were more frequently found adjacent to MSI than non-MSI CRC²⁰ suggesting that an MGMT field defect could constitute an initiating step favoring *in vivo* MMR-deficiency *via* the mechanism of methylation-tolerance, which in turn may result in an MSI carcinogenesis. In the herein

study, we aimed to further investigate the relationship between MMR-deficiency and MGMT expression in intestinal mucosa, taking advantage of the recently described MMR-deficient crypt foci (MMR-DCF). MMR-DCF are a morphological entity characterized by loss of MMR protein in normal intestinal crypts, which has been identified in the non-neoplastic mucosa of patients with LS as the manifestation of biallelic MMR gene inactivation.^{21,22} We hypothesized that MMR-DCF would arise preferentially in areas of normal colonic mucosa displaying loss of MGMT expression. To this end, we systematically searched the intestinal mucosa for MMR-DCF and investigated the matched MGMT expression by immunohistochemistry in patients with MSI CRC from the different clinical settings.

MATERIALS AND METHODS

Patients and samples

MSI colorectal (CRC) adenocarcinomas with adequate paraffin-embedded formalin fixed (FFPE) samples available were collected from the Pathology Department of Saint Antoine Hospital, APHP, Paris, France, among resections performed from 2000 to 2015. Ethics approval was obtained from the Human Research Ethics Committee of the hospital. All tumors were routinely previously screened for MSI status using a single fluorescent multiplex system comprising 5 quasi-monomorphic mononucleotide repeats (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 and NR-27).²³ Tumoral expression of MMR protein (MLH1, MSH2, MSH6 and PSM2) was also routinely previously tested using immunochemistry.²⁴ Loss of MMR protein expression in CRC was defined as complete absence of nuclear staining within tumor cells with concurrent positive internal controls.

The series was composed of 76 CRC. For tumors displaying loss of MLH1 protein, the DNA methylation pattern for the *MLH1* promoter region was determined by methylation-specific PCR of bisulfite-treated DNA²⁵ and tumors were classified as LS-related or sporadic according to the absence or presence of *MLH1* promoter methylation, respectively. The search of a pathogenic germline variant in MMR genes was performed for patients with tumors displaying loss of either MSH2 or MSH6 proteins or MLH1 protein with absence of *MLH1* promoter methylation.

Altogether, 27 CRC were classified as sporadic CRC (Spo-CRC). LS was confirmed by identification of a germline mutation in one of the MMR genes in 44 patients with CRC (LS-CRC). In the remaining 5 CRC patients, no germline mutation was identified; these cases have been studied before, and were neither linked to bi-allelic somatic mutation, nor to germline mosaicism. These patients are referred to as with “Lynch-like” syndrome (LLS-CRC, n=5).⁵

For each patient, we selected at least 2 paraffin-embedded samples, including adjacent non-neoplastic colonic mucosa (AM), defined as mucosa detected on the same histological slide as the tumor (within 1 cm). For patients with LS or LLS-CRC, we also selected at least 2 paraffin-embedded samples including non-neoplastic colonic mucosa distant from the tumor (over 10 cm) (DM), when available (in 26 LS-CRC and 3 LLS-CRC). We did not analyze distant normal colonic mucosa in patients with sporadic CRC given that we did not identify any MMR-DCF in adjacent mucosa in that group of patients.

Procedures

Three to four serial sections of 4 µm were prepared from each paraffin-embedded block.

One was incubated with an MGMT mouse monoclonal antibody for 60 min (clone MT3:1, Thermo Fisher Scientific; dilution 1:50), and the two others were incubated with the MMR antibody (BD Biosciences) corresponding to the protein that was identified to be lost in tumoral cells (MLH1: clone G168-728, concentration 0.5mg/mL, dilution 1:400; MSH2: clone G219-1129 concentration 0.5mg/mL, dilution 1:25 or MSH6: clone 44, concentration 250 ug/mL, dilution 1:100).

MGMT-stained sections were scored for the intensity of staining as previously described:²⁰ (0, no staining, 1, weak staining, 2, moderate staining, 3, intense staining) and classified as present (score 2-3) or lost (score 0-1). Internal positive controls were provided in each section by stromal cells within the lamina propria and lymphocytes.

MMR-stained sections were analyzed looking for MMR-DCF, defined as complete MMR loss of expression occurring in one or several crypts that do not present any dysplastic features, with concurrent nuclear expression in adjacent stromal cells and lymphocytes. We considered as MMR-DCF only MMR deficient crypts surrounded by MMR proficient crypts to avoid technical bias due to staining. The total number of crypts in each section was counted in order to calculate the MMR-DCF/analyzed crypts ratio. The number of crypts with loss of expression was recorded. These MMR deficient clusters were classified according to the number of crypts composing the focus as described previously: monocryptic (1crypt), oligocryptic (2 to 4 crypts) or polycryptic (>4 crypts).²¹ When MMR deficient crypts were identified at the same location on several serial sections, they were considered as a single MMR-DCF; we considered in this case that the number of crypts composing the MMR-DCF was the highest number identified in a single serial section. Conversely, all MMR deficient crypts were counted as the sum of crypts identified on the different sections when considering the MMR-DCF/analyzed crypts ratio. In order to estimate the MMR-deficient

crypt number as function of mucosa area, we used the calculation of Kloor:²¹ mucosal surface = crypt number x crypt diameter².

Statistical analysis

Quantitative variables were expressed as median [Inter Quartile Range] and compared using the Kruskal Wallis test (KW test). Qualitative variables were expressed as numbers (percentages) and compared using the Chi2 test or Fisher exact test as appropriate. All tests were two sided, and statistical significance was defined by $p < 0.05$. Statistical analysis was performed using the statistical package R, version 2.15.2 (2012, The R Foundation for Statistical Computing).

RESULTS

Baseline characteristics of the patients

The cohort included patients with LS-associated CRC (n=44), patients with LLS-associated CRC (n=5) and patients with sporadic MSI CRC (n=27). Median age was similar in LS-CRC and LLS-CRC patients (56 [48-61] and 49 [46-61] years, respectively, $p = 0.541$; KW test) and significantly higher in Spo-CRC patients (80 [76-85] years, $p < 0.001$; KW test). The MMR mutation in LS-CRC patients involved the *MSH2* (27/44, 61.4%), *MLH1* (16/44, 36.3%) or *MSH6* (1/44, 2.3%) gene. MMR loss observed in the tumor of LLS-CRC patients involved *MSH2* (n=3) or *MLH1* (n=2) protein. Baseline characteristics of the patients are detailed in *Table 1* and *Supplementary Table 1*.

Prevalence of MMR-DCF in patients with MSI CRC from different clinical settings

We systematically screened the intestinal mucosa located adjacent (AM) to the tumor to search for MMR-DCF and evaluate their incidence in the different sets of patients. In addition, intestinal mucosa distant (DM) from the tumor was also screened in 26/44 LS-CRC patients and 3/5 LLS-CRC patients with available material. Overall, a total of 95 110 crypts (representing a surface of 7.7 cm²) were analyzed in LS-CRC patients, 14 540 crypts (representing a surface of 1.2 cm²) in LLS-CRC patients, and 30 550 crypts (representing a surface of 2.5 cm²) in Spo-CRC patients (Table 1). MMR-DCF were identified in the normal mucosa of 15/76 patients including 14/44 (32%) LS-CRC patients. Interestingly, MMR-DCF were also identified in 1/5 LLS-CRC patient but in none (0/27) of the Spo-CRC patients ($p=0.002$; Fisher exact test) (Table 2, Figure 3).

Overall, a total of 86 MMR-deficient crypts distributed in 29 foci were identified. It includes 64 MMR-deficient crypts distributed in 19 foci (6 monocryptic, 7 oligocryptic and 6 polycryptic) in 13 patients in AM, the number of MMR-deficient crypts ranging from 1 to 20 and multiple foci being detected in 4 patients, and 22 MMR-deficient crypts distributed in 10 foci (3 monocryptic and 7 oligocryptic) in DM. Most (8/9, 89%) of the patients with MMR-DCF in DM also presented MMR-DCF in AM. The MMR-DCF found in the LLS-CRC patient comprised 2 monocryptic foci identified in DM. Characteristics of all patients are detailed in *Supplementary Table*.

Relationship between detection of MMR-DCF and number of crypts analyzed

Since the number of crypts analyzed for each patient was highly heterogeneous (median 445 [255-895]) due to the material available, we sought to evaluate whether this variability could introduce a bias analysis in the number of MMR-DCF detected.

Regarding AM, which was available in all patients, the median number of crypts analyzed per patient was 440 [265-818] in LS-CRC patients, 880 [250-900] in LLS-CRC patients and 745 [610-1403] in Spo-CRC patients. We did not find any correlation between the number of MMR-DCF that were detected and the number of crypts analyzed in LS-CRC. The number of patients with MMR-DCF was similar when the number of crypts analyzed was above or below the median value (6/22 vs 6/22, $p=0.747$; Chi2 Test). The number of patients with MMR-DCF according to the number of crypts screened, as well as the individual data for each LS-CRC patient are represented in the *Supplementary figure*. However, it is noteworthy that MMR-DCF were never identified when the number of crypts analyzed was below 150.

Estimate of the rate of MMR-DCF according to the distance to the tumor in LS

The median number of crypts analyzed in LS patients was significantly higher in DM than in AM (2900 [1140-3160] vs 440 [265-818] respectively, $p<0.001$; KW test) due to the availability of a larger number of paraffin blocks. When reported to the surface of mucosa, a mean of 1.9 MMR-DCF per cm^2 (i.e. 1 MMR-DCF out of 6424 crypts) was identified in DM, compared to 7.6 MMR-DCF per cm^2 (i.e. 1 MMR-DCF out of 1624 crypts) in AM. Most of the LS-CRC patients (8/14) had MMR-DCF both in AM and DM, 5 had MMR-DCF only in AM, and 1 only in DM. So, even if the rate of LS-CRC patients with MMR-DCF was similar when considering AM or DM, (13/44 vs. 9/26 respectively, $p=0.791$; Chi2 Test), the ratio of MMR-DCF relative to the surface of mucosa analyzed was four times higher in AM than in DM. In this series, only two patients presented MMR-DCF solely in DM; for one of them (LLS-CRC patient n° 76), the number of crypts that could be analyzed in AM ($n=110$) was below the detection limit which was not the case ($n=3100$ crypts) for the other one (LS-CRC patient n°21). This suggests that identification of MMR-DCF only in DM may be a rare event when

the surface of adjacent mucosa analyzed is sufficient. On the contrary in 5/13 patients (38%), MMR-DCF were detected only in AM although the number of crypts analyzed in DM was above the median value. The estimated MMR-DCF ratio that could be estimated in LLS-CRC patients was comparable to that found in LS-CRC patients (2.4 vs. 1.9 MMR-DCF/cm² in DM, respectively).

MGMT expression and relationship with MMR-DCF occurrence

We next assessed MGMT expression by immunohistochemistry in the intestinal mucosa, in order to evaluate the correlation between MGMT expression and the presence of MMR-DCF. MGMT expression was lost in the adjacent mucosa from 15/44 LS-CRC patients (34%), all with grading 1 (weak expression) (*Figure 2*). MGMT deficiency was significantly more frequent in patients with MMR-DCF (9/13, 69%) than in patients without MMR-DCF (6/31, 19%), $p=0.004$; Chi2 Test (*Figure 3A*, *Table 2*). Interestingly, the rate of patients with MMR-DCF was found inversely correlated to MGMT expression intensity ($R=-0.97$) since 9 patients of 15 (60%) with grading 1, 4/22 (18%) patients with grading 2 and 0/7 patients with grading 3 demonstrated MMR-DCF in AM (*Figure 3B*).

MGMT expression was lost in the distant mucosa from 9/26 LS-CRC patients (35%), all with grading 1 (weak expression). MGMT deficiency was more frequent in patients with MMR-DCF (4/9, 44%) than in patients without MMR-DCF (5/17, 29%) but the difference was not significant ($p=0.667$; Fisher exact Test) (*Table 2*, *Figure 3A*). As observed in adjacent mucosa and despite smaller samples, the proportion of patients with MMR-DCF in distant mucosa was found inversely correlated to MGMT expression intensity, since 4 of 9 patients (44%) with grading 1, 5/16 (31%) patients with grading 2 and 0/1 patient with grading 3 exhibited MMR-DCF ($R=-0.97$) (*Figure 3C*).

We also screened MGMT expression in sporadic CRC patients. Interestingly, the rate of patients with MGMT deficiency in AM was similar in Spo-CRC and LS-CRC patients (9/27, 33% vs. 15/44, 34%; $p=0.644$; Chi2 Test) (*Table 2*). In the only LLS-CRC patient in whom MMR-DCF were identified, MGMT was found expressed in the corresponding mucosa (grading 2). Individual data about MGMT expression in tumor, AM and DM are shown in *Supplementary Table*.

Comparative paired analysis of MGMT expression within neoplastic tissue and colorectal mucosa adjacent to cancer

We next compared MGMT expression in the tumor and in AM. The proportion of patients with loss of MGMT expression (grading 0-1) in the tumor tissue was not significantly different in LS-CRC and Spo-CRC patients [10/44 (23%) and 12/27 (44%), respectively, $p=0.068$ Fisher's Exact Test] (*Table 2*). Moreover, the MGMT expression status (i.e. lost, staining 0-1 vs present, staining 2-3) was concordant in tumor and AM in most patients (35/44 (80%) and 18/27 (67%) of the LS-CRC and Spo-CRC patients, respectively). LS-CRC patients were classified into four classes according to MGMT expression profile²⁰: in 8/44 patients, MGMT expression was lost in both tumor and AM (class 1); in 27/44 patients, MGMT expression was conserved in both tumor and AM (class 2); MGMT expression status was either lost in tumor but conserved in AM (class 3) or conserved in tumor but lost in AM (class 4) in 2/44 and 7/44 patients, respectively. When patients were stratified by the presence of MMR-DCF, it appeared that a MGMT field-defect (class 1) was exclusively encountered in patients with MMR-DCF (8/13, 62% vs 0/31), $p<0.001$ Fisher exact test) (*Figure 4*). We concluded that MGMT field defect favors the occurrence of MMR-DCF.

Clinicopathological features of patients according to the presence or absence of MMR-DCF in adjacent colorectal mucosa

Finally, we compared the clinico-pathological features of LS-CRC patients according to the presence of MMR-DCF, in order to identify which LS-CRC patients are more likely to have MMR-DCF. Clinical and histological features are shown in *Table 3*. The main significant difference concerned the size of the tumor: there were less large tumors (>45mm) in patients who exhibited MMR-DCF (2/13 (16%) vs 11/31 (35%), $p=0.018$; Fisher exact test).

Tumors tended to be less often tumors $\geq T3$ in patients who exhibited MMR-DCF (7/13 (54%) vs 26/31 (84%), $p=0.057$; Fisher exact test) but the difference was not significant. The risk of developing another colorectal lesion also tended to be higher, although not significant, in patients with MMR-DCF (7/13 (54%) vs 9/31 (29%), $p=0.082$; Fisher exact test).

No difference was observed regarding the rate of MMR-DCF in carriers of *MLH1* or *MSH2* gene mutation (4/19 vs 9/30, respectively, $p=0.735$; Fisher exact test).

DISCUSSION

We show that MMR-DCF can be detected in LS-CRC patients and are not seen in patients with sporadic MSI CRC, confirming that these events are precursor lesions in LS.^{21,25} Interestingly, one patient with Lynch-like syndrome also harbored MMR-DCF. This patient is a 61 years-old man, with a loss of the MSH2 staining in the tumor. Although no germline MMR mutation or EPCAM deletion nor bi-allelic somatic MMR mutations could be identified (referred as Patient n°15),⁵ our herein results suggest that this patient may have Lynch syndrome. As recently stated, identification of MMR-DCF may thus be a helpful addition to LS diagnosis, particularly in the setting of Lynch-like syndrome.²²

However, an absence of MMR-DCF does not allow to exclude LS diagnosis since in our series, MMR-DCF were detected in only 32% (14/44) of patients, in line with recent data published by Pai et al.²² [35% (18/52) of patients with LS-CRC]. One of the explanations could be the restricted number of crypts that could be assessed in non-neoplastic colonic mucosa due to the limited number of available blocks for each patient (only 2 to 4), because of the retrospective nature of our study, as well as the limited amount of usable mucosa for crypts analysis in adjacent mucosa, located within 1 cm to cancer, and defined as the non-neoplastic mucosa detected on the same histological slide as the tumor. In their study, Pai et al. estimated, using a binomial distribution, that immunohistochemical evaluation of all colonic crypts in 26.3 mm² of colonic mucosa would have a 95% probability of identifying at least one MMR-DF. Practically, they calculated this could be accomplished by immunohistochemical evaluation of 10 sections cut at 90 µm intervals from 30 mm of normal mucosa obtained from surgical resection specimens.

Unlike previous studies, we searched for MMR-DCF by analyzing separately the

mucosa adjacent (<1cm) and distant from the tumor (>10 cm). By doing so, we demonstrated that the ratio of MMR-DCF was four times higher in adjacent than in distant mucosa (7.6 vs 1.98 MMR-DCF per cm², respectively). Moreover, multiple foci were encountered only in AM suggesting that MMR-DCF accumulate over time and thus favor the emergence of cancer. Based on our findings, we can propose that testing normal colonic mucosa for MMR-DCF in CRC patients highly suggestive of LS should be performed preferentially in mucosa adjacent rather than distant to the cancer. In their proof-of-concept study, Kloor et al. reported that incidence of MMR-DCF in LS carriers was about 1 per cm² and that MMR-DCF were present in all LS-CRC patients from whom more than 1 cm² surface of intestinal mucosa could be analyzed²¹. If only mucosa adjacent to cancer is screened, we could consider that MMR-DCF should be present in all LS-CRC patients from whom at least 0.13 cm² surface of mucosa is analyzed.

The incomplete penetrance of inherited MMR gene defects suggests that additional genetic or environmental factors influence tumor development in LS patients. Data from a mouse model of LS showed that environmental factors such as exposure to the methylating agent temozolomide (TMZ) can increase the number of these MMR-DCF and therefore strongly increase intestinal tumor development.²⁶ TMZ can cause methylation of the O6 position of guanine, lesions which are repaired by MGMT. In a previous study, we showed that loss of MGMT expression was more frequent in tumor tissue from MSI than non-MSI (microsatellite stable) CRC and that patches of non-neoplastic mucosa that lacked MGMT expression were more frequently found adjacent to MSI than non-MSI CRC.²⁰ Therefore, we hypothesized that an MGMT field defect in the non-neoplastic colorectal mucosa may be an initiating step favoring *in vivo* MMR-deficiency. In the herein study, by investigating the concomitant MMR and MGMT expression in the normal intestinal mucosa, we

demonstrated that MMR-DCF occur significantly more frequently in patches of adjacent mucosa that lack MGMT expression ($p=0.004$). Moreover, comparative paired analysis of MGMT expression within neoplastic tissue and mucosa adjacent to cancer demonstrated that a MGMT field-defect was exclusively encountered in patients with MMR-DCF. Despite the fact we also observed a MGMT field defect in sporadic MSI CRC, we did not observed any MM-DCF in sporadic MSI CRC.

Overall, these findings set the basis of a multi-step functional scenario for the emergence of MSI CRC in LS patients: (1) In MGMT depleted colonic cells the unrepaired O^6 meG lesions trigger an MMR-dependent cell death pathway. This hypothesis finds evidence in *in vivo* study showing that mice with MGMT deficiency showed an elevated level of cells undergoing cell death in the colon crypts after administration of a methylating agent, which is no longer observed in mice on an MGMT/MMR-defective background.²⁷ (2) This cellular context of MGMT depletion would promote selection of mutant MMR-defective cells that escape death since MMR deficiency confers cellular tolerance to O^6 meG lesions. Somatic inactivation of the MMR system is facilitated in patients with LS who already carry one germline mutation in MMR genes. (3) MMR inactivation could occur in stem cell within a colon crypt and then colonizes the crypt to result in a monocryptic MMR-deficient focus. (4) Over time, mutated crypts can undergo fission, producing adjacent, clonally related polycryptic MMR-deficient crypt foci, consistent with current models inferring dynamics of human colon crypts.^{28,29,30} According to this scenario, MMR-DCF were previously shown to present with aberrant branching and fissions of crypts.²¹ (5) Finally, MMR-deficiency leads to accumulation of spontaneous genomic mutations that could result in cell transformation. It should be noted that alterations in microsatellite-bearing genes have been identified in

MMR-DCF.³¹ In a mouse model of LS, it was demonstrated that the risk for tumor development is determined by the size of the MMR defective compartment.²⁶ In the same manner, the accumulation of MMR-DCF in specific areas of the colorectal mucosa would promote the emergence of MSI CRC in patients with LS.

In summary, our hypothesis is that emergence of MMR-DCF and thus of MSI CRCs is favored by the combined occurrence of 3 events in the colonic crypts, i.e. presence of O⁶meG DNA lesions, a defective MGMT expression and constitutive inactivation of one MMR allele.

It is still unclear if the same molecular mechanism is involved in small bowel carcinogenesis from LS patients. Similar to Pai et al., we did not find any MMR-DCF in small bowel mucosa adjacent to cancer in a small series of 6 patients with 4705 crypts analyzed (data not shown). In contrast, the group of Kloor identified MMR-DCF in the intestinal mucosa from 4/10 LS patients with small bowel cancer^{21,31}. We found a loss of MGMT expression in adjacent mucosa from 1/6 patients, a rate similar to that observed in adjacent mucosa to CRC (p=0.652, Fisher exact test). However, it should be noted that our cohort is small and a larger multicenter study would be needed to resolve this issue.

Regarding clinicopathological characteristics of tumors associated to MMR-DCF, the only significant difference was a higher rate of large tumors. Unlike Staffa,³¹ we did not observe any correlation between the number of MMR-deficient crypts clusters and the age of the patient.

Moreover, our results suggest that LS patients should be more sensitive to carcinogens such as *N*-nitroso compounds (NOC), which may lead to the formation of O⁶meG lesions. NOC can arise either exogeneously, especially in cigarette smoke, processed meat, smoked fish,

cheese and beer, or endogenously in the colon lumen.³² MGMT was shown as a major defense against NOC-induced DNA damage and colorectal cancer formation. It is reasonable to postulate that regular consumption of high levels of processed and red meat will overwhelm MGMT activity in the large bowel, resulting in the initiation of persistent O⁶MeG lesions that could notably promote MMR-deficiency especially in LS patients who already presented with the first genetic hit towards MMR-deficiency. Accordingly, one could consider that LS patients should adopt a nitrosamine-low diet. Since another exogenous source of O⁶MeG lesions is alkylating anti-cancer drugs, it should also be recommended not to expose LS patients to such anticancer therapy, such as TMZ, the standard care in the treatment of glioblastoma multiforme, a tumor type that occasionally develops in LS patients.³³

TABLES

Table 1: Baseline characteristics of the patients

	SL-CRC n=44	Spo-CRC n=27	"Lynch-like"-CRC n=5	P value
Age (years), median [IQR]	56 [48-61]	80 [76-85]	49 [46-61]	<0.001
Male, n, %	29 (65.9%)	9 (33.3%)	3 (60.0%)	0.022
Right Colon, n, %	23 (52.3%)	24 (88.9%)	3 (60.0%)	0.009
MMR gene mutation				
MLH1, n, %	16 (36.4%)	27 (100.0%)	2 (40.0%)	
MSH2, n, %	27 (61.4%)	-	3 (60.0%)	<0.001
MSH6, n, %	1 (2.3%)	-	0 (0.0%)	
Number of crypts analyzed				
Overall, n	95110	-	14540	
Adjacent mucosa, n (median [IQR])	30865 (440 [265-818])	30550 (745 [610-1403])	4040 (880 [250-900])	0.085*
Distant mucosa, n (median [IQR])	64245 (2900 [1140-3160])**	-	10500 (3500 [3250-3750])	0.174
Surface of mucosa analyzed				
Overall, n	7.7	-	1.2	
Adjacent mucosa, cm2 (median [IQR])	2.5 (0.04 [0.02-0.07])	2.5 (0.06 [0.05-0.11])	0.3 (0.07 [0.02-0.07])	
Distant mucosa, cm2 (median [IQR])	5.2 (0.23 [0.09-0.26])	-	0.9 (0.28 [0.26-0.30])	
Patients with MMR-DCF				
Adjacent mucosa, n, %	13 (29.5%)	0 (0%)	0 (0%)	0.002
MLH1	4	0	0	
MSH2	9	0	0	
Distant mucosa (n=26), n, %	9 (34.6%)	-	1 (20.0%)	1
MLH1	1	-	0	
MSH2	8	-	1	
Tumor size (cm), median [IQR]	45 [30-70]	65 [50-94]	60 [43-70]	0.105
Perineural involvement, n, %	14 (31.8%)	1 (3.7%)	1 (20.0%)	0.013
Perivascular embols, n, %	19 (43.2%)	10 (37.0%)	1 (20.0%)	0.658
Tumor stage T3-T4, n, %	33 (75.0%)	26 (96.3%)	4 (80.0%)	0.043
Lymph nodes involvement, n, %	17 (38.6%)	16 (59.3%)	1 (20.0%)	0.156
Poorly differentiated tumor, n, %	12 (27.3%)	6 (22.2%)	0 (0.0%)	0.527

*the difference was significant between SL-CRC and Spo CRC (p=0.003)
**the difference was significant between AM and DM (p<0.001)

Table 2: MGMT grading and MMR-DCF in colorectal mucosa in different clinical contexts

		Immunohistological MGMT expression				Total
		Negative		Positive		
		Grading 0	Grading 1	Grading 2	Grading 3	
Tumor from LS patients	Overall	0	10 (23%)	20 (45%)	14 (32%)	44
	MMR-DCF	0	10 (77%)	2 (15%)	2 (15%)	13
	no MMR-DCF	0	0 (0%)	18 (58%)	12 (39%)	31
Adjacent mucosa from LS patients	Overall	0	15 (34%)	22 (50%)	7 (16%)	44
	MMR-DCF	0	9 (69%)	4 (31%)	0 -	13
	no MMR-DCF	0	6 (19%)	18 (58%)	7 (23%)	31
Distant mucosa from LS patients	Overall	0	9 (35%)	16 (62%)	1 (4%)	26
	MMR-DCF	0	4 (44%)	5 (56%)	0 -	9
	no MMR-DCF	0	5 (29%)	11 (65%)	1 (6%)	17
Tumor from "Lynch-like" patients	Overall	0	2 (5%)	2 (50%)	3 (16%)	44
	MMR-DCF	0	0 -	0 (31%)	1 (8%)	13
	no MMR-DCF	0	2 (6%)	2 (58%)	2 (23%)	31
Adjacent mucosa from "Lynch-like" patients	Overall	0	2 (40%)	3 (60%)	0 -	5
	MMR-DCF	0	0 -	0 -	0 -	0
	no MMR-DCF	0	2 (40%)	3 (60%)	0 -	5
Distant mucosa from "Lynch-like" patients	Overall	0	0 -	3 (100%)	0 -	3
	MMR-DCF	0	0 -	1 (100%)	0 -	1
	no MMR-DCF	0	0 -	2 (100%)	0 -	2
Tumor from patients with sporadic MSI CRC	Overall	3 (11%)	9 (33%)	13 (48%)	2 (7%)	27
	MMR-DCF	0	0 -	0 -	0 -	0
	no MMR-DCF	3 (11%)	9 (33%)	13 (48%)	2 (7%)	27
Adjacent mucosa from patients with sporadic MSI CRC	Overall	0	9 (33%)	17 (63%)	1 (4%)	27
	MMR-DCF	0	0 -	0 -	0 -	0
	no MMR-DCF	0	9 (33%)	17 (63%)	1 (4%)	27

Table 3: Clinical and histological features according to presence of MMR-DCF in adjacent normal colonic mucosa in LS-CRC						
		MMR-DCF n=13	Ratio MMR-DCF	OR		P value
Age (years) > 56, n	21	6	0.29	0.92	0.20-4.04	1
Gender						
Male, n	29	7	0.24	0.48	0.10-2.28	0.313
Female, n	15	6	0.40			
Tumor location						
Right Colon, n	23	4	0.17	0.29	0.05-1.32	0.099
Other, n	21	9	0.43			
MMR gene mutation						
MLH1, n	16	4	0.25	0.67	0.12-3.15	0.735
MSH2, n	27	9	0.33			
Second colorectal lesion (at least HGD), n	16	7	0.44	3.52	0.79-16.68	0.082
Tumor size (cm) > 45mm, n	20	2	0.10	0.14	0.01-0.79	0.018
Perineural involvement, n	14	3	0.21	0.55	0.08-2.81	0.498
Perivascular embols, n	19	4	0.21	0.48	0.09-2.20	0.335
Tumor stage						
T1-T2, n	11	6	0.55	4.28	0.82-24.15	0.057
T3-T4, n	33	7	0.21			
Lymph nodes involvement, n	17	5	0.29	0.99	0.20-4.46	1
Poorly differentiated tumor, n	12	3	0.25	0.74	0.11-3.89	1
Histological subtypes						
Medullary, n	1	0	-			
Signet ring cells, n	1	0	-			
Mucinous, n	8	3	0.38	1.54	0.20-9.81	0.676

Supplementary Table: Individual Data

Patient	Age	Gender	Clinical context	Tumor location	Tumor			Adjacent mucosa		Distant mucosa		
					MMR loss	MGMT grading	MGMT grading	MMR-DCF	Crypts analyzed	MGMT grading	MMR-DCF	Crypts analyzed
1	48	M	Lynch	Right	MLH1	2	2	0	120			
2	59	F	Lynch	Rectum	MSH2	1	1	1	600			
3	64	M	Lynch	Right	MSH2	2	2	0	100	1	1	2700
4	64	M	Lynch	Left	MLH1	3	2	0	790			
5	57	M	Lynch	Right	MLH1	3	2	0	320			
6	45	M	Lynch	Rectum	MSH2	1	1	1	180	2	1	500
7	40	F	Lynch	Right	MSH2	2	3	0	950			
8	31	M	Lynch	Right	MSH2	1	1	1	480	1	1	1130
9	61	F	Lynch	Right	MSH2	1	2	1	2200	2	0	1000
10	47	M	Lynch	Transverse	MSH2	2	2	0	1290	1	0	3000
11	60	F	Lynch	Left	MSH2	2	2	0	550			
12	68	M	Lynch	Transverse	MLH1	2	3	0	450	1	0	2500
13	49	M	Lynch	Right	MSH2	2	1	0	140	2	0	440
14	60	M	Lynch	Right	MLH1	2	3	0	2600			
15	68	M	Lynch	Right	MLH1	3	2	0	620			
16	66	M	Lynch	Right	MLH1	2	2	0	380			
17	63	M	Lynch	Left	MSH2	1	1	1	450	1	1	1100
18	51	M	Lynch	Right	MSH6	3	2	0	510			
19	56	M	Lynch	Left	MSH2	2	2	1	360	2	1	4000
20	58	M	Lynch	Right	MLH1	2	1	0	400			
21	46	M	Lynch	Right	MSH2	3	1	0	3100	2	1	2800
22	42	M	Lynch	Right	MSH2	2	2	0	650	2	0	3000
23	62	M	Lynch	Right	MLH1	2	1	0	2245	2	0	2000
24	55	M	Lynch	Right	MLH1	1	2	1	440	2	0	1170
25	56	M	Lynch	Left	MLH1	1	1	1	350	2	0	3500
26	57	F	Lynch	Left	MLH1	2	1	0	270	2	0	3000
27	79	F	Lynch	Rectum	MSH2	1	1	1	150	2	1	1100
28	76	F	Lynch	Rectum	MSH2	1	1	1	240	2	1	4000
29	55	F	Lynch	Right	MSH2	3	3	0	170			
30	59	F	Lynch	Left	MSH2	3	3	0	1240			
31	39	M	Lynch	Right	MSH2	3	2	0	130			
32	51	M	Lynch	Transverse	MSH2	3	2	1	1100	1	0	3200
33	44	F	Lynch	Left	MLH1	2	1	1	400	1	1	4640
34	47	F	Lynch	Left	MLH1	3	2	0	250			
35	52	F	Lynch	Right	MSH2	2	2	0	900			
36	48	M	Lynch	Right	MSH2	2	2	0	440	2	0	3040
37	63	M	Lynch	Rectum	MSH2	2	2	0	370	2	0	3500
38	46	M	Lynch	Rectum	MSH2	2	1	0	70			
39	64	F	Lynch	Right + Left	MLH1	1	1	1	450	1	0	925
40	39	F	Lynch	Right	MSH2	3	3	0	1550			
41	50	F	Lynch	Rectum	MSH2	3	2	0	60	2	0	3000
42	58	M	Lynch	Right	MSH2	3	3	0	2130	3	0	3000
43	57	M	Lynch	Rectum	MSH2	3	2	0	360	2	0	4500
44	54	M	Lynch	Transverse	MLH1	2	2	0	310	1	0	1500
45	80	M	Sporadic	Right	MLH1	2	2	0	670			
46	74	F	Sporadic	Right	MLH1	1	1	0	745			
47	77	F	Sporadic	Right	MLH1	2	2	0	1270			
48	72	F	Sporadic	Right	MLH1	1	2	0	1250			
49	90.8	F	Sporadic	Right	MLH1	2	2	0	160			
50	88.7	M	Sporadic	Right	MLH1	2	2	0	550			
51	90.2	F	Sporadic	Right	MLH1	3	2	0	670			
52	81.3	F	Sporadic	Right	MLH1	2	1	0	2850			
53	85.1	F	Sporadic	Right	MLH1	1	1	0	4100			
54	79	M	Sporadic	Transverse + Left	MLH1	2	1	0	925			
55	64	M	Sporadic	Right	MLH1	2	2	0	1375			
56	86	F	Sporadic	Right	MLH1	2	2	0	720			
57	83	M	Sporadic	Right	MLH1	2	2	0	1565			
58	79	M	Sporadic	Right	MLH1	1	2	0	735			
59	79	F	Sporadic	Right	MLH1	1	2	0	1930			
60	87	F	Sporadic	Right	MLH1	0	1	0	360			
61	85	F	Sporadic	Right	MLH1	1	1	0	1245			
62	93	F	Sporadic	Right	MLH1	0	1	0	350			
63	77	F	Sporadic	Right	MLH1	2	1	0	1430			
64	71	M	Sporadic	Right	MLH1	0	2	0	1125			
65	81	F	Sporadic	Right	MLH1	1	1	0	215			
66	78.9	F	Sporadic	Left	MLH1	2	2	0	1750			
67	74.6	F	Sporadic	Right	MLH1	3	2	0	2200			
68	84.7	M	Sporadic	Right	MLH1	2	2	0	740			
69	74.8	F	Sporadic	Right	MLH1	1	2	0	570			
70	72.1	M	Sporadic	Left	MLH1	1	2	0	400			
71	81	F	Sporadic	Right	MLH1	2	3	0	650			
72	64	F	Lynch-like	Transverse	MLH1	1	1	0	880	2	0	3500
73	49	M	Lynch-like	Right	MLH1	2	1	0	1900			
74	24	F	Lynch-like	Rectum	MSH2	2	2	0	900	2	0	3000
75	46	M	Lynch-like	Right	MSH2	1	2	0	250			
76	61	M	Lynch-like	Right	MSH2	3	2	0	110	2	1	4000

FIGURES LEGENDS

Figure 1 : MMR Deficient Crypts Foci (MMR-DCF)

A : Monocryptic MMR-DCF; B : Oligocryptic MMR-DCF ; C : Polycryptic MMR-DCF.
MSH2 staining (x100).

Figure 2 : MMR and MGMT serial slides staining

MMR-DCF with MSH2 loss of expression (A), within an area showing MGMT loss of expression (grade 1 : crypts staining weaker than in surrounding lymphocytes (B, C).

Figure 3: Correlation between MGMT loss and MMR-DCF in LS patients

A: Proportion of LS patients with MMR-DCF is significantly higher in patients with MGMT loss in adjacent mucosa ($p=0.004$), but the difference is not significant in distant mucosa.
B/C: There is a linear relationship between the proportion of patients with MMR-DCF and MGMT grading in adjacent mucosa (B, $R^2=0.95$) and distant mucosa (C, $R^2=0.95$).

Figure 4: MGMT Field Defect and MMR-DCF

Class 1 (C1) tumors: MGMT expression lost both in neoplastic and adjacent mucosa;
Class 2 (C2) tumors: MGMT expression conserved both in neoplastic and adjacent mucosa;
Class 3 (C3) tumors: MGMT expression lost in neoplastic mucosa but conserved in adjacent mucosa; Class 4 (C4) tumors: MGMT expression conserved in neoplastic mucosa but lost in adjacent mucosa

A: Comparative paired analysis of MGMT Field Defect in different clinical contexts

B: C1 tumors (MGMT Field Defect) were exclusively encountered in LS patients with MMR-DCF

Supplementary figure: No correlation was observed between the number of crypts analyzed and the number of MMR-DCF detected

A: Proportion of patients exhibiting MMR-DCF according to the number of crypts analyzed

B: Joint representation of the number of analyzed crypts (in blue, scale on the left side) and the number of MMR-DCF detected (in red, scale on the right side).

FIGURES

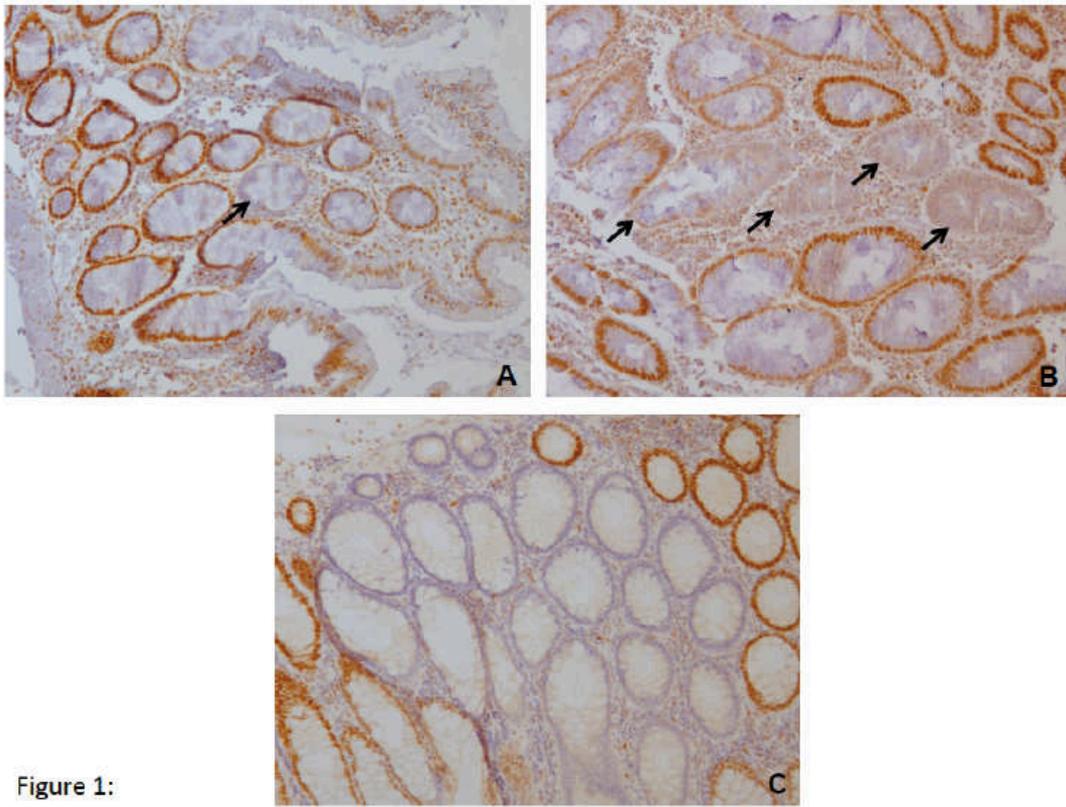


Figure 1:

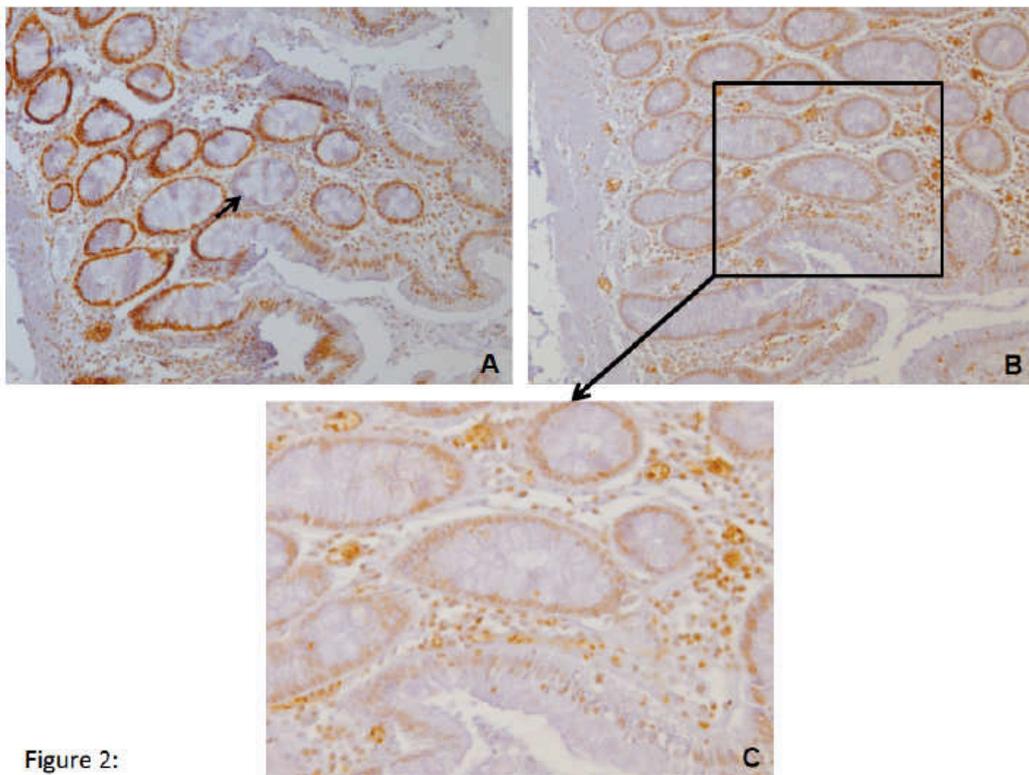


Figure 2:

Figure 3

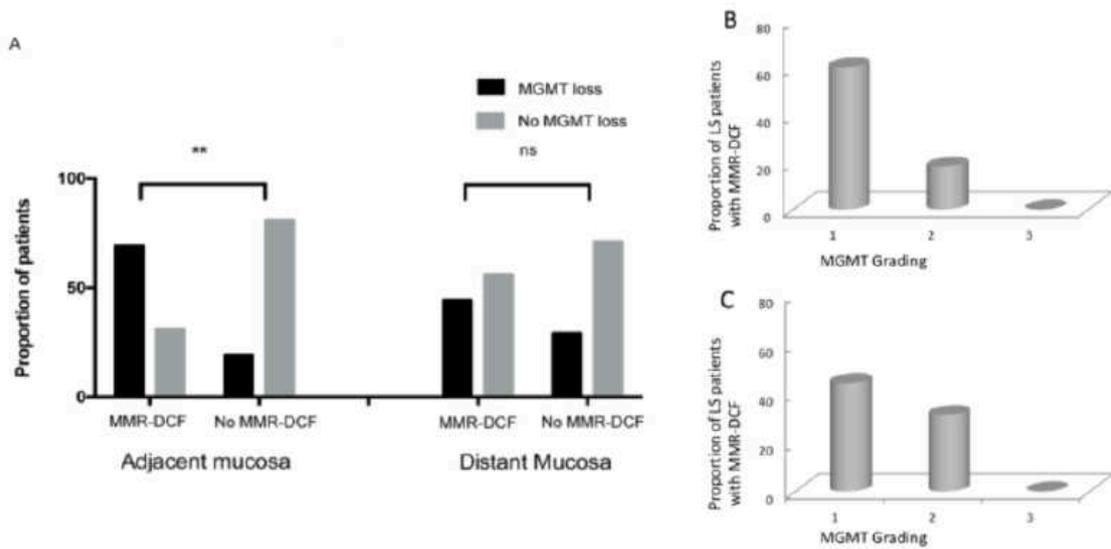
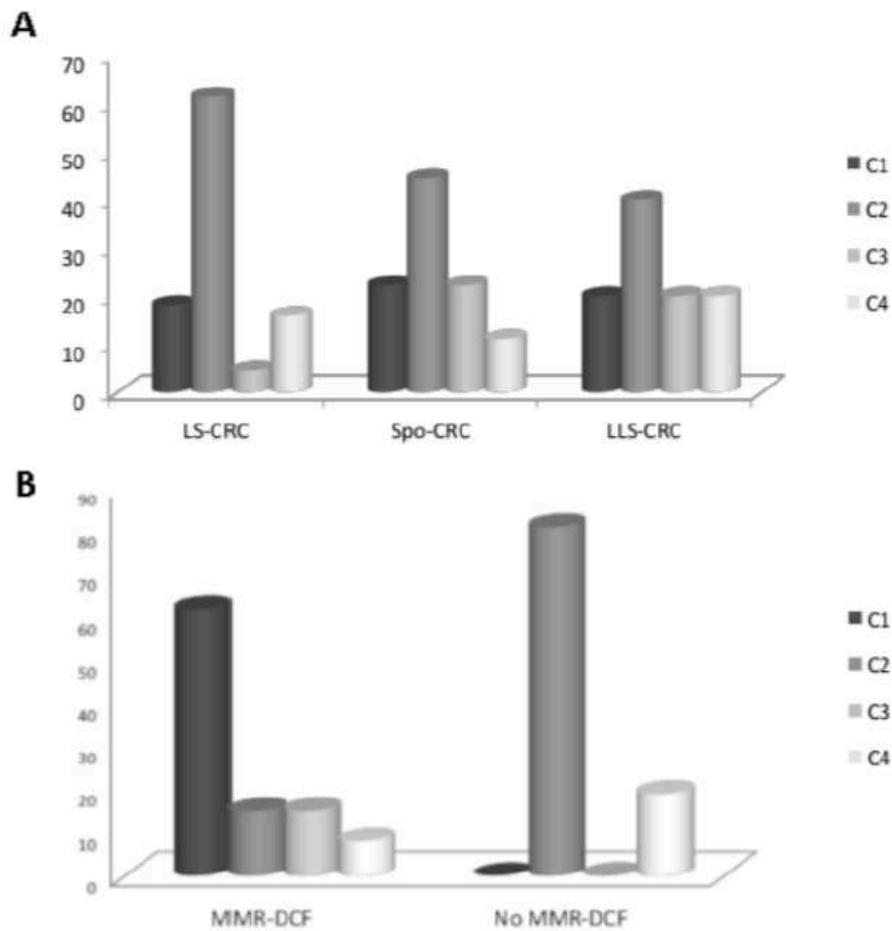
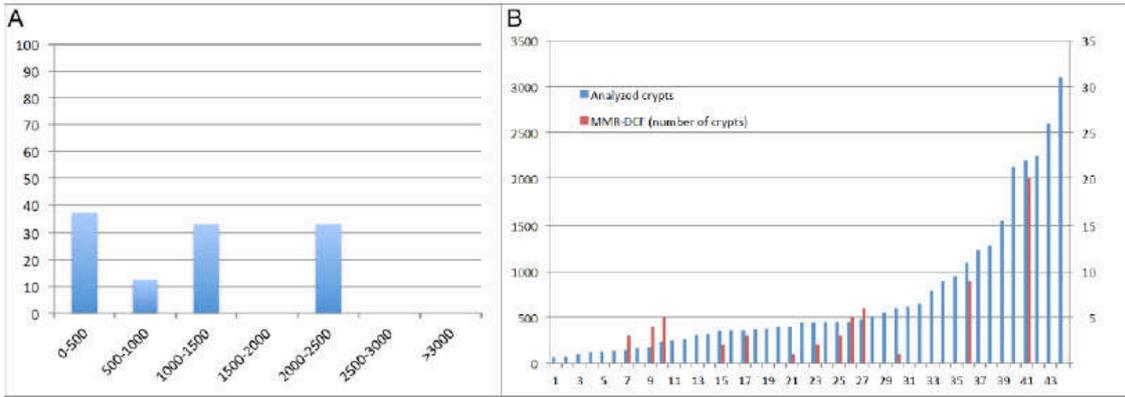


Figure 4



Supplementary Figure



REFERENCES

1. Lynch, H. T., Snyder, C. L., Shaw, T. G., Heinen, C. D. & Hitchins, M. P. Milestones of Lynch syndrome: 1895-2015. *Nat Rev Cancer* **15**, 181–194 (2015).
2. Lynch, H. *et al.* Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clinical Genetics* **76**, 1–18 (2009).
3. Ligtenberg, M. J. L. *et al.* Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nature Genetics* **41**, 112–117 (2009).
4. Deng, G. *et al.* BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res* **10**, 191–195 (2004).
5. Sourrouille, I. *et al.* Somatic mosaicism and double somatic hits can lead to MSI colorectal tumors. *Fam Cancer* (2012). doi:10.1007/s10689-012-9568-9
6. Mensenkamp, A. R. *et al.* Somatic mutations in MLH1 and MSH2 are a frequent cause of mismatch-repair deficiency in Lynch syndrome-like tumors. *Gastroenterology* **146**, 643–646.e8 (2014).
7. Pastrello, C. *et al.* Somatic mosaicism in a patient with Lynch syndrome. *Am J Med Genet* **149A**, 212–215 (2009).
8. Karran, P. & Marinus, M. G. Mismatch correction at O6-methylguanine residues in *E. coli* DNA. *Nature* **296**, 868–869 (1982).
9. Kaina, B., Christmann, M., Naumann, S. & Roos, W. P. MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst.)* **6**, 1079–1099 (2007).
10. Herfarth, K. K. *et al.* A specific CpG methylation pattern of the MGMT promoter region associated with reduced MGMT expression in primary colorectal cancers. *Mol. Carcinog.* **24**, 90–98 (1999).
11. Lind, G. E. *et al.* A CpG island hypermethylation profile of primary colorectal carcinomas and colon cancer cell lines. *Mol Cancer* **3**, 28 (2004).
12. Kat, A. *et al.* An alkylation-tolerant, mutator human cell line is deficient in strand-specific mismatch repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 6424–6428 (1993).
13. Carethers, J. M. *et al.* Competency in mismatch repair prohibits clonal expansion of cancer cells treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *J. Clin. Invest.* **98**, 199–206 (1996).
14. Karran, P. Mechanisms of tolerance to DNA damaging therapeutic drugs. *Carcinogenesis* **22**, 1931–1937 (2001).
15. Stojic, L., Brun, R. & Jiricny, J. Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA Repair (Amst.)* **3**, 1091–1101 (2004).
16. Hickman, M. J. & Samson, L. D. Apoptotic signaling in response to a single type of DNA lesion, O(6)-methylguanine. *Mol. Cell* **14**, 105–116 (2004).
17. Jiricny, J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 335–346 (2006).
18. Hsieh, P. & Yamane, K. DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mech. Ageing Dev.* **129**, 391–407 (2008).
19. Li, Z., Pearlman, A. H. & Hsieh, P. DNA mismatch repair and the DNA damage response. *DNA Repair (Amst.)* **38**, 94–101 (2016).

20. Svrcek, M. *et al.* Methylation tolerance due to an O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) field defect in the colonic mucosa: an initiating step in the development of mismatch repair-deficient colorectal cancers. *Gut* **59**, 1516–1526 (2010).
21. Kloor, M. *et al.* Prevalence of mismatch repair-deficient crypt foci in Lynch syndrome: a pathological study. *The Lancet Oncology* **13**, 598–606 (2012).
22. Pai, R. K. *et al.* DNA mismatch repair protein deficient non-neoplastic colonic crypts: a novel indicator of Lynch syndrome. *Modern Pathology* **11**, 35 (2018).
23. Buhard, O., Suraweera, N., Lectard, A., Duval, A. & Hamelin, R. Quasimonomorphic mononucleotide repeats for high-level microsatellite instability analysis. *Dis. Markers* **20**, 251–257 (2004).
24. Svrcek, M. *et al.* Specific clinical and biological features characterize inflammatory bowel disease associated colorectal cancers showing microsatellite instability. *Journal of Clinical Oncology* **25**, 4231–4238 (2007).
25. Park, S.-J. *et al.* Frequent CpG island methylation in serrated adenomas of the colorectum. *Am. J. Pathol.* **162**, 815–822 (2003).
26. Wojciechowicz, K. *et al.* Temozolomide increases the number of mismatch repair-deficient intestinal crypts and accelerates tumorigenesis in a mouse model of Lynch syndrome. *Gastroenterology* **147**, 1064–72.e5 (2014).
27. Bugni, J. M., Meira, L. B. & Samson, L. D. Alkylation-induced colon tumorigenesis in mice deficient in the Mgmt and Msh6 proteins. *Oncogene* **28**, 734–741 (2008).
28. Humphries, A. & Wright, N. A. Colonic crypt organization and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* **8**, 415–424 (2008).
29. Graham, T. A. *et al.* Use of methylation patterns to determine expansion of stem cell clones in human colon tissue. *Gastroenterology* **140**, 1241–1250.e1–9 (2011).
30. Fischer, J. M., Schepers, A. G., Clevers, H., Shibata, D. & Liskay, R. M. Occult progression by Apc-deficient intestinal crypts as a target for chemoprevention. *Carcinogenesis* **35**, 237–246 (2014).
31. Staffa, L. *et al.* Mismatch Repair-Deficient Crypt Foci in Lynch Syndrome – Molecular Alterations and Association with Clinical Parameters. *PLoS ONE* **10**, e0121980 (2015).
32. Fahrer, J. & Kaina, B. Impact of DNA repair on the dose-response of colorectal cancer formation induced by dietary carcinogens. *Food Chem. Toxicol.* **106**, 583–594 (2017).
33. Barrow, E. *et al.* Cumulative lifetime incidence of extracolonic cancers in Lynch syndrome: a report of 121 families with proven mutations. *Clinical Genetics* **75**, 141–149 (2009).

5. Etude *in vivo*

A. Rationnel

Afin de valider *in vivo* notre scénario de carcinogénèse MSI favorisée par le déficit en MGMT, nous nous sommes intéressés aux souris $Mgmt^{ko}$ (inactivation biallélique de $Mgmt$). Les souris $Mgmt^{ko}$ sont viables et asymptomatiques, quel que soit leur génotype MMR. Elles présentent en revanche une hypersensibilité aux agents méthylants (AM).

Les données de la littérature ont établi que :

- Les souris $Mgmt^{ko}/Mlh1^{wt}$ développent des lymphomes si elles sont traitées par un AM (Sakumi et al. 2006); le phénotype microsatellitaire de ces tumeurs n'a jamais été investigué.
- Les souris $Mgmt^{ko}/Mlh1^{+/-}$ (hétérozygotes $Mlh1$) développent des tumeurs MSI lorsqu'elles sont traitées par un AM (Kawate et al. 2000).

Il n'existe en revanche aucune donnée dans la littérature en ce qui concerne l'incidence ou le phénotype microsatellitaire des CCR chez des souris $Mgmt^{ko}$.

Nous avons cherché à mettre en évidence l'émergence de tumeurs (intestinales ou lymphomes) de phénotype MSI chez des souris $Mgmt^{ko}$ en étudiant l'influence du génotype MMR ($Msh2$).

B. Protocole expérimental

Nous disposons au laboratoire de souches de souris en fonds C57BL/6, $Mgmt^{ko}$ d'une part, et $Msh2^{ko}$ d'autre part ; nous avons donc généré des cohortes des différents génotypes $Mgmt$ et $Msh2$ par des croisements entre ces 2 souches.

Pour mettre en évidence le rôle de l'inactivation de la MGMT dans la cancérogénèse MSI, nous avons généré chez ces souris $Mgmt^{ko}$, des lésions normalement réparées par la MGMT, en utilisant l'exposition à un AM, associée ou non à l'induction d'une inflammation colique afin de reproduire deux contextes cliniques distincts, selon des protocoles de carcinogénèse déjà largement utilisés dans les modèles murins:

- Un modèle de lymphomagénèse: protocole MNU (N-Nitroso-N-Méthylurée) (Kawate et al. 2000; Sakumi et al. 2006).
 - o 1 injection péritonéale unique, dès que les souris ont atteint un poids suffisant (16g pour les femelles et 18g pour les mâles)
 - o Une dose forte de 30mg/kg destinée aux souris *Mgmt^{wt}* ou une dose faible de 2,5mg/kg destinée aux souris *Mgmt^{ko}*, et aux souris *Mgmt^{wt}* à titre de contrôle
- Un modèle de carcinogénèse colorectale: protocole AOM (Azoxyméthane, AM à tropisme digestif), associé à l'induction d'une inflammation colique par DSS (Dextran Sulfate Sodium) (Cooper et al. 2000).
 - o 1 injection péritonéale d'AOM, dès que les souris ont atteint un poids suffisant (20g pour les femelles et 22g pour les mâles),
 - o Une dose forte de 12mg/kg destinée aux souris *Mgmt^{wt}* ou une dose faible de 0,5mg/kg destinée aux souris *Mgmt^{ko}*, et aux souris *Mgmt^{wt}* à titre de contrôle
 - o Suivie de 5 cycles de DSS administré à 2,5% dans l'eau de boisson: les cycles durent 4 jours et sont espacés de 2 semaines ; le 1^{er} cycle débute 5 jours après l'injection d'AOM.

Dans chaque protocole, deux doses de traitement par AM ont été retenues, selon les résultats d'une étude pilote que nous avons menée au début du projet : nous avons réalisé cette étude car nous nous attendions à une plus forte toxicité des AM chez les souris *Mgmt^{ko}*, la dose retenue était la dose maximale tolérée par les souris selon le génotype afin de réduire la mortalité précoce liée au traitement.

Pour chaque protocole, chaque cohorte était constituée d'environ 30 souris pour chaque génotype : *Msh2^{wt}/Mgmt^{ko}*, *Msh2^{wt}/Mgmt^{wt}*, *Msh2^{+/-}/Mgmt^{ko}*, *Msh2^{+/-}/Mgmt^{wt}*, *Msh2^{ko}/Mgmt^{ko}*. Nous avons également constitué des cohortes contrôle non traitées pour chaque génotype.

C. Résultats

• Protocole MNU

La toxicité du MNU vis-à-vis des souris *Mgmt^{ko}* nous a conduits à en diminuer fortement les doses, ce qui a permis dans cette cohorte de limiter la mortalité précoce. L'effet carcinogène que nous avons observé était faible : nous avons observé des lésions lymphomateuses mais sans réelle tumeur macroscopique avec un envahissement le plus souvent inférieur à 30% de l'organe ce qui rend difficile l'analyse MSI en biologie moléculaire.

Parmi les tumeurs analysables nous avons observé [Figure 18]:

- Dans la cohorte *Msh2^{wt}/Mgmt^{ko}* : aucun lymphome MSI sur 15 lymphomes analysés
- Dans la cohorte *Msh2^{+/-}/Mgmt^{ko}* : 3 lymphomes MSI sur 16 lymphomes analysés, ce qui était similaire à ce que nous avons observé dans la cohorte *Msh2^{+/-}/Mgmt^{wt}* (2 lymphomes MSI sur 14 analysés, $p=1$, Fisher exact test)
- A titre de contrôle, les 3 lymphomes analysables survenus dans la cohorte *Msh2^{ko}/Mgmt^{ko}* étaient MSI.

• Protocole AOM/DSS

La toxicité du traitement nous a conduits à en diminuer fortement les doses, mais la mortalité précoce est restée élevée dans cette cohorte, ce qui a conduit à diminuer également les doses de DSS en cours d'étude. La mortalité précoce était de 10 à 20% selon les génotypes, ce qui a rendu difficile la constitution des cohortes, et n'a pas permis d'analyser histologiquement les colons de tous les animaux.

Parmi les souris analysées, l'effet carcinogène observé était important quel que soit le génotype (taux d'adénomes ou adénocarcinomes colorectaux):

- *Msh2^{wt}/Mgmt^{ko}*: 13/25 (52%)
- *Msh2^{wt}/Mgmt^{wt}*: 12/12 (100%)
- *Msh2^{+/-}/Mgmt^{ko}*: 10/27 (37%)
- *Msh2^{+/-}/Mgmt^{wt}*: 11/16 (69%)
- *Msh2^{ko}/Mgmt^{ko}*: 5/6 (83%)

Ces tumeurs ont été macro-biopsiées et analysées en biologie moléculaire [Figure 18]:

- Dans la cohorte $Msh2^{wt}/Mgmt^{ko}$: nous avons observé 1 adénocarcinome colique MSI sur 12 adénocarcinomes analysés
- Dans la cohorte $Msh2^{+/-}/Mgmt^{ko}$: nous n'avons observé aucun phénotype MSI parmi les 11 adénocarcinomes analysés.
- A titre de contrôle, les 5 adénocarcinomes analysables survenus dans la cohorte $Msh2^{ko}/Mgmt^{ko}$ étaient MSI.

Cette étude n'a malheureusement pas permis de valider *in vivo* notre scénario de carcinogénèse MSI favorisé par la déficience en MGMT. Ces résultats négatifs sont probablement en partie dûs aux réductions de doses que nous avons du faire en raison de la grande sensibilité des animaux $Mgmt^{ko}$, ce qui a dans un cas entraîné des effets carcinogènes trop faibles, et dans l'autre activé un pathway de carcinogénèse MSS, non dépendant du génotype MMR.

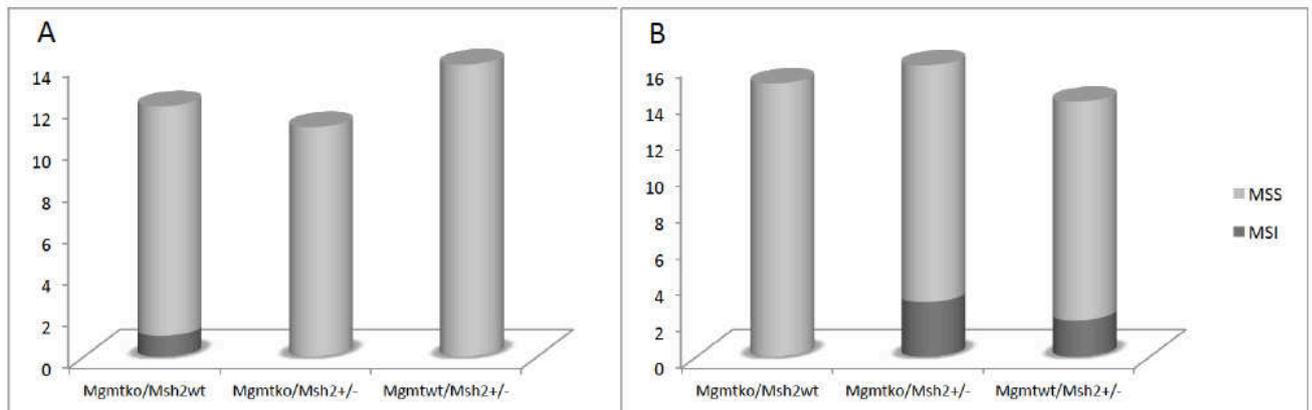


Figure 18: Analyse MSI des tumeurs observées sur le modèle murin

A: Protocole MNU (lymphomes); B: Protocole AOM/DSS (adénocarcinomes colorectaux)

6. Autres travaux

Article 1: *Somatic Mosaicism and double somatic hits can lead to MSI colorectal tumors*

Familial Cancer
DOI 10.1007/s10689-012-9568-9

ORIGINAL ARTICLE

Somatic mosaicism and double somatic hits can lead to MSI colorectal tumors

Isabelle Sourrouille · Florence Coulet · Jeremie H. Lefevre · Chrystelle Colas ·
Mélanie Eyries · Magali Svrcek · Armelle Bardier-Dupas · Yann Parc ·
Florent Soubrier

© Springer Science+Business Media B.V. 2012

Abstract Some patients happen to have a colorectal cancer with microsatellite instability (MSI), but without any alteration in Mismatch Repair (MMR) system (germline mutation/promoter methylation). We aimed to identify the mechanism of inactivation of MMR genes in those cases. We studied 18 patients with MSI CCR and loss of expression of a MMR protein. DNA was extracted from tumoral and normal colonic material. We studied the 3 main MMR genes in tumors, by sequencing and large rearrangement analysis, and looked for mosaicism. Seven patients lost expression of *MLH1*, we found 1 mutation in the tumor for 3 patients and 2 mutations in one. Eight patients lost expression of *MSH2*: we found 1 mutation in 2 patients and 2 mutations in four. In the 5 cases with 2 hits, MSI was due to double somatic hits ($n = 3$), mosaicism ($n = 1$) and missed germline mutation ($n = 1$). Mosaicism was confirmed by HRM analysis, and by finding a germline

mutation in one patient's son. We could explain MSI in the tumors of 5 patients (27.8 %). Their follow up and family's surveillance could be adjusted, as the sporadic cases don't require intensive surveillance. We describe the first case of somatic mosaicism after de novo mutation in *MSH2*.

Keywords Microsatellite instability · Lynch syndrome · Somatic mosaicism · Mismatch repair · Colorectal cancer

Introduction

In colorectal cancer (CRC), 2 main molecular abnormalities have been identified: chromosomal instability and Microsatellite Instability [1] (MSI). MSI is found in about 20 % of colorectal cancers [2], and it reveals a defective DNA Mismatch Repair [1] (MMR) system. Inactivation of MMR system can be either sporadic, by epigenetic methylation of CpG islands in promoter sequences of a MMR gene (this phenomenon is known for *MLH1* [3]), or inherited secondary to a germline monoallelic mutation of one of the MMR gene as in Lynch Syndrome (LS). LS induces a familial predisposition to CRC and other cancers [4, 5]; it is suspected according to clinical characteristics [6, 7] (Amsterdam or Bethesda criteria), tumoral characteristics (MSI and possible loss of expression of a MMR protein in immunohistochemical (IHC) pathology analysis [8, 9]) and it is defined by identification of a germline mutation in an MMR gene [10, 11]. The genetic diagnosis is essential, because it establishes the risk of recurrence and transmission to siblings and relatives, and guides the patients' management and surveillance, and familial screening [12].

Some patients have MSI colorectal tumors without germline mutation or methylation of promoter sequence of

I. Sourrouille · J. H. Lefevre (✉) · Y. Parc
Department of Digestive Surgery, Hôpital Saint Antoine
(AP-HP), Paris VI University, Paris, France
e-mail: jeremie.lefevre@sat.aphp.fr

I. Sourrouille · F. Coulet · C. Colas · M. Eyries · F. Soubrier
Department of Oncogenetics and Angiogenetics, Hôpital de La
Pitié Salpêtrière (AP-HP), Paris VI University, Paris, France
e-mail: florent.soubrier@upmc.fr

M. Svrcek
Department of Pathology, Hôpital Saint Antoine (AP-HP),
Paris VI University, Paris, France

A. Bardier-Dupas
Department of Pathology, Hôpital de La Pitié Salpêtrière
(AP-HP), Paris VI University, Paris, France

Published online: 18 September 2012

 Springer

MLH1, the prevalence of such tumors is hardly known in general population because most of the published studies about MSI status were led among a selected population [13]. For these patients, the mechanism of inactivation of the involved MMR gene is unknown, and their CRC cannot be identified as sporadic or inherited. Thus, their risk of recurrence and transmission to their children cannot be defined, and they (as their children and siblings) undergo surveillance as LS.

We tried to study these unexplained MSI colorectal tumors, to understand their carcinogenesis, and to identify which families should really be managed as LS families. For this purpose, we explored the sequence of the MMR genes in tumor tissue and in adjacent colonic normal tissue in order to detect biallelic somatic mutations or mosaicism.

Materials and methods

Patients selection

From 2005 to 2009, 1,040 patients were operated for CRC in our department. We performed a systematic screening [14] of molecular MSI and loss of expression of MMR proteins by IHC staining for every CRC operated on, whatever the patient personal and familial medical history. Among those, 105 (10.1 %) had abnormal result either in MSI analysis and/or in IHC staining. We excluded 43 patients who had a sporadic inactivation by biallelic methylation of the promoter sequences of *MLH1*, and we asked the other 62 patients to get tested for germ line mutation in MMR genes. Thirty-eight patients underwent this test, which highlighted a germ line mutation in 25 cases; this led to diagnose LS in these patients. We considered the 13 remaining patients with an unexplained MSI colorectal tumor, and we added 14 similar patients seen in the oncogenetics consultation but coming from other hospitals. Thus 27 patients had an unexplained MSI CRC, they all had a test for germline mutations in *MLH1*, *MSH2*, and *MSH6* genes, and test for methylation of the promoter sequences of *MLH1* and for *BRAF* mutation, and these tests were negative.

Material

We had blood samples for DNA extraction for every patient, and blood samples for RNA extraction for 9 patients. We collected tumoral and normal colonic material; we could get frozen colonic material for 18 of the 27 patients. The study was achieved on these 18 patients.

Methods

DNA and RNA extraction

DNA extraction from blood samples was performed with an Extragene[®] automatic extractor (Genomic Industry, Archamps, France) with a DNA extraction kit Wizard Genomic DNA[®] (Promega France, Charbonnières-les-Bains, France) according to the manufacturer's standard protocol.

DNA extraction from frozen colonic material was performed with a kit QIAamp DNA mini Kit Qiagen[®] (QIAGEN, Courtaboeuf, France). Every colonic sample was provided to us by our pathologists: they assessed for each tumoral sample over 80 % of tumoral cells, and for each normal tissue sample the absence of tumoral cells and the full thickness.

Total cellular RNA extraction from blood was performed with PAXgene blood RNA kit (PreAnalytix) according to the manufacturer's standard protocol from blood samples collected in a PAXGene[®] blood RNA tube (PreAnalytix).

Mutation analysis

All *MLH1*, *MSH2*, and *MSH6* exons were amplified by PCR with primers designed with Primer3 software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) and are available on request. Amplification was performed with the HotStart Taq DNA Polymerase[®] kit (Roche Diagnostics, Meylan, France) on a GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems). PCR products were cleaned up on a MultiScreen PCR 96-well plate (Millipore, Billerica, MA, USA) and sequencing reactions were carried out with the BigDye Terminator v1.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems). The products of the sequencing reactions were cleaned up with the Sephadex G-50 (GE Healthcare, Life Sciences) in a MultiScreen-HV 96-well filter plate (Millipore), then ran up on an ABI3730 DNA sequencer (Applied Biosystems). The resulting sequence data were analyzed by SeqScape software, version 2.5 (Applied Biosystems) in comparison with the reference sequences of *MLH1*, *MSH2* and *MSH6* genes (accession numbers, respectively: NM_000249, NM_000251 and NM_000179).

High resolution melting (HRM) analysis

HRM analysis was used because of the higher sensitivity of this technique compared to Sanger sequencing and was used to look for a fusion profile difference between normal and tumor colonic tissue DNA and lymphocytes DNA. HRM analysis of the genomic DNA samples was carried out on a Light-Cycler 480 System (Roche Diagnostics).

Table 1 Characteristics of the patients

Patient	Gender	Age at diagnosis	MSI	Loss in IHC staining	Bethesda	Amsterdam	Number of detected somatic mutations
1	F	59	+	MLH1	+	-	1
2	F	64	+	MLH1	-	-	-
3	M	49	+	MLH1	-	-	1
4	M	62	+	MLH1	-	-	-
5	F	57	+	MLH1	-	-	1
6	F	24	+	MLH1	-	-	-
7	F	53	+	MLH1	-	-	2
8	F	24	+	MSH2	+	-	1
9	F	51	+	MSH2	-	-	2
10	F	79	+	MSH2	+	-	2
11	M	57	+	MSH2	-	-	1
12	M	62	+	MSH2	+	+	2
13	M	61	+	MSH2	-	-	-
14	M	61	+	MSH2	-	-	2
15	M	61	+	MSH2	-	-	-
16	F	70	+	MSH2	+	-	1
17	M	46	+	MSH2	+	-	1
18	F	38	+	-	+	-	-

Reaction mixture for HRM consisted in 0.3 μ M of each primer, 1 \times LC480 HRM Master Mix (containing fluorescent intercalant agent) (Roche Diagnostics) and 20 ng of genomic DNA samples. Assays were carried out in a 96-well format in 20 μ L reaction volume and were performed using the touchdown PCR cycling and HRM conditions (available on request).

MSI analysis

MSI analysis was performed through PCR reaction on Applied Biosystems thermocyclers, using the MSI Analysis System[®] kit 1.2 (Promega[®]). PCR was carried out on the ABI 3730 DNA analyzer (Applied Biosystems), using GeneMapper[®] software, version 4.0 (Applied Biosystems).

Screening for large rearrangements

Screening for large rearrangements was performed through 2 different techniques: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) for *MLH1/MSH2* using the MLPA kit SALSA 003B (MRC Holland, Amsterdam, the Netherlands), and Quantitative MultiplexPCR of Short fluorescence Fragments (QMPSF), with Plexamp[®] kit (Prestagen) for *MSH2/MSH6*. Fragment analysis of multiplex PCR was carried out on the ABI 3730 DNA analyzer (Applied Biosystems), using GeneMapper[®] software, version 4.0 (Applied Biosystems).

cDNA analysis

cDNA was generated using the oligodT protocol of SuperScript III[®] Invitrogen[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). PCR products were generated from the cDNA (primers and PCR conditions available on request), and were analyzed through direct sequencing and electrophoretic migration on a 1% ethidium bromide-stained agarose gel looking for a difference in the length of the amplicon.

Results

Patients

LS suspicion in our patients was based on tumoral features (MSI 18/18 patients, and/or IHC staining loss 17/18 patients), whatever the familial history or the patient age at diagnosis (Table 1). Mean age at the time of diagnosis was 54.3 ± 14.2 years.

Sample checking

We performed MSI analysis on every sample (blood, normal and tumoral colonic material), in order to check MSI status of the tumors and to check identity of different samples analyzed for each patient (thanks to identity markers included in the MSI kit).

Table 2 Summary of tumoral hits found in *MLH1* in patients with *MLH1* loss of expression

	Somatic hit no 1	Somatic hit no 2	Diagnosis
Patient no 1	c.2155insT (p.Ile719TyrfsX4)	–	–
Patient no 3	c.872dupT (p.Leu292ProfsX15)	–	–
Patient no 5	c.5C>A (p.Ser2X)	–	–
Patient no 7	c.588delA (p.Lys196AsnfsX6)	c.676C>T (p.Arg226X)	Double somatic mutation

Table 3 Summary of tumoral hits found in *MSH2* in patients with *MSH2* loss of expression

	Somatic hit no 1	Somatic hit no 2	Diagnosis
Patient no 8	c.942 + 3A>T	–	–
Patient no 9	c.664delA (p.Ile222PheX2)	c.1147C>T (p.Arg383X)	Double somatic mutation
Patient no 10	c.2541delA (p.Lys847fsX44)	Deletion <i>MSH2</i> and <i>EpCAM</i>	Somatic mosaicism
Patient no 11	c.1165C>T (p.Arg389X)	–	–
Patient no 12	c.2038C>T (p.Arg680X)	c.942 + 3A>T	Lynch syndrome
Patient no 14	c.645 + 1G>A (alternate splicing)	c.1069G>T (p.Glu357X).	Double somatic mutation
Patient no 16	c.1823-1827delGCTTT	–	–
Patient no 17	Deletion of <i>MSH2</i> and <i>MSH6</i>	–	–

Tumors genetics

MLH1 loss of expression (Table 2)

Among the seven patients with a loss of expression of *MLH1*, 4 had at least one mutation identified. For 3 patients, one monoallelic inactivating mutation was identified; the second hit was undetermined. For the last patient (no 7) we identified the 2 hits in *MLH1* explaining the gene silencing. None of these mutations were detected in DNA extracted from blood.

MSH2 loss of expression (Table 3)

Among the 10 patients with a loss of expression of *MSH2*, 8 had at least one mutation identified. For 4 patients (no 8, 11, 16 and 17), one hit responsible for loss of expression of *MSH2* (and thus for MSI status) was identified; the second hit remained unidentified. For patients no 9 and no 14, we identified two hits on *MSH2*. None of these mutations were detected in DNA extracted from blood, and the HRM profile of the DNA extracted from normal colonic tissue for the 2 involved loci in each patient did not evoke a somatic mosaicism.

For patient no 10, 2 hits were identified. None of these mutations were detected in DNA extracted from blood, but the HRM profile of the DNA extracted from normal colonic tissue for *MSH2* exon 15 (locus of the c.2541delA mutation) was intermediate between that of the tumor and that of the blood, though the normal colonic tissue had

been assessed for the absence of tumoral cells. These results evoked a somatic mosaicism for this mutation, and a weak signal for c.2541delA mutation was noticeable in the DNA extracted from normal colonic tissue (Figs. 1, 2). Moreover, the same mutation was identified in DNA extracted from the lymphocytes of her son.

For patient no 12, we identified the 2 hits on *MSH2* behind the inactivation of this gene. Mutation c.942 + 3A>T, was detected in DNA extracted from blood when we checked this out (it had been missed at the initial reading).

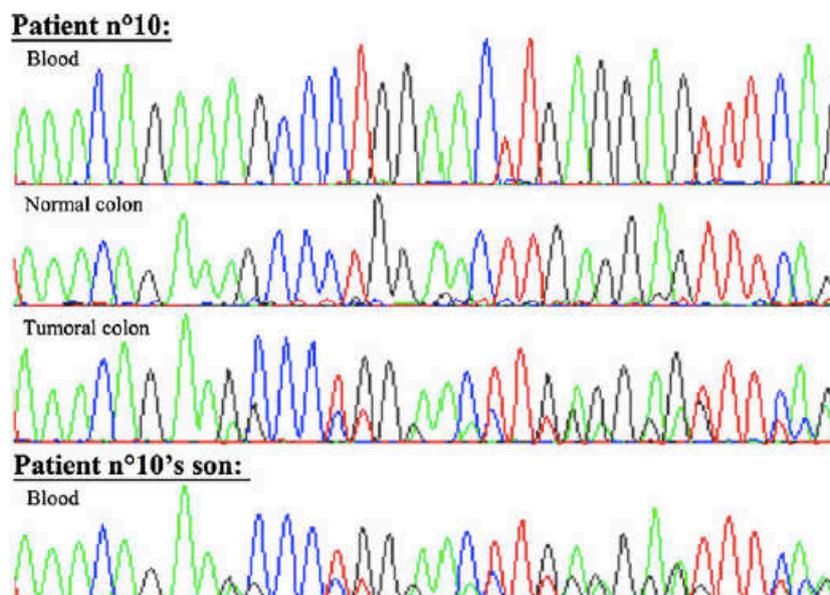
No loss of expression

One patient had no loss of expression of MMR genes; we found no hit on MMR genes in the tumor for this patient.

RNA analysis

We performed RNA analysis based on RNA extracted from blood, in order to detect any intronic or regulatory mutations that escape routine DNA sequencing. We did not identify any abnormal RNA in the patients for whom we had material for RNA extraction: 4 patients with loss of expression of *MLH1* (patients no 2, 4, 5, and 6) and 5 patients with loss of expression of *MSH2* (patients no 8, 11, 15, 16 and 17), neither by electrophoretic migration of cDNA, nor by cDNA sequencing. We looked for known single-nucleotide polymorphisms (SNP) in cDNA sequences: only two patients had informative SNP and we did not observe any allelic imbalance.

Fig. 1 Sequence analysis showing the MSH2 somatic mutation c.2541delA for patient no 10



Discussion

Tumoral genetic testing for MMR genes highlighted two mechanisms for MSI colorectal cancer carcinogenesis: double somatic hits and somatic and germinal mosaicism. A double somatic mutation was responsible for a MSI colorectal tumor in two patients (no 9 and 14) in our study (11.1%), 1 for *MLH1* and 1 for *MSH2*. None of these mutations was detected in DNA extracted from blood or normal colonic material. These cases are thus sporadic cases of MSI CRC, resulting from two acquired mutations. In these cases, there is likely no risk of transmission, but it would be better to test the two somatic mutations in germline DNA in the children, in order to exclude an unknown mosaicism. The patient with the double *MSH2* mutation had an ulcerative colitis, which is a risk factor for occurrence of sporadic CRC, because chronic inflammation promotes somatic mutations [15]. The prevalence of bi-allelic somatic mutations in MMR genes in sporadic CRC has been recently estimated around 10% in a meta-analysis [16]. The two mutations identified as “double somatic mutation” are likely in *trans* situation (1 on each allele), and explain the inactivation of the MMR gene involved and the MSI status of the tumor [2].

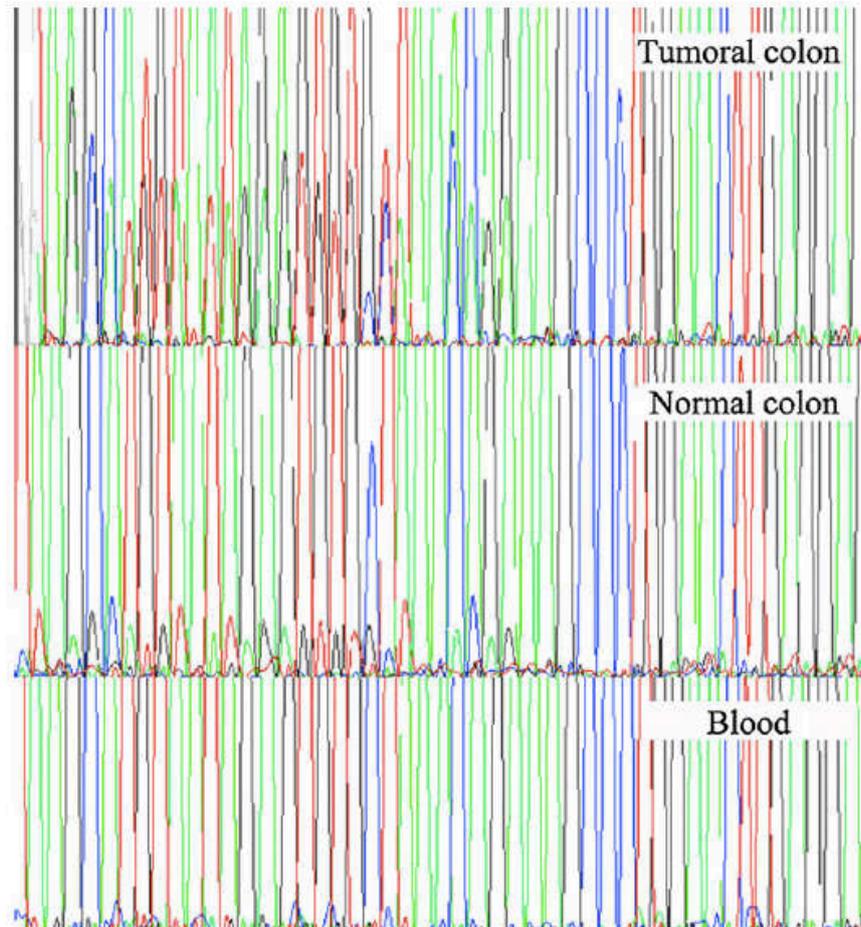
One patient in our study had an HRM profile on normal colonic DNA that evoked a somatic mosaicism. The familial history of patient no 10 strongly evoked a somatic mosaicism: no CRC occurred in her ancestors, but LS was diagnosed in her son at the age of 54 years old. He had a MSI CRC, and the same mutation as that we found in his mother's colorectal tumor (c. 2541delA) was identified in DNA extracted from his lymphocytes. The fact that she

transmitted this mutation to her son while it is not detected in her blood proves that this patient has a germinal mosaicism.

A somatic and germinal mosaicism was thus responsible for the MSI phenotype in 1 patient (5.6%). We were able to demonstrate the somatic mosaicism for this patient because we detected mutated DNA in DNA extracted from the normal colonic material, and because of the transmission of the mutation we observed in the tumor to her son. To our knowledge, this mechanism (mosaicism by de novo mutation) has never been described in MMR genes before. One case of somatic mosaicism has been described previously but it was due to a reversion [17]. Our case enhances the knowledge of de novo mutations in MMR genes that were thought to be extremely rare until recently; the rate of de novo inactivating mutations in MMR genes is now estimated around 2.3% of patients carrying a mutation in MMR genes [18], the remnant cases are inherited. The mean age at diagnosis of CRC in our cohort was 54 years; which is older than the mean age at diagnosis for patients affected by LS. Many of these patients would not have been included in a restrictive screening for MSI colorectal tumor. As an example, the patient with the somatic mosaicism had a colorectal cancer at the age of 79 and had no familial history at the time of her surgery; she would never have been eligible for MSI analysis as part of a restrictive screening, and her children would not have been tested. These results are a further argument for systematic screening for MSI status in CRC.

In 7 patients (38.9%), we found only 1 hit in MMR genes in the tumor; the other hit remains undetected and the MSI status unexplained. We already published a case of

Fig. 2 High-resolution melting technique showing the mutation c.2541delA on tumoral tissue, healthy colonic tissue and blood sample



somatic mutation on *MHL1* with second explanation for the second hit [19]. We performed the genetic testing for *MSH2* and *MSH6* in another group of tumors from 10 patients carrying a proven monoallelic germline mutation in *MSH2* (*data not shown*). We found the germline mutation in every tumor, but we found a 2nd hit in only 6/10 tumors (60 %). This suggests other somatic ways of inactivation of *MSH2* than mutations or large rearrangements, like methylation of the promoter sequence of *MSH2*. Patients with only one somatic hit identified in the tumor, and their relatives, should undergo the same follow up as patients with proven LS because the unknown second could be germinal.

In two patients with loss of expression of *MSH2*, we found a hit on *MSH6* in addition to the hit on *MSH2*, and in patient no 8, a deletion of 1 base c.3254delC (p.Phe1088SerfsX2), in addition to c.942 + 3A>T. This mutation in *MSH6* could be either the 2nd hit, co-responsible for the loss of expression, either an additional somatic hit resulting from the MSI status (this mutation is located in a repeated sequence in *MSH6*). Indeed in our analysis of

MSH2-linked LS tumors showed that in the 6 patients with 2 hits on *MSH2*, two had a 3rd event in the tumor in *MSH6*, at the exact same location than patient no 8 (*data not shown*). This *MSH6* hit is thus a consequence of the tumor instability.

In patient no 17, a large rearrangement with complete deletion of *MSH6*, in addition to a large rearrangement with complete deletion of *MSH2* was observed. In this case the two hits were more likely a single hit, due to a large deletion, because of the close location of these 2 genes (chromosome 2).

For five patients (29.4 %), the tumor analysis found no hit on MMR genes; 3 patients had a loss of *MLH1* but neither methylation of the promoter sequence nor BRAF mutation, and 1 patient had no loss of expression in the 3 MMR proteins tested (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*). These patients should be tested for other MMR genes (*PMS1*, *PMS2*, *MLH3*); the loss of *MLH1* could be due to inactivation of another gene coding for a protein interacting with *MLH1*, or to the presence of a regulatory intronic mutation in one of *MMR* genes that could not be revealed by the

techniques we used. This loss could not be explained by allelic imbalance, which would have been highlighted by the *MLPA* and cDNA analysis.

Apart from MMR genes, other genes could be involved either in regulation of expression of MMR genes, either in DNA repair; this is a likely mechanism for our patient without any loss of expression in IHC staining. Among those, *Exo1* has been described recently; it codes for a protein that interacts with MMR proteins. We could also look for other candidate genes by exome study [20] (exploring complete coding region of the genome).

Conclusion

Through this study, we describe two mechanisms for MSI colorectal tumors carcinogenesis: the somatic and germinal mosaicism by de novo mutation on *MSH2*, and the double somatic mutation. These findings changed the follow up of the patients as the colorectal cancer risk for the relatives.

These results suggest that the tumoral genetic testing for MMR genes could be routinely used for unexplained MSI tumors: when 2 mutations are identified on the MMR gene involved, it can provide targeted diagnosis in the children and lead to release of the surveillance for those with none of the 2 as germline mutations.

Conflict of interest Each author has no conflict of interest to report.

References

1. Imai K, Yamamoto H (2008) Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis* 29(4):673–680. doi:10.1093/carcin/bgm228
2. Boland CR, Goel A (2010) Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 138(6):2073–2087 e2073. doi:10.1053/j.gastro.2009.12.064
3. Perez-Carbonell L, Alenda C, Paya A, Castillejo A, Barbera VM, Guillen C, Rojas E, Acame N, Gutierrez-Avino FJ, Castells A, Llor X, Andreu M, Soto JL, Jover R (2010) Methylation analysis of MLH1 improves the selection of patients for genetic testing in Lynch syndrome. *J Mol Diagn* 12(4):498–504. doi:10.2353/jmoldx.2010.090212
4. Parc YR, Halling KC, Burgart LJ, McDonnell SK, Schaid DJ, Thibodeau SN, Halling AC (2000) Microsatellite instability and hMLH1/hMSH2 expression in young endometrial carcinoma patients: associations with family history and histopathology. *Int J Cancer* 86(1):60–66
5. Watson P, Riley B (2005) The tumor spectrum in the Lynch syndrome. *Fam Cancer* 4(3):245–248. doi:10.1007/s10689-004-7994-z
6. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT (1991) The International Collaborative Group on hereditary non-polyposis colorectal cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 34(5):424–425
7. Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JR, Khan PM, Lynch H, Perucho M, Smyrk T, Sobin L, Srivastava S (1997) A National Cancer Institute workshop on hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst* 89(23):1758–1762
8. Ewald J, Rodrigue CM, Mourra N, Lefevre JH, Flejou JF, Tiret E, Gispach C, Parc YR (2007) Immunohistochemical staining for mismatch repair proteins, and its relevance in the diagnosis of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Br J Surg* 94(8):1020–1027. doi:10.1002/bjs.5704
9. Peltomaki P (2005) Lynch syndrome genes. *Fam Cancer* 4(3):227–232. doi:10.1007/s10689-004-7993-0
10. Lynch HT, Lynch JF, Lynch PM (2007) Toward a consensus in molecular diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). *J Natl Cancer Inst* 99(4):261–263. doi:10.1093/jnci/djk077
11. Vaughn CP, Robles J, Swensen JJ, Miller CE, Lyon E, Mao R, Bayrak-Toydemir P, Samowitz WS (2010) Clinical analysis of PMS2: mutation detection and avoidance of pseudogenes. *Hum Mutat* 31(5):588–593. doi:10.1002/humu.21230
12. Vasen HF, Moslein G, Alonso A, Bernstein I, Bertario L, Blanco I, Burn J, Capella G, Engel C, Frayling I, Friedl W, Hes FJ, Hodgson S, Mecklin JP, Moller P, Nagengast F, Parc Y, Renkonen-Sinisalo L, Sampson JR, Stormorken A, Wijnen J (2007) Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer). *J Med Genet* 44(6):353–362. doi:10.1136/jmg.2007.048991
13. Julie C, Tresallet C, Brouquet A, Vallot C, Zimmermann U, Mityr E, Radvanyi F, Rouleau E, Lidereau R, Coulet F, Olschwang S, Frebourg T, Rougier P, Nordlinger B, Laurent-Puig P, Penna C, Boileau C, Franc B, Muti C, Hofmann-Radvanyi H (2008) Identification in daily practice of patients with Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer): revised Bethesda guidelines-based approach versus molecular screening. *Am J Gastroenterol* 103(11):2825–2835; quiz 2836. doi:10.1111/j.1572-0241.2008.02084.x
14. Canard G, Lefevre JH, Colas C, Coulet F, Svrcek M, Lascols O, Hamelin R, Shields C, Duval A, Flejou JF, Soubrier F, Tiret E, Parc Y (2011) Screening for Lynch syndrome in colorectal cancer: are we doing enough? *Ann Surg Oncol*. doi:10.1245/s10434-011-2014-7
15. Ullman TA, Itzkowitz SH (2011) Intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology* 140(6):1807–1816. doi:10.1053/j.gastro.2011.01.057
16. Zhang R, Qin W, Xu GL, Zeng FF, Li CX (2012) A meta-analysis of the prevalence of somatic mutations in the hMLH1 and hMSH2 genes in colorectal cancer. *Colorectal Dis* 14(3):e80–e89. doi:10.1111/j.1463-1318.2011.02858.x
17. Pastrello C, Fomasari M, Pin E, Berto E, Pivetta B, Viel A (2009) Somatic mosaicism in a patient with Lynch syndrome. *Am J Med Genet A* 149A(2):212–215. doi:10.1002/ajmg.a.32620
18. Win AK, Jenkins MA, Buchanan DD, Clendenning M, Young JP, Giles GG, Goldblatt J, Leggett BA, Hopper JL, Thibodeau SN, Lindor NM (2011) Determining the frequency of de novo germline mutations in DNA mismatch repair genes. *J Med Genet* 48(8):530–534. doi:10.1136/jmedgenet-2011-100082
19. Lefevre JH, Colas C, Coulet F, Bonilla C, Mourra N, Flejou JF, Tiret E, Bodmer W, Soubrier F, Parc Y (2010) MYH biallelic mutation can inactivate the two genetic pathways of colorectal cancer by APC or MLH1 transversions. *Fam Cancer* 9(4):589–594. doi:10.1007/s10689-010-9367-0
20. Kobelka CE (2010) Exome sequencing: expanding the genetic testing toolbox. *Clin Genet* 78(2):132–134. doi:10.1111/j.1399-0004.2010.01452_1.x

Azathioprine induction of tumors with microsatellite instability: Risk evaluation using a mouse model

Sahra Bodo^{1,2}, Magali Svrcek^{1,2,3}, Isabelle Sourrouille^{1,2}, Peggy Cuillières-Dartigues⁴, Tatiana Ledent^{1,2}, Sylvie Dumont^{2,5}, Laetitia Dinard^{1,2}, Philippe Lafitte^{1,2}, Camille Capel^{1,2}, Ada Collura^{1,2}, Olivier Buhard^{1,2}, Kristell Wanherdrick^{1,2}, Alexandra Chalastanis^{1,2}, Virginie Penard-Lacronique⁶, Bettina Fabiani³, Jean-François Fléjou^{1,2,3}, Nicole Brousse⁷, Laurent Beaugerie^{2,8}, Alex Duval^{1,2}, Martine Muleris^{1,2}

¹INSERM, UMR_S 938, CDR Saint-Antoine, Equipe « Instabilité des Microsatellites et Cancer », Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer, F-75012, Paris, France

²Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR_S 938, CDR Saint-Antoine, F-75012 Paris, France

³AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Service d'Anatomie Pathologique, F-75012 Paris, France

⁴AP-HP, Institut Gustave Roussy, Service d'Anatomie Pathologique, F-94805 Villejuif, France

⁵IFR 65, F-75012 Paris, France

⁶INSERM, U985, Institut Gustave Roussy, F-94805 Villejuif, France

⁷AP-HP, Hôpital Necker-Enfants Malades, Service d'Anatomie Pathologique, F-75015 Paris, France

⁸AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Service de Gastroentérologie, F-75012 Paris, France

Correspondence to:

Martine Muleris, e-mail: martine.muleris@inserm.fr

Keywords: pharmacogenetics, iatrogenic cancer, microsatellite instability, thiopurine tolerance, azathioprine

Received: March 20, 2015

Accepted: August 07, 2015

Published: August 17, 2015

ABSTRACT

Mismatch-repair (MMR)-deficient cells show increased *in vitro* tolerance to thiopurines because they escape apoptosis resulting from MMR-dependent signaling of drug-induced DNA damage. Prolonged treatment with immunosuppressants including azathioprine (Aza), a thiopurine prodrug, has been suggested as a risk factor for the development of late onset leukemias/lymphomas displaying a microsatellite instability (MSI) phenotype, the hallmark of a defective MMR system. We performed a dose effect study in mice to investigate the development of MSI lymphomas associated with long term Aza treatment. Over two years, Aza was administered to mice that were wild type, null or heterozygous for the MMR gene *Msh2*. Ciclosporin A, an immunosuppressant with an MMR-independent signaling, was also administered to *Msh2*^{wt} mice as controls. Survival, lymphoma incidence and MSI tumor phenotype were investigated. *Msh2*^{+/-} mice were found more tolerant than *Msh2*^{wt} mice to the cytotoxicity of Aza. In *Msh2*^{+/-} mice, Aza induced a high incidence of MSI lymphomas in a dose-dependent manner. In *Msh2*^{wt} mice, a substantial lifespan was only observed at the lowest Aza dose. It was associated with the development of lymphomas, one of which displayed the MSI phenotype, unlike the CsA-induced lymphomas. Our findings define Aza as a risk factor for an MSI-driven lymphomagenesis process.

INTRODUCTION

Substantial clinical progress in immunosuppression and anticancer chemotherapy has improved the overall survival of patients. Unfortunately, the survival benefits conferred by some long-term treatments such as thiopurine are also associated with an increased risk of developing therapy-related cancers. Thiopurine drugs comprise

azathioprine (Aza) and its metabolite 6-mercaptopurine. Aza is widely used as an immunosuppressive agent for the prevention of transplant graft rejection and for autoimmune diseases such as inflammatory bowel disease (IBD) and autoimmune hepatitis. 6-mercaptopurine is commonly used as part of maintenance therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. Aza is classified as a human carcinogen but the specific mechanisms that

underlie its *in vivo* carcinogenicity following thiopurine therapy remain unclear.

Interestingly, several clinical studies have reported an association between the use of prolonged thiopurine regimens and the occurrence of tumors displaying microsatellite instability (MSI). The MSI tumor phenotype is the hallmark of a defective DNA mismatch repair (MMR) system, the major function of which is to edit errors produced during replication. Inactivation of the MMR system greatly increases spontaneous mutation rates. This is observed as MSI and manifests as frequent deletion mutations in DNA regions comprising mostly of long mono- or dinucleotide tracts. *In vitro* studies have demonstrated that MMR also plays an important role in thiopurine-mediated cytotoxicity, as evidenced by the increased tolerance of MMR-deficient cells to thiopurine exposure. The major cytotoxic effects of thiopurine drugs occur following incorporation of thio-guanine (TG) into DNA and subsequent misincorporation of thymidine opposite TG during DNA replication. The aberrant processing of these DNA base pairs by MMR generates potentially lethal DNA lesions. MMR-deficient cells are unable to initiate lethal processing of the TG-containing base pairs and escape cytotoxicity. Owing to this resistance conferred by defective MMR, known as thiopurine tolerance, it has been suggested that thiopurines may constitute a risk factor for development of human cancer *via* selection of MMR-defective cells that subsequently undergo neoplastic cell transformation following the accumulation of genetic mutations caused by MSI (for review [1]).

Despite *in vitro* functional data suggesting a putative causal role for thiopurine therapy in the development of MSI cancers, the clinical evidence to date is mixed and hence this remains to be established conclusively. An MSI phenotype was observed in acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndromes that developed after organ transplantation and were associated with immunosuppression by Aza therapy [2]. Previous studies from our group [3, 4] also reported a low frequency of the MSI phenotype in immunodeficiency-related non-Hodgkin lymphomas arising in transplant patients who received Aza as part of their immunosuppressive regimen (13/143 vs 0/500 in immunocompetent patients). However, some patients with MSI tumors of suspected iatrogenic origin did not receive thiopurine therapy [4]. Interpretation of these findings is further complicated by the fact that immunosuppressive regimens in transplant patients often combine Aza with other drugs such as steroids and cyclosporin A (CsA). Additionally, the MSI phenotype was not detected in immunodeficiency-related skin cancers and no significant association was observed between Aza intake and MSI in intestinal neoplasias arising in patients with IBD [5–8]. Thus, the clinical association between thiopurine treatment-related cancer and MMR defects remains uncertain and requires further investigation.

Here we describe results using an animal model to address whether thiopurine tolerance is the putative oncogenic mechanism that underlies the emergence of MSI tumors. In an earlier proof of concept study we demonstrated that Aza induced massive and early development of MSI lymphomas in *Msh2*^{+/-} mice carrying a germline mutation in the MMR gene *Msh2* [9]. In contrast, untreated *Msh2*^{+/-} mice developed MSI lymphomas at a very low frequency. This work established the *Msh2* mouse model, the murine equivalent of Lynch syndrome in humans, as relevant for the investigation of thiopurine tolerance as a causal mechanism for MSI cancers. However, the substantial toxicity of Aza in *Msh2* wild type (*Msh2*^{wt}) mice prevented us from investigating the ability of this agent to induce MSI-driven malignancy in mice without a genetic predisposition to MMR defects. Moreover, we did not investigate other immunosuppressants whose action is independent of MMR. In the present work we have therefore performed a dose effect study using wild type, null or heterozygous mice for the *Msh2* gene and identified appropriate long-term treatment conditions for Aza, thus avoiding the major cytotoxic effects encountered previously. We hypothesized that an Aza dosage that enables a substantial survival would allow the development of lymphomas, a small proportion of which would be of MSI phenotype, as observed in humans. To evaluate whether the observed effects could be attributed specifically to Aza, we also investigated CsA, another frequently prescribed immunosuppressant that inhibits the transcription of cytokines, leading to reduced functional ability of effector T-cells.

RESULTS

Impact of azathioprine on *Msh2*^{+/-} and *Msh2*^{ko} mice

We first specified the way Aza treatment could trigger MSI lymphomagenesis in the context of a genetic predisposition to MSI tumor development (*i.e.* *Msh2*^{+/-}). A dose-response relationship was observed for *Msh2*^{+/-} mice, with median survival of 164, 220 and 575 days for Aza 50, 30 and 10 mg/L treatment, respectively ($P < .0001$; Log-rank test) (Figure 1A). Aza50-treated *Msh2*^{+/-} mice systematically developed early onset, MSI lymphomas (22/22 vs 1/10 for untreated *Msh2*^{+/-} animals) (Figure 1B). The onset of tumors was significantly delayed at lower Aza doses, with a mean age of onset of 154, 255 and 539 days for Aza50, Aza30 and Aza10, respectively ($P < .0001$; ANOVA test). The incidence of the MSI phenotype was also significantly reduced with the lowest Aza dose (21/23 and 6/18 for Aza30 and Aza10, respectively $P < .0001$; Fisher's exact test) (Figure 1C). Compared to untreated *Msh2*^{+/-} mice, Aza10-treated mice showed a slightly shorter median survival (575 vs 625 days, respectively; $P = .020$; Log-rank test) but comparable median age of lymphoma onset (539 vs 576 days, respectively; $P = .59$; Student's t test).

As expected, all control *Msh2^{ho}* mice, whether treated or not, were sacrificed before the age of 11 months. The median survival of *Msh2^{ho}* mice was 117 days for untreated animals, 113 days with Aza30 and 109 days with Aza10 ($P = .039$; Log-rank test) (Figure 1A). As expected, all *Msh2^{ho}* mice developed patent tumor syndromes, *i.e.* abnormal enlargement of the thymus, spleen or liver and massive and diffuse proliferation of lymphoma cells, that displayed MSI (Figure 1B).

Impact of azathioprine and ciclosporin A on *Msh2^{wt}* mice

Similar to *Msh2^{+/-}* mice, a dose-response relationship was observed between Aza treatment and the survival of *Msh2^{wt}* mice. The lowest Aza dose was associated with a significantly longer lifespan, with median survival of 78, 123 and 568 days for Aza50, Aza30, and Aza10, respectively ($P < .0001$; Log-rank test) (Figure 2A). Whereas Aza10 was the only dose compatible with a substantial survival of animals, it still demonstrated a significant impact upon lifespan (568 vs 652 days for untreated mice; $P = .007$; Log-rank test). A patent tumor syndrome was observed in a substantial proportion of the Aza10 cohort (7/23, 30.5%) (Figures 2B and 2C). *Msh2^{wt}* mice exposed to higher Aza doses (Aza30 and Aza50) were sacrificed within several months of birth due to poor tolerance to therapy. Consistent with our previous results [9], micro-lymphoproliferations were frequently observed during histological examination of these animals (Figures 2B, 2C). Microscopic foci comprised of medium-to-large neoplastic lymphoid cells were restricted to the spleen area located under the capsule.

CsA-treated *Msh2^{wt}* mice also showed significantly shorter survival compared to untreated mice (345 vs 652 days, respectively; $P = .002$; Log-rank test) (Figure 2A). Aza10- and CsA- treated *Msh2^{wt}* mice showed comparable survival (median of 568 vs 345 days, respectively; $P = .045$; Log-rank test) and both groups showed the presence of lymphomas in about one third of cases (7/23 vs 6/21, respectively; $P = .9$; Chi2 test) (Figures 2B and 2C).

MSI status of azathioprine- and ciclosporin A-induced lymphomas in *Msh2^{wt}* mice

Microsatellite genotyping was performed in all *Msh2^{wt}* mice that developed patent tumor syndrome. As described above, these had mostly been treated with Aza10 or CsA. A diffuse MMR-deficient lymphoma due to proliferation of MSI tumor cells was found in 1/7 Aza10-treated *Msh2^{wt}* mice. At contrast, all tumor DNAs from the 6 CsA-treated mice with lymphoma were non-MSI (Figure 2D). Two Aza30-treated mice that had not been sacrificed at a young age, showed a late onset lymphoma syndrome that was also non-MSI. Tumor cells obtained by laser microdissection from splenic microproliferations in four Aza50-treated *Msh2^{wt}* mice also failed to show MSI. Results of microsatellite instability analysis are detailed in the Supplementary Table S1.

The single *Msh2^{wt}* mouse that developed an MSI tumor syndrome was sacrificed at the age of 315 days because of posterior leg paralysis. At autopsy, it presented an enlarged spleen and lymph nodes. Histological examination revealed massive (>90%) infiltration of the spleen, thymus and lymph node tissues by medium to large size lymphoid cells. Examination of tumor DNA from the splenic tissue with three microsatellite markers revealed a change in length of all three loci compared with normal tissue DNA from the same mouse (Figures 3A and 3C).

Molecular mechanism underlying MMR-deficiency due to thiopurine tolerance in tumor cells

PCR-based genotyping was performed on all MSI tumors that developed in *Msh2^{+/-}* mice following an immunosuppressive regimen. In the majority of cases (22/26, including 19/21 Aza30- and 3/5 Aza10-treated *Msh2^{+/-}* mice), inactivation of the MMR system resulted from somatic loss of the remaining wild type *Msh2* allele (*i.e.* loss of heterozygosity), as previously reported [9]. cDNA sequencing of *Msh2* was performed in the tumor from the single *Msh2^{wt}* mouse that displayed an MSI lymphoma following Aza treatment, however no somatic mutation was detected. Immunohistochemical analysis of *Msh2*, *Mlh1*, *Msh6* and *Pms2* expression was then performed to further investigate the mechanism underlying loss of MMR function in the tumor from this *Msh2^{wt}* mouse. As shown in Figure 3B, the tumor cells stained positively for these four major MMR proteins.

DISCUSSION

In the present study we investigated the ability of Aza, an immunosuppressant from the thiopurine family, to trigger MSI lymphomagenesis in mice. Aza induces apoptosis of MMR-proficient cells *via* the MMR-dependent signaling of Aza-induced DNA damage. Aza also has immunosuppressive properties due to induction of apoptosis in T cells [10] and inhibition of *de novo* purine biosynthesis which hampers cell division especially in lymphocytes, which unlike other cell types cannot use the salvage pathway of purine synthesis [11]. Importantly, the two latter effects are not dependent on MMR status. We previously observed considerably more toxicity at the higher dose of Aza (50 mg/L) in *Msh2^{wt}* mice compared to *Msh2^{+/-}* mice [9] and confirmed here that heterozygous mice are more tolerant to the cytotoxic effects of Aza (Supplementary Figure S1). These observations are consistent with an earlier report using another MMR murine model (*Mlh1* mice) that showed *Mlh1^{+/-}* mice were less sensitive to the lethal effects of a methylating agent than *Mlh1^{wt}* control mice (thiopurines and methylating agents share a common MMR

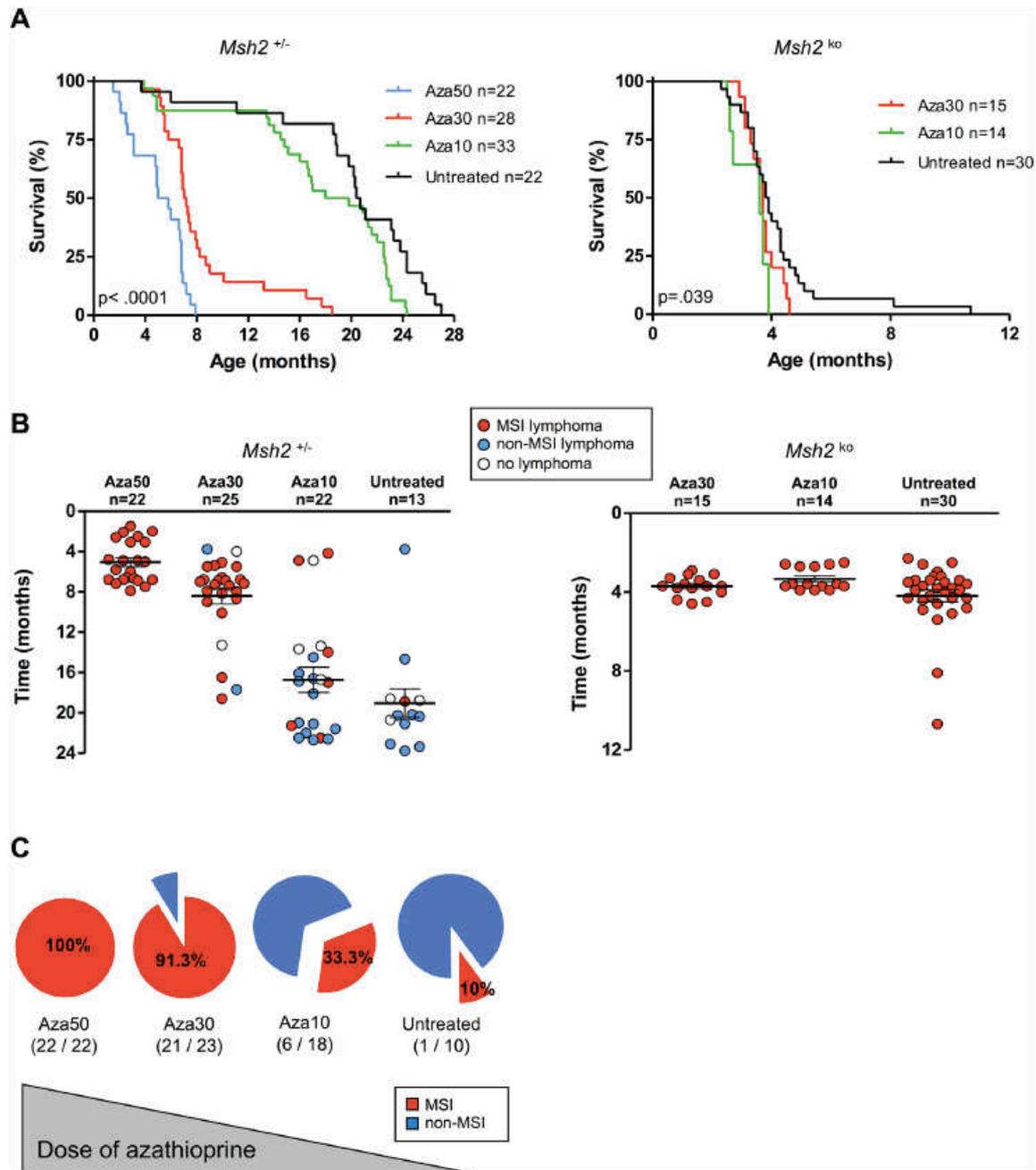


Figure 1: Effect of azathioprine treatment on survival, lymphoma incidence and MSI tumor phenotype in *Msh2*^{+/-} and *Msh2*^{ko} mice. **A.** Evidence for a dose-response relationship between azathioprine treatment and the survival of *Msh2*^{+/-} mice: Kaplan–Meier survival analysis of untreated and azathioprine-treated *Msh2*^{+/-} mice (left) and *Msh2*^{ko} mice (right). Survival curves for *Msh2*^{+/-} mice after Aza50 treatment are from our previous study [9]. All *P* values are two-sided. Log-rank test. **B.** Lymphoma occurrence and delay of onset in the different mice cohorts according to *Msh2*^{+/-} (left) or *Msh2*^{ko} (right) genotype. Mean age of lymphoma onset and standard error of the mean are indicated. **C.** Evidence for a dose-response relationship between azathioprine treatment and incidence of MSI phenotype in lymphomas of *Msh2*^{+/-} mice. Aza10 = azathioprine 10 mg/L; Aza30 = azathioprine 30 mg/L; Aza50 = azathioprine 50 mg/L.

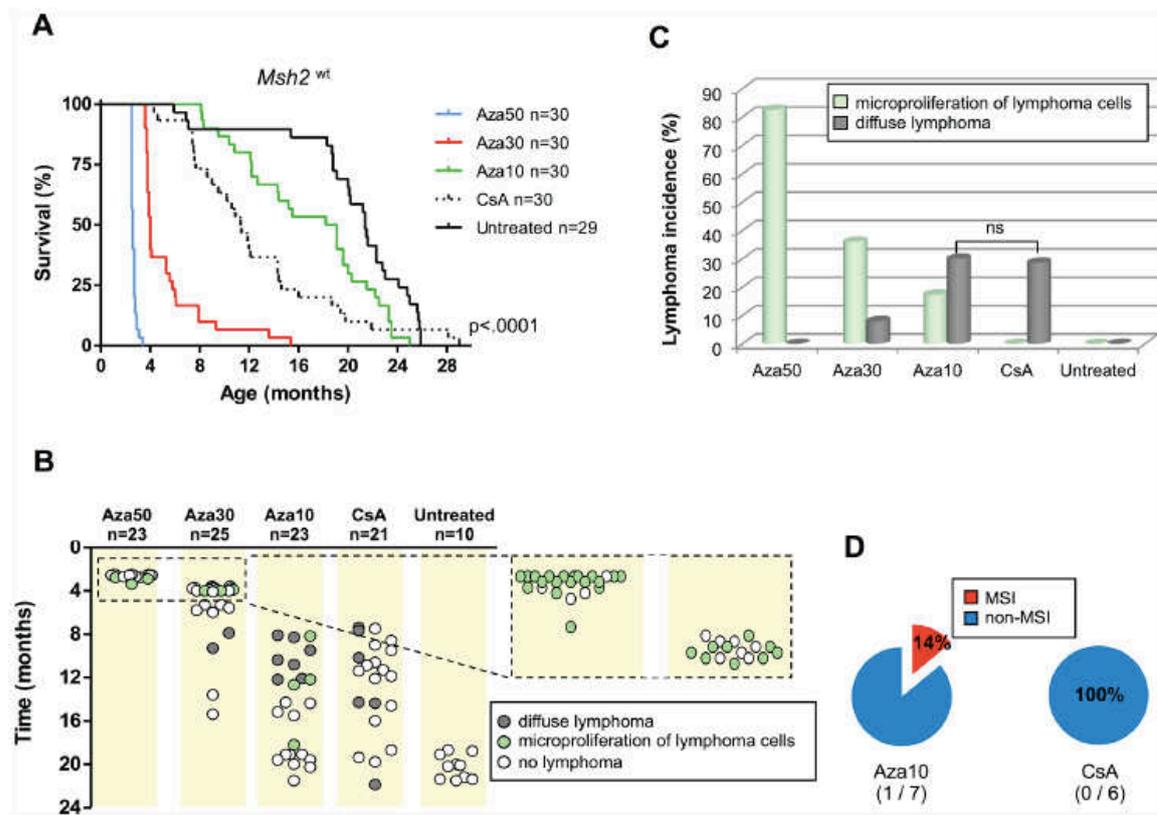


Figure 2: Effect of azathioprine and ciclosporin A treatments on survival, lymphoma incidence and MSI tumor phenotype in *Msh2^{wt}* mice. A. Evidence for a dose-response relationship between immunosuppressive treatment and the survival of *Msh2^{wt}* mice: Kaplan–Meier survival analysis of untreated, azathioprine- and ciclosporin A-treated *Msh2^{wt}* mice. All *P* values are two-sided. Log-rank test. B. Occurrence of lymphoproliferations and delay of onset in the different cohorts of *Msh2^{wt}* mice. C. Lymphoma incidence. Fisher’s exact test; ns=not significant. D. Incidence of MSI phenotype in lymphomas. Aza10 = azathioprine 10 mg/L; Aza30 = azathioprine 30 mg/L; Aza50 = azathioprine 50 mg/L; CsA = ciclosporin A 300 mg/L.

processing mechanism for converting damaged DNA bases into lethal lesion) [12]. Our results also concur with *in vitro* experiments showing that immortalized lymphoblasts from Lynch patients who are heterozygous at the *MSH2* locus were more tolerant to the methylating agent temozolomide than *MSH2^{wt}* cells [13].

Together, these observations suggest the overall clinical impact of Aza results from a combination of factors such as *Msh2* genotype, drug dosage and the balance between the cytotoxic and oncogenic properties of this drug. To account for the observed survival and tumor phenotypes in drug-treated mice with different *Msh2* genotype status, we propose the following explanations. First, all *Msh2^{ko}* mice (untreated and Aza-treated) exhibited the characteristic development of MSI diffuse lymphomas that ultimately resulted in their early death. Whereas untreated *Msh2^{+/+}* mice only rarely develop spontaneous MSI neoplasms, Aza induced a high incidence of MSI lymphomas in a dose-dependent manner in these animals. This is likely to

be related to the burden of induced thiopurine DNA lesions and the resulting selective pressure to escape cell apoptosis through MMR inactivation. In most *Msh2^{+/+}* mice, this inactivation occurs *via* somatic loss of the remaining wild type *Msh2* allele. In Aza-treated *Msh2^{wt}* mice, a balance was observed between the cytotoxic and oncogenic properties of the drug. Survival and incidence of diffuse lymphomas were inversely proportional to the dose of azathioprine. We hypothesize that the microproliferations of lymphoma cells, which were mostly observed in Aza50- and Aza30-treated *Msh2^{wt}* mice, did not lead to lymphoma because either their progression has been efficiently prevented by the immunosuppressive effect of Aza treatment or the mice died prematurely from organ failure related to the high drug cytotoxicity at this dosage. Aza10 and CsA treatments resulted in similar survival times and induction of lymphomas in a substantial and comparable proportion of *Msh2^{wt}* mice. This mirrors the situation in humans where

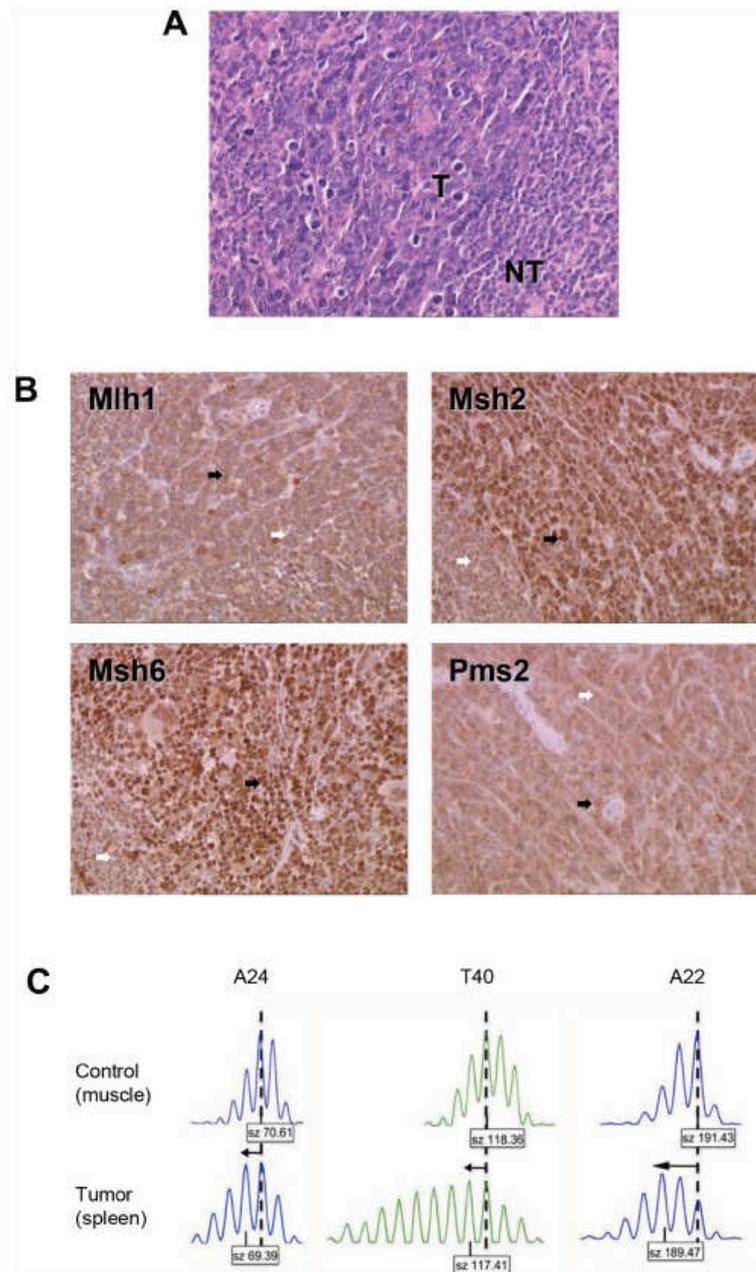


Figure 3: Characterization of the MSI lymphoma syndrome arising in Aza10-treated *Msh2tm* mouse. A. Histological characterization showing hematoxylin–eosin staining of splenic lymphoma. T indicates tumor cells; NT indicates normal lymphocytes. B. Immunohistochemistry of spleen tissue sections. Tumor cells (black arrows) stained positively. Normal lymphocytes (white arrows) showed less pronounced staining of MMR proteins due to their lower proliferative rate. Antibodies against Mlh1 and Pms2 provided less intense IHC staining however positive staining was retained in tumor cells (black arrows). An IHC picture of a non-MSI / MMR-proficient splenic lymphoma can be seen in the Supplementary Figure S2 to illustrate that technical point. C. Allelic profiles of the three noncoding microsatellite markers (A24, T40 and A22) displaying shorter alleles (arrows) for the three markers in tumor (spleen) compared to control (muscle) tissue. Dashed vertical lines indicate the predominant allele size observed in control DNA. Predominant allele size (in base pair) is indicated in the box below each profile.

the development of lymphomas is a known adverse effect of immunosuppressive treatment, although the incidence of iatrogenic lymphomas is much higher in mice. An MSI tumor phenotype was observed in one *Msh2^{wt}* mouse following Aza10 treatment. At contrast, none was observed in the CsA treated *Msh2^{wt}* mice and we found that CsA treatment did not result in a significant induction of MSI lymphomas in *Msh2^{+/-}* mice (data not shown). All together, our data support a causal role for Aza treatment, but not CsA treatment, in triggering MSI-driven lymphomagenesis in *Msh2^{wt}* or *Msh2^{+/-}* mice.

Considering that the risk of lymphoproliferative disorder (LPD) was five times higher in IBD patients treated with thiopurines than in those never exposed to these drugs [14], we searched for MSI phenotype in a series of 13 IBD-related LPD and found one case, which interestingly developed after thiopurine (imurel) therapy (Supplementary Table S2). Thus, this observation broadens the clinical contexts of thiopurine-associated lymphoproliferative disorders with MSI phenotype. Interestingly, as with the lymphoma that developed in the Aza10-treated *Msh2^{wt}* mouse, the tumor cells from this MSI case were shown by immunohistochemistry to retain expression of the 4 MMR proteins (Supplementary Figure S3). This was also the case in about one third (3/8) of the immunodeficiency-related non-Hodgkin lymphomas with a MSI phenotype that develop in transplant patients treated with Aza, that we previously reported [4]. These findings suggest that new mechanisms for inactivation of MMR, which remain to be determined, are associated with clinical contexts of thiopurine treatment.

In summary, our study allows an estimation of the clinical risk associated with prolonged Aza intake based upon the development of iatrogenic tumors with MSI in a mouse model. Our data clearly demonstrate the ability of Aza to trigger lymphomagenesis through an MSI-driven process *in vivo* in the absence of genetic predisposition to MMR defects. The limitation of this study is the small number of *Msh2^{wt}* mice that developed iatrogenic lymphoma with MSI but increasing the number of treated *Msh2^{wt}* mice was not feasible from an ethical point of view. However, based upon post-transplant lymphoproliferative disorders in humans, such event was expected to be rare (9%) [3, 4]. Together, our findings could have important clinical implications for patients receiving azathioprine therapy and more broadly thiopurines. Therefore, we recommend systematic screening for MSI in lymphomas and other neoplasms that arise in patients treated with thiopurine drugs. Such screening could be particularly important because tumors with MSI usually have a different prognosis and sensitivity to chemotherapeutic agents compared with tumors that lack MSI, as has been shown for colorectal carcinomas [15].

MATERIALS AND METHODS

Mice and treatments

Msh2^{+/-} mice on an FVB background [16] were intercrossed to obtain animals that were null, heterozygous, or wild type for the *Msh2* gene. Mice genotypes were determined by PCR analysis [17]. Aza was given orally via the drinking water using Imurel 50 mg (GlaxoSmithKline, Marly-le-Roi, France) to prepare a 50 mg/L, 30 mg/L or 10 mg/L drinking water solution (referred to as Aza50, Aza30 and Aza10 treatment in the text). The dose of azathioprine administered through the Aza50 treatment was estimated at 6–20 mg/kg body weight per day which corresponds to a human dose equivalent of 0.5–1.6 mg/kg body weight per day [18] and lies within the therapeutic range [19, 20]. Groups of mice received Aza10 (14 *Msh2^{ko}*, 33 *Msh2^{+/-}* and 30 *Msh2^{wt}*) or Aza30 (15 *Msh2^{ko}*, 28 *Msh2^{+/-}* and 30 *Msh2^{wt}*) and a group of 30 *Msh2^{wt}* mice also received Aza50. Control mice (30 *Msh2^{ko}*, 22 *Msh2^{+/-}* and 29 *Msh2^{wt}* mice) received only water to drink. A final group of 30 *Msh2^{wt}* mice received drinking water that contained 300 mg/L ciclosporin A (CsA) (Neoral 100 mg/mL, Novartis Pharma SAS, Rueil-Malmaison, France). The dose of CsA administered to mice was estimated at 40–120 mg/kg body weight per day *i.e.* a human dose equivalent of 6.48–9.72 mg/kg body weight per day, which lies in the upper limit of the maintenance treatment administered to human transplant patients (*i.e.* 2 to 6 mg/kg according to Novartis recommendations). Food and drinking were *ad libitum*. All treatments were administered from the age of 6 weeks. Mice were kept in a pathogen-free environment and health was monitored daily. Animals that displayed signs of poor health, including breath insufficiency and posterior leg paralysis were sacrificed by cervical dislocation. The spleen, liver, thymus, lymph nodes and gut were removed for examination together with muscle (as source of germinal DNA). Since *Msh2^{wt}* mice on FVB background are prone to develop lymphomas of late occurrence, analysis was not continued beyond 24 months. All animal experiments were conducted in accordance with the regulations controlling procedures in live animals (approval Ce5/2010/065 of the Ethical Committee for Laboratory Animal Care Charles Darwin France).

Histopathological studies

Tissues were formalin fixed, embedded in paraffin and sectioned for histological analysis with hematoxylin–eosin staining. Mice were categorized into three classes: (i) with patent diffuse lymphoma, (ii) with microproliferation of lymphoma cells limited to the spleen, and (iii) with no histological evidence of lymphoma.

Immunohistochemical studies

Immunohistochemical staining for Mlh1, Msh2, Msh6 and Pms2 proteins was performed in lymphoma cells from the single *Msh2^{wt}* mouse that displayed an MSI lymphoma following Aza treatment. Briefly, 4 μ m sections were incubated with monoclonal antibodies against MLH1 (1/20 dilution, clone G168–728, Pharmingen, San Diego, CA), MSH2 (1/25 dilution, clone FE11, Calbiochem, Oncogene Research Products, Cambridge, MA), MSH6 (1/25 dilution, clone 44, Becton Dickinson, Lexington, NC) and PMS2 (1/20 dilution, clone A16–4, BD PharMingen, Le Pont de Claix, France).

Loss of heterozygosity (LOH) analysis

Normal (muscle) and tumor DNA were extracted for *Msh2* genotype analysis (DNA extraction kit Qiagen, Courtaboeuf, France). PCR products were resolved on agarose gels to assess loss of heterozygosity of the *Msh2* allele [9].

Microdissection of mouse tumor tissue

The tumor cell component from four Aza50-treated *Msh2^{wt}* mice was collected from 10 hematoxylin-eosin-stained 7- μ m tissue sections with a laser-capture microdissection system (PALM Laser, Zeiss, LePecq, France).

Msh2 gene sequencing

Total RNA from the single Aza-treated *Msh2^{wt}* that displayed an MSI lymphoma tissue sample (two tumor sites and the corresponding normal tissue) was analyzed. Reverse transcription-PCR and sequencing were performed as previously reported [9], except that electrophoresis was performed for each amplified fragment and this was extracted specifically with a Gel Extraction Kit (Qiagen, Redwood City, USA). A second amplification was performed on these fragments according to the same PCR protocol in order to magnify the sequence signal and reduce noise.

MSI testing

Polymerase chain reaction analysis of three noncoding mononucleotide repeats (A22, A24, T40) was used to determine the MSI status of tumor tissues [9]. Amplified PCR products were separated by capillary electrophoresis on an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer and analyzed using GeneMapper software (version 3.7, Aplera). Tumors were scored as MSI if the length of at least one mononucleotide repeat marker in tumor DNA differed from that observed in normal tissue DNA obtained from the same animal.

Kaplan-Meier survival curves and statistical analysis

Time of death was recorded for each mouse that was found dead or had been sacrificed. Kaplan-Meier survival curves were generated using Graphpad Prism software (version 5, San Diego, CA). All statistical tests were two-sided.

Characterization of lymphoproliferative disorders (LPD) in patients with inflammatory bowel disease (IBD)

A total of 19,486 patients were enrolled in the CESAME cohort, a French nationwide prospective observational cohort spanning May 2004 to June 2005 to assess the risk of LPD in patients with IBD treated with thiopurines [14]. MSI status was evaluated in 13 cases of LPD from paraffin material using a fluorescent multiplex system comprising 5 quasimonomorphic mononucleotide repeats (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 and NR-27) [21] and expression of MMR proteins was evaluated by immunohistochemistry [4]. LPD were classified according to the WHO classification 2001 and tested for Epstein Barr virus by immunohistochemistry or *in situ* hybridization.

FUNDING

This work was partly supported by grants to Martine Muleris from the "Association pour la Recherche contre le Cancer" (ARC 5079). Sahra Bodo is a recipient of the "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche" and the "Association pour la Recherche contre le Cancer" fellowship.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors disclose no conflicts.

REFERENCES

1. Karran P. Thiopurines, DNA damage, DNA repair and therapy-related cancer. *British medical bulletin*. 2006; 79-80:153–170.
2. Offman J, Opelz G, Doehler B, Cummins D, Halil O, Banner NR, Burke MM, Sullivan D, Macpherson P, Karran P. Defective DNA mismatch repair in acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome after organ transplantation. *Blood*. 2004; 104:822–828.
3. Duval A, Raphael M, Brennetot C, Poirel H, Buhard O, Aubry A, Martin A, Krimi A, Leblond V, Gabarre J, Davi F, Charlotte F, Berger F, Gaidano G, Capello D, Canioni D, et al. The mutator pathway is a feature of immunodeficiency-related lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:5002–5007.

4. Borie C, Colas C, Dartigues P, Lazure T, Rince P, Buhard O, Folliot P, Chalastanis A, Muleris M, Hamelin R, Mercier D, Oliveira C, Seruca R, Chadburn A, Leblond V, Barete S, et al. The mechanisms underlying MMR deficiency in immunodeficiency-related non-Hodgkin lymphomas are different from those in other sporadic microsatellite instable neoplasms. *Int J Cancer*. 2009; 125:2360–2366.
5. Borie C, Euvrard S, Verola O, Buhard O, Barete S, Molina JM, Kanitakis J, Kerob D, Lebbe C, Duval A. No evidence for microsatellite instability in immunodeficiency-related skin cancers. *Am J Transplant*. 2010; 10:192–193.
6. Perrett CM, Harwood CA, McGregor JM, Warwick J, Cerio R, Karran P. Expression of DNA mismatch repair proteins and MSH2 polymorphisms in nonmelanoma skin cancers of organ transplant recipients. *The British journal of dermatology*. 2010; 162:732–742.
7. Wisgerhof HC, Hameetman L, Tensen CP, Morreau H, de Fijter JW, Bouwes Bavinck JN, Willemze R, de Gruijl FR. Azathioprine-induced microsatellite instability is not observed in skin carcinomas of organ transplant recipients. *The Journal of investigative dermatology*. 2009; 129:1307–1309.
8. Svrcek M, El-Bchiri J, Chalastanis A, Capel E, Dumont S, Buhard O, Oliveira C, Seruca R, Bossard C, Mosnier JF, Berger F, Leteurtre E, Lavergne-Slove A, Chenard MP, Hamelin R, Cosnes J, et al. Specific clinical and biological features characterize inflammatory bowel disease associated colorectal cancers showing microsatellite instability. *J Clin Oncol*. 2007; 25:4231–4238.
9. Chalastanis A, Penard-Lacronique V, Svrcek M, Defaweux V, Antoine N, Buhard O, Dumont S, Fabiani B, Renault I, Tubacher E, Flejou JF, Te Riele H, Duval A, Muleris M. Azathioprine-induced carcinogenesis in mice according to Msh2 genotype. *J Natl Cancer Inst*. 2010; 102:1731–1740.
10. Tiede I, Fritz G, Strand S, Poppe D, Dvorsky R, Strand D, Lehr HA, Wirtz S, Becker C, Atreya R, Mudter J, Hildner K, Bartsch B, Holtmann M, Blumberg R, Walczak H, et al. CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *The Journal of clinical investigation*. 2003; 111:1133–1145.
11. Quemeneur L, Gerland LM, Flacher M, Ffrench M, Revillard JP, Genestier L. Differential control of cell cycle, proliferation, and survival of primary T lymphocytes by purine and pyrimidine nucleotides. *J Immunol*. 2003; 170:4986–4995.
12. Kawate H, Itoh R, Sakumi K, Nakabeppu Y, Tsuzuki T, Ide F, Ishikawa T, Noda T, Nawata H, Sekiguchi M. A defect in a single allele of the Mlh1 gene causes dissociation of the killing and tumorigenic actions of an alkylating carcinogen in methyltransferase-deficient mice. *Carcinogenesis*. 2000; 21:301–305.
13. Marra G, D'Atri S, Corti C, Bonmassar L, Cattaruzza MS, Schweizer P, Heinimann K, Bartosova Z, Nystrom-Lahti M, Jiricny J. Tolerance of human MSH2^{+/−} lymphoblastoid cells to the methylating agent temozolomide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98:7164–7169.
14. Beaugerie L, Brousse N, Bouvier AM, Colombel JF, Lemann M, Cosnes J, Hebuterne X, Cortot A, Bouhnik Y, Gendre JP, Simon T, Maynadie M, Hermine O, Faivre J, Carrat F. Lymphoproliferative disorders in patients receiving thiopurines for inflammatory bowel disease: a prospective observational cohort study. *Lancet*. 2009; 374:1617–1625.
15. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol*. 2005; 23:609–618.
16. de Wind N, Dekker M, Berns A, Radman M, te Riele H. Inactivation of the mouse Msh2 gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer. *Cell*. 1995; 82:321–330.
17. Toft NJ, Winton DJ, Kelly J, Howard LA, Dekker M, te Riele H, Arends MJ, Wyllie AH, Margison GP, Clarke AR. Msh2 status modulates both apoptosis and mutation frequency in the murine small intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96:3911–3915.
18. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *Faseb J*. 2008; 22:659–661.
19. Yip JS, Woodward M, Abreu MT, Sparrow MP. How are Azathioprine and 6-mercaptopurine dosed by gastroenterologists? Results of a survey of clinical practice. *Inflammatory bowel diseases*. 2008; 14:514–518.
20. Opelz G, Dohler B. Critical threshold of azathioprine dosage for maintenance immunosuppression in kidney graft recipients. *Collaborative Transplant Study*. *Transplantation*. 2000; 69:818–821.
21. Suraweera N, Duval A, Reperant M, Vaury C, Furlan D, Leroy K, Seruca R, Iacopetta B, Hamelin R. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology*. 2002; 123:1804–1811.

ORIGINAL ARTICLE

HSP110 T17 simplifies and improves the microsatellite instability testing in patients with colorectal cancer

Olivier Buhard,^{1,2} Anaïs Lagrange,^{1,2} Agathe Guilloux,^{1,2,3} Chrystelle Colas,^{1,2} Mouna Chouchène,^{1,2} Kristell Wanherdrick,^{1,2} Florence Coulet,^{1,2} Erell Guillem, ^{1,2} Coralie Dorard,^{1,2} Laetitia Marisa,^{1,4} Adem Bokhari,^{1,2} Malorie Greene,^{1,2} Nizar El-Murr,^{1,2} Sahra Bodo,^{1,2} Martine Muleris,^{1,2} Isabelle Sourouille,^{1,2} Magali Svrcek,^{1,2,5} Pascale Cervera,^{1,2,5} Hélène Blanché,⁶ Jérémie H Lefevre,^{1,2,7} Yann Parc,^{1,2,7} Come Lepage,^{8,9} Caroline Chapusot,^{8,9} Anne-Marie Bouvier,^{8,9} Marie-Pierre Gaub,¹⁰ Janick Selves,¹¹ Kerry Garrett,¹² Barry Iacopetta,¹³ Richie Soong,¹⁴ Richard Hamelin,^{1,2} Carmen Garrido,^{9,15} Olivier Lascols,^{2,16} Thierry André,^{1,2,17} Jean-François Fléjou,^{1,2,5} Ada Collura,^{1,2} Alex Duval^{1,2}

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103518>).

For numbered affiliations see end of article.

Correspondence to
Dr Alex Duval, INSERM, UMRS 938—Centre de Recherche Saint-Antoine, Equipe 'Instabilité des Microsatellites et Cancers', Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer, Paris F-75012, France; alex.duval@inserm.fr

AC and AD are co-leadership.

Received 13 September 2015
Revised 7 January 2016
Accepted 9 January 2016
Published Online First
1 February 2016



CrossMark

To cite: Buhard O, Lagrange A, Guilloux A, et al. *J Med Genet* 2016;**53**:377–384.

ABSTRACT

Background Every colorectal cancer (CRC) patient should be tested for microsatellite instability (MSI), a marker for defective DNA mismatch repair) as a first screen for Lynch syndrome (LS). In this study, we investigated whether it may be possible to improve the detection of MSI in CRC. We examined whether the HT17 DNA repeat (critical for correct splicing of the chaperone HSP110) might constitute a superior marker for diagnosis of the MSI phenotype in patients with CRC compared with the standard panel of markers (pentaplex).

Methods The HT17 polymorphism was analysed in germline DNA from 1037 multi-ethnic individuals. We assessed its sensitivity and specificity for detecting MSI in a multicentre, population-based cohort of 685 patients with CRC and an additional series of 70 patients with CRC considered to be at-risk of LS. All cases were screened earlier for MSI using pentaplex markers. Cases showing discordant HT17/pentaplex results were further examined for the expression of mismatch repair proteins.

Results HT17 status was analysed independently and blinded to previous results from pentaplex genotyping. HT17 showed no germline allelic variation outside a very narrow range. Compared with the pentaplex panel, HT17 showed better sensitivity (0.984 (95% CI 0.968 to 0.995) vs 0.951 (95% CI 0.925 to 0.972)) and similar specificity (0.997 (95% CI 0.989 to 1.000) for both) for the detection of MSI. Furthermore, HT17 alone correctly classified samples judged to be uncertain with the pentaplex panel and showed excellent ability to detect MSI in patients with LS.

Conclusions HT17 simplifies and improves the current standard molecular methods for detecting MSI in CRC.

INTRODUCTION

Approximately 10%–15% of sporadic colorectal cancers (CRCs) show the microsatellite instability (MSI) phenotype.^{1–3} MSI is also found in the great

majority of tumours in patients with Lynch syndrome (LS, for review, see refs. 4, 5) and is a molecular marker for defective DNA mismatch repair (MMR) in tumours. The European Society for Medical Oncology recommended in 2015 that every CRC patient should be tested for MSI and/or DNA MMR deficiency at the time of diagnosis as a first screen for LS.⁶ CRC with MSI are also reported to have distinctive molecular and clinicopathological profiles, including more favourable prognosis.^{4, 7, 8} Some workers have also suggested that CRCs displaying MSI do not respond to 5-fluorouracil-based chemotherapy.^{9–11}

Since its initial description, the methods and criteria used to determine the MSI phenotype in CRC have constantly evolved. Currently, the evaluation of MSI status is based on screening tumour DNA for the presence of somatic deletions in long, non-coding DNA repeats. These markers are somewhat polymorphic in the general population, although they exhibit very little variation.¹² In an effort to standardise MSI analysis in CRC, a workshop held at the National Cancer Institute (NCI) in 1998 recommended the use of a panel of five markers.¹³ In 2002, our group proposed a panel of five mononucleotide repeats (pentaplex) that obviated the need to simultaneously analyse germline DNA from each CRC patient.¹² The pentaplex panel was subsequently approved by the NCI¹⁴ for the screening of MSI and we¹⁵ and Xicola *et al*¹⁶ later demonstrated better specificity and sensitivity compared with the NCI panel. The minimum number of markers required to show instability in order for colon tumours to be classified as MSI with the pentaplex panel was initially deemed to be four out of five. However, more recent work found that just two unstable markers are sufficient to classify colon tumours as MSI with this method.¹⁷

We recently reported a high frequency of mutation for the T17 mononucleotide repeat of *HSP110* (HT17) in MSI CRC.¹⁸ Deletions that

occur in repeats used as markers in the NCI and pentaplex panels are not associated with any known biological effect. In contrast, deletion of the HT17 repeat in tumour DNA leads to increased synthesis of a variant HSP110 isoform due to exon 9 skipping (HSP110DE9).^{18,19} HSP110 is a conserved and abundant molecular chaperone whose expression is induced by a specific set of stress conditions. Somatic deletions in HT17 were shown to increase the sensitivity of cancer cell lines to anticancer agents.¹⁹ The aim of the present study was to investigate whether the HT17 repeat could be used to further improve and simplify the currently used detection methods for MSI in colon cancer.

PATIENTS AND METHODS

Patients, specimens and determination of their MSI status using pentaplex PCR

The institutional review board/ethics committee of the participating centres approved this study.

The Human Genome Diversity panel (HGDP)^{15,20} and a set of unrelated Caucasian DNA samples selected from the 'Centre d'Etude du Polymorphisme Humain' (CEPH) reference families was used in this study.

All 685 tumour DNAs were obtained from patients with CRC (1998–2007) in one of the six centres involved in the study (see online supplementary table S1). They were collected prospectively and MSI testing was performed routinely for all patients with CRC in these clinical centres at the time of diagnosis. MSI status was determined using pentaplex PCR.¹⁵ The cohort used in this study comprised all CRC samples found to have a positive MSI status (at least two unstable markers; $n=313$), as well as tumours from the same clinical centres that displayed either MSS (0 or 1 unstable marker; $n=366$) or uncertain (incomplete profile; $n=6$) status.

An additional cohort of 70 tumour DNAs were further analysed using the pentaplex panel (see online supplementary table S1). Tumour DNAs from this consecutive series of CRCs were collected prospectively over a period of 6 years in our institute (Saint-Antoine Hospital, 2009–2014). These were derived from patients with CRC who were considered to be at high risk of LS.¹⁴

All pentaplex markers were analysed on an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) (see online supplementary table S1).

Determination of the HT17 status of samples

HT17 status was independently determined for all samples and while blinded to the results from pentaplex genotyping.

PCR products were run on an ABI 3100 Genetic Analyzer with GS400HD ROX size standard and POP-7 polymer (Applied Biosystems). GeneMapper (V4.0) software (Applied Biosystems) was used to analyse the HT17 traces. HT17 traces were considered as acceptable when the amplitudes of the major peaks were between 100 and 6000 fluorescence units. Height ratios between peaks were also calculated, especially between T14 and T16 (R1) and between T15 and T16 (R2). An MSI-HT17 Perl script was designed to analyse HT17 traces automatically (see online supplementary methods S1).

Analysis of discordant results between the pentaplex panel and HT17 and assessment of true-negative (MSS) and true-positive (MSI) cases

All tumour samples that displayed discordant results between the pentaplex panel and HT17 were further analysed to confirm their MSI status. This was done by assessing the expression of

MMR proteins (MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2) using immunohistochemistry (IHC).²¹ Eight cases displayed discordant results but could not be analysed for the expression of MMR proteins by IHC due to a lack of suitable tissue. For these cases we screened for the presence of mutation in 15 genes that contain a mononucleotide repeat sequence in their coding region.⁴ IHC was also used to confirm the MSI status of tumours that displayed either concordant positive (MSI, $n=104$, true-positives) or concordant negative (MSS, $n=18$, true-negatives) profiles for the pentaplex and HT17 markers. Finally, IHC was used to confirm the MMR status of cases from the series of 70 tumours from patients deemed at high risk of LS and displaying positive MSI status with pentaplex and/or HT17.

Statistical analysis

The true MSI/MSS status was known for only 122 out of the 685 patients in our cohort. In this situation where the gold standard (IHC) is only partially observed, sensitivities and specificities of the HT17 and pentaplex tests were assessed using iterative algorithms. We used a latent class model formulation.^{22,23} In the saturated model, the joint distribution of the two tests and of the gold standard was assumed to be multinomial with eight categories, corresponding to all possible observations. The multinomial parameters were the prevalence of MSI status and the sensitivities and specificities of the two tests. Hastings–Metropolis²⁴ and expectation-maximisation²⁵ algorithms were run on the data to estimate the five parameters, two-sided CIs and test p values. A detailed description of the model and related estimation is given in the online supplementary methods S2.

RESULTS

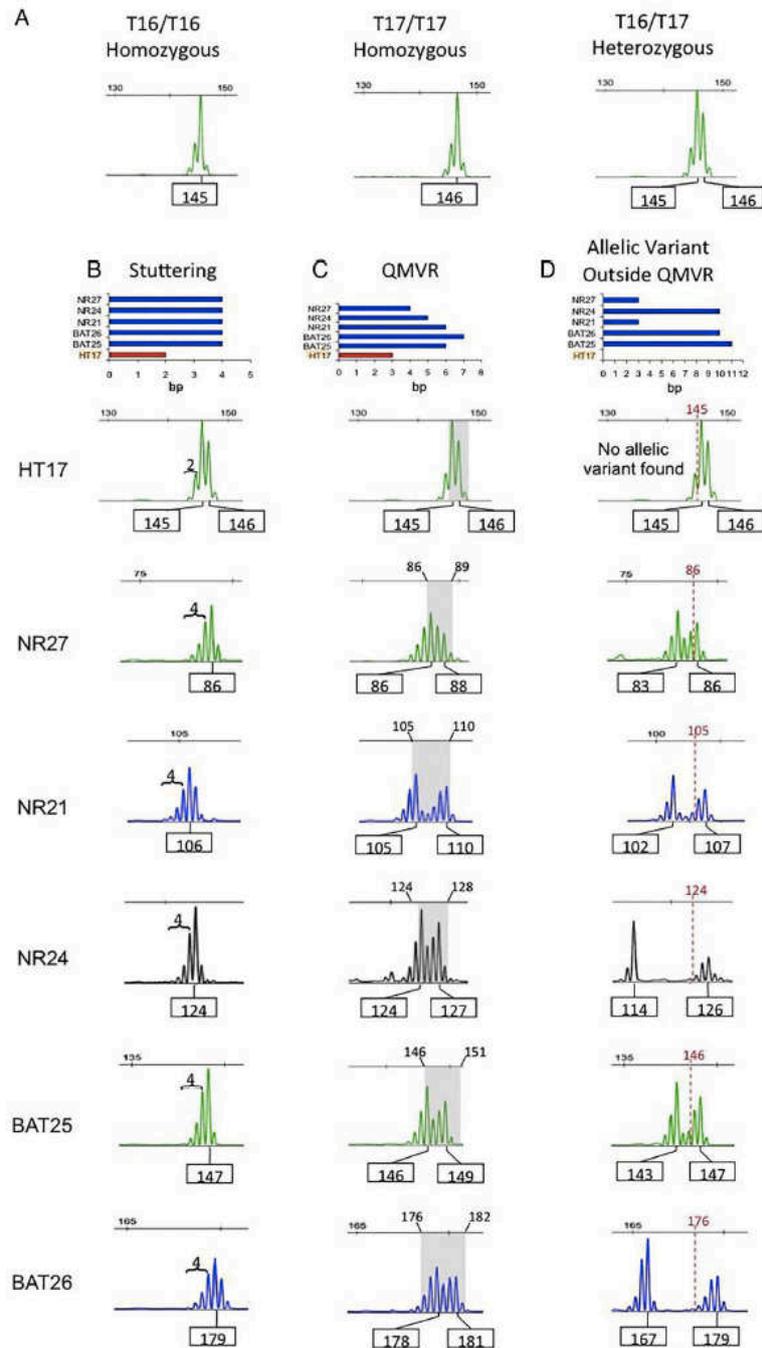
Multi-ethnic germline DNA profiling of the HT17 microsatellite

HT17 genotyping was performed in 1037 samples from the HGDP-CEPH panel representing 54 worldwide populations from 29 geographical regions. Three canonical profiles were observed: T16/T16 (135/1034; 13%), T16/T17 (304/1034; 29.4%) and T17/T17 (595/1034; 57.6%) (figure 1A). The extent of stuttering by Taq polymerase observed for HT17 (2 bp) was only half that observed for the longer MSI markers from the pentaplex panel (4 bp, figure 1B). Moreover, the quasi-monomorphic variation range (QMVR) for each marker in the pentaplex panel was much larger than for HT17 (table 1 and figure 1C). Additionally, all five pentaplex markers displayed allelic variants that were outside their QMVR, whereas no amplification products were observed outside the narrow QMVR for HT17 in the same worldwide populations (table 1 and figure 1D). Overall, the HT17 DNA repeat was remarkably monomorphic, with the size of normal alleles ranging from 145 bp (T16) to 147 bp (T18). Only three individuals (3/1037, 0.3%) displayed the T18 allele (data not shown) (see online supplementary table S2 and figure S1). The data analysis pertains to all samples and thus concerns 2074 alleles. Table 1 summarises the percentage of each allelic size variant within or outside the QMVR for HT17 and for each of the five pentaplex markers in the complete worldwide series.

Determination of HT17 status in colon tumours

In this series of 685 tumours (666 CRCs and 19 adenomas), HT17 status was analysed independently and blinded to previous results from pentaplex genotyping. No aberrant HT17 profiles were detected in 352 of the 366 tumours that displayed unambiguous MSS status with the pentaplex panel. Amongst the

Figure 1 Morphometric analysis of traces for HT17 and for the five pentaplex markers. (A) Canonical profiles for the three main HT17 genotypes observed in the Human Genome Diversity panel-Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (HGDP-CEPH) population are shown, with the respective amplicon sizes indicated in base pairs. (B) Comparative representation of stuttering artefacts for the six markers, including stutters for peaks shorter than the shortest allele annotated in each trace. (C) Comparative representation of the quasi-monomorphic variation ranges (QMVRs) for the six markers. The grey band covers all possible amplicon sizes for each quasi-monomorphic marker. (D) Sample traces are shown of allelic variants outside the QMVR for the six markers. The red dotted lines indicate the minimum size of the QMVR. In (B), (C) and (D), the blue bars are for the pentaplex markers and the red bar is for HT17. The values shown for the bar graphs (B–D) indicate the size in base pairs (stuttering, QMVR) or the shortest size (allelic variant outside QMVR).



remaining 14 cases (table 2), 9 displayed aberrant HT17 alleles that fell outside the QMVR (see online supplementary figure S2A; only four out of nine cases are shown). Owing to the remarkable reproducibility of the only three HT17 genotypes (T17/T17, T16/T17 and T16/T16), we here considered the possibility to also examine the two stutter peaks corresponding to -1 or -2 bp weak allelic shortenings that were associated with

HT17 profiles in germline DNAs. We first calculated the ratios between signal intensities for these -1 and -2 bp stutter peaks and those corresponding to normal alleles, referred to as R1 (for T15:T16 ratio) and R2 (for T14:T16 ratio). The height ratios between the T14 and T15 stutter peaks and the T16 peak in germline DNA never exceeded 0.15 and 0.5 in germline DNAs, respectively, regardless of the HT17 genotype

Table 1 Allelic sizes for each marker

HT17			NR-27		NR-21		NR-24		BAT-25		BAT-26	
Size in bp	Nb alleles	Percentage	Size in bp	Percentage								
140	0	–	81	–	100	–	112	–	133	–	164	–
141	0	–	82	–	101	–	113	–	134	–	165	–
142	0	–	83	0.2	102	0.7	114	0.05	135	0.04	166	0.08
143	0	–	84	1.0	103	1.6	115	0.0	136	0.08	167	0.5
144	0	–	85	1.4	104	0.1	116	0.0	137	0.08	168	0.1
145	574	27.8	86	2.8	105	0.5	117	0.0	138	0.0	169	0.1
146	1497	72.1	87	67.2	106	5.3	118	0.0	139	0.0	170	0.0
147	3	0.1	88	26.6	107	51.7	119	0.0	140	0.0	171	0.2
148	0	–	89	0.8	108	33.7	120	0.0	141	0.2	172	0.2
149	0	–	90	–	109	6.0	121	0.0	142	0.2	173	0.0
			91	–	110	0.2	122	0.0	143	0.4	174	0.0
					111	0.2	123	0.0	144	0.5	175	0.0
					112	–	124	0.4	145	0.2	176	0.08
					113	–	125	27.2	146	1.4	177	1.2
							126	68.9	147	13.7	178	14.5
							127	3.2	148	49.5	179	65.5
							128	0.2	149	27.4	180	15.2
							129	0.0	150	5.5	181	2.3
							130	0.05	151	0.8	182	0.04
							131	–	152	–	183	–
							132	–	153	–	184	–

Allelic sizes were measured from the entire worldwide germline DNA series. For each marker, alleles in the quasi-monomorphic variation ranges (QMVR) are boxed in dark grey cells while polymorphic alleles are in light grey cells.

(see figure 2 and online supplementary figure S2B; only two out of five cases are shown). In contrast, we observed increased values of R1 and/or R2 ratio in the other five primary colon tumour DNAs and these samples were referred to as MSI(R) cases. Importantly, the 14 discordant MSS tumours according to HT17 status were all confirmed to be MMR-deficient by IHC (table 2 and data not shown). Apart from sample PA-059, all 14 tumours showed high levels of contamination with normal DNA (see online supplementary figure S2).

Of the 313 tumours classified as MSI with pentaplex method (ie, at least 2 unstable markers), 309 showed aberrant HT17 profile (table 2). The four remaining cases displayed high level of contamination with normal DNA and did not show aberrant HT17 profile (see online supplementary figure S3).

Finally, six tumour samples in this series were classified as having an uncertain MSI status with the pentaplex panel (table 2). Among these, aberrant deletions in HT17 were detected in four cases, all of which were confirmed as being MSI because they displayed frameshift alteration(s) in at least one coding DNA repeat contained in relevant target genes for MSI. In one of these cases, MMR deficiency was further confirmed by IHC (table 2). In the two remaining samples, neither aberrant HT17 allelic profiles nor frameshift target gene mutations were detected and it was concluded they were likely to be MSS.

Sensitivity and specificity of the HT17 and pentaplex markers for the detection of MSI in colon tumours

The statistical analysis was conducted on 679 tumour samples that showed an unambiguous microsatellite status (MSI or MSS) with pentaplex and that were further analysed with HT17. Eighteen samples displayed discordant results using the two methods (see above). Compared with the reference pentaplex

panel, HT17 offered better sensitivity ($p=0.005$), that is, 0.984 (95% CI 0.968 to 0.995) versus 0.951 (95% CI 0.925 to 0.972), while showing similar specificity ($p=0.5$), that is, 0.997 (95% CI 0.989 to 1.000) (see table 3 and online supplementary figure S2). As expected, when a threshold of three unstable markers rather than two was used to classify MSI with the pentaplex method, the superior sensitivity ($p<0.00001$) and specificity ($p=0.084$) of HT17 became even more apparent (see online supplementary table S3 and table 3).

Comparative analysis of HT17 and pentaplex for the detection of MSI in individuals at high risk of LS

We next compared the performance of HT17 and pentaplex for the detection of MSI in colon tumours from 70 patients with CRC considered to be at high risk of LS (see online supplementary table S1).

Of these 70 tumours, 46 displayed an unambiguous MSS status with the pentaplex panel (see online supplementary table S1). No aberrant HT17 profiles were detected in 45 of these 46 tumours. Although the remaining displayed high levels of contamination with normal DNA, aberrant HT17 alleles were clearly present and MSI status was confirmed by IHC showing loss of MSH2 expression in the tumour (table 4, sample PAL-024). LS was highly probable in this patient, due to the detection of a heterozygous germline variant in the MSH2 gene that was considered likely to be deleterious (table 4 and data not shown).

Of these 70 tumours, 22 displayed an unambiguous MSI status with the pentaplex panel (see online supplementary table S1). All these 22 tumours also showed aberrant HT17 profiles (see online supplementary table S1 and table 4) and were confirmed to be MMR-deficient by IHC (table 4 and data not shown).

Table 2 Analysis of samples with discordant or doubtful HT17/pentaplex profiles and assessment of their MSI status*

Sample name	Nb. instable pentaplex markers/ Nb. informative markers	MSI status (pentaplex)	HT17 genotype†	R1 Ratio	R2 Ratio	MSI status (HT17)‡	Nb. mutated target genes	MMR gene affected (IHC)
<i>False-negative pentaplex</i>								
PA-059	1/5	MSS	<u>143</u> /145/146	NA	NA	MSI	ND	MSH2
AU-198	1/5	MSS	<u>141</u> /146	NA	NA	MSI	ND	MLH1
PA-025	0/5	MSS	<u>142</u> /145/146	NA	NA	MSI	ND	MSH6
PA-035	1/5	MSS	<u>142</u> /145	NA	NA	MSI	ND	MSH2
PA-036	0/5	MSS	<u>142</u> /145	NA	NA	MSI	ND	MSH2
PA-050	0/5	MSS	<u>142</u> /145	NA	NA	MSI	ND	MSH2
PA-052	0/5	MSS	<u>142</u> /146	NA	NA	MSI	ND	MLH1
PA-129	1/5	MSS	<u>140</u> /145	NA	NA	MSI	ND	MSH2
PA-142	1/5	MSS	<u>142</u> /146	NA	NA	MSI	ND	MLH1
PA-130	1/5	MSS	<u>145</u> /146	0.17	0.42	MSI (R)	ND	MLH1
PA-131	0/5	MSS	145	0.14	0.52	MSI (R)	ND	MSH2
PA-143	0/5	MSS	145	0.14	0.53	MSI (R)	ND	MLH1
AU-070	0/5	MSS	145/146	0.25	0.65	MSI (R)	ND	MLH1
AU-235	1/5	MSS	145/146	0.24	0.61	MSI (R)	ND	MLH1
<i>Doubtful pentaplex</i>								
AU-154	1/1	MSI/Doubtful	<u>144</u> /145	NA	NA	MSI	2	MLH1
AU-426	1/2	MSI/Doubtful	<u>141</u> / <u>143</u> /146	NA	NA	MSI	2	ND
AU-441	1/2	MSI/Doubtful	<u>140</u> / <u>143</u> /146	NA	NA	MSI	2	ND
AU-452	1/3	MSI/Doubtful	<u>144</u> /145	NA	NA	MSI	1	ND
AU-413	1/4	MSI/Doubtful	<u>145</u> /146	NA	NA	MSS	0	ND
AU-440	1/3	MSI/Doubtful	146	NA	NA	MSS	0	ND
<i>False-negative HT17</i>								
PA-072	4/5	MSI	146	0.14	0.29	MSS	8	MLH1
AU-001	3/3	MSI	146	ND	0.34	MSS	1	ND
AU-423	2/3	MSI	146	ND	0.24	MSS	1	ND
AU-432	2/3	MSI	146	0.11	0.42	MSS	3	ND

*In this study, we assessed the sensitivity and specificity of HT17 for detecting MSI in a multicentre, population-based cohort of 685 patients with CRC. All cases were screened earlier for MSI using pentaplex markers and then tested for HT17 status independently and blinded to previous results from pentaplex genotyping. This table lists all cases from the cohort of 685 patients with CRC that showed discordant HT17/pentaplex results. They include 14 false-negative cases with pentaplex markers, 6 cases annotated as uncertain with pentaplex markers and 4 false-negative cases with HT17.

†HT17 genotypes are identified by PCR fragments length (in base pairs). Mutated alleles are underlined.

‡MSI (R): Profile with no aberrant signal (within the QMVR of HT17) but displaying an aberrant ratio (143/145 and 144/45).

CRC, colorectal cancer; IHC, immunohistochemistry; MMR, mismatch repair; MSI, microsatellite instability; NA, non-applicable (sample showing an aberrant peak outside QMVR); ND, not determined; QMVR, quasi-monomorphic variation range.

One of these 70 tumours was classified as MSI/uncertain with the pentaplex panel (see online Supplementary table S1) and showed aberrant HT17 profiles (see online supplementary table S1 and table 4, sample PAL-001). This patient showed loss of MLH1 expression in the primary tumour by IHC and was confirmed to be from a LS patient due to the presence of a deleterious germline mutation in MLH1 (table 4 and data not shown).

Finally, one case with unambiguous MSI status with the pentaplex panel showed no aberrant HT17 profile (see online supplementary table S1 and table 4). It displayed high levels of contamination with normal DNA (data not shown). LS was confirmed in this patient by the detection of a deleterious germline mutation in the MSH6 gene (table 4, sample PAL-025 and data not shown).

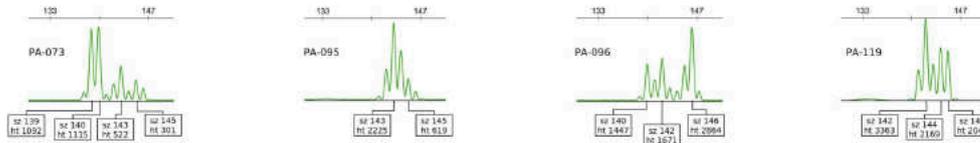
DISCUSSION

There are increasing calls to identify individuals with LS through universal testing of colon tumours for the distinctive molecular features associated with MMR defects. Currently, two standard reference methods are recommended to detect tumour MMR deficiency: MSI by PCR and loss of MMR protein expression by IHC.⁶ The aim of this study was to investigate whether it may be possible to improve the detection of MSI in CRC. HT17 was found to be highly monomorphic, showing a

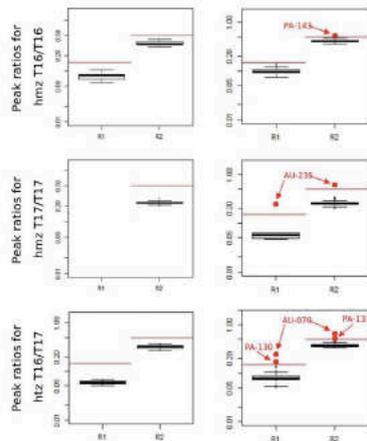
narrower QMVR than all five pentaplex markers used routinely in the clinic. It displayed only two different germline alleles in 99.7% of individuals from the same HGDP-CEPH panel used previously to genotype the pentaplex markers. Moreover, HT17 was significantly more sensitive than the pentaplex method for the detection of MSI, while having the same high level of specificity. This was demonstrated in a large, multicentre and population-based cohort of 685 patients with CRC who were not selected for age or family history. Finally, the ability of HT17 alone to detect MSI was confirmed in an independent series of 70 CRC samples derived from patients at high risk of LS. Overall, these results indicate the exceptional relevance of HT17 as a marker for the detection of MSI in colon tumours and hence also as a screening tool for the diagnosis of LS in patients with CRC.

The extremely high sensitivity of HT17 for MSI is due to its quasi monomorphism. This property allows the detection of even very small somatic changes, such as the one base pair insertion/deletion mutation, that arise in tumour DNA because of defective MMR. We postulate that the lack of germline variation in HT17 is primarily due to its demonstrated functional role in *HSP110* splicing.¹⁸ The exceptional conservation of HT17 in germline DNA allowed us to refine the interpretation of HT17 profiles in colon tumours by developing a quantitative method

A MSI cases



B Normal cases



C Normal Cases

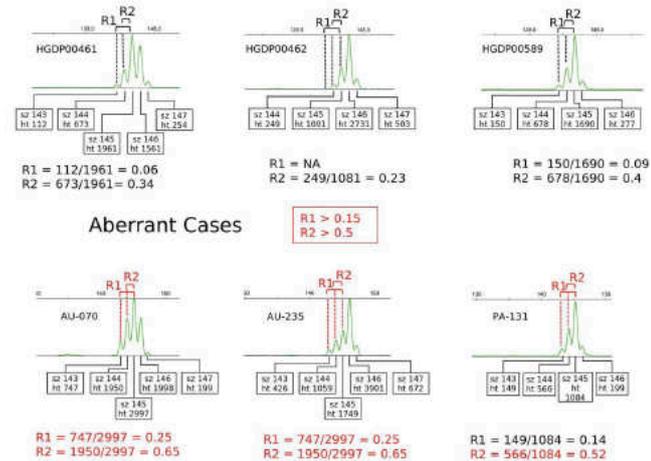


Figure 2 Analysis of discordant results between the pentaplex panel (false negatives) and HT17. (A) Four HT17 traces are shown, deriving from two samples that present with a low tumoral DNA content (PA-073 and PA-095) and two samples that present with a high tumoral DNA content (PA-096 and PA-119). (B) Distribution of R1 and R2 ratios for Human Genome Diversity panel-Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (HGDP-CEPH) normal and the MSS series are plotted separately according to the three main genotypes for HT17. The red lines indicate thresholds for the determination of instability (0.15 for R1, 0.5 for R2). The red dots represent the position of five false-negative cases when microsatellite instability (MSI) was evaluated with the pentaplex panel. (C) Traces of three aberrant cases for the R1 and/or R2 ratios, plotted below traces of three normal samples (HGDP-CEPH panel) of the same genotype, are shown for comparison. The R1/R2 values shown in red exceed the respective thresholds.

termed MSI-Ratio. In contrast, microsatellite markers from the NCI and pentaplex panels are not endowed with any known biological activity and display frequent germline allelic variants.

These numerous variants impede the detection of short somatic deletions or insertions caused by defective MMR within their QMVRs, especially in early CRCs.^{15 17}

Table 3 Sensitivities, specificities and positive and negative predictive values for the determination of MSI by pentaplex markers and by HT17

Pentaplex cut-off *	Model estimator	Markers	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	PPV (95% CI)	NPV (95% CI)
Cut-off=2	Hasting-Metropolis	Pentaplex	0.95 (0.93 to 0.97)	1.00 (0.99 to 1.00)	1.00 (1.00 to 1.00)	0.96 (0.96 to 0.96)
		HT17	0.98 (0.97 to 0.99)	1.00 (0.99 to 1.00)	1.00 (1.00 to 1.00)	0.99 (0.98 to 0.99)
	Expectation-maximisation	Pentaplex	0.94	1	1	0.94
		HT17	0.99	1	1	0.99
Cut-off=3	Hasting-Metropolis	Pentaplex	0.93 (0.90 to 0.96)	1.00 (0.99 to 1.00)	1.00 (1.00 to 1.00)	0.95 (0.95 to 0.95)
		HT17	0.99 (0.98 to 1.00)	1.00 (0.99 to 1.00)	1.00 (1.00 to 1.00)	0.99 (0.99 to 0.99)
	Expectation-maximisation	Pentaplex	0.94	1	1	0.94
		HT17	0.99	1	1	0.99

* The number of unstable markers that were used as a cut-off to define tumour samples as MSI with the pentaplex method. MSI, microsatellite instability.

Table 4 Comparative analysis of T17 and pentaplex for the detection of MSI in patients with CRC considered to be at-risk of Lynch syndrome

Sample name	MSI status (pentaplex)	MSI status (HT17)	MMR gene affected (IHC)
<i>Concordant pentaplex/HT17 status</i>			
PAL-002	MSI	MSI	MLH1
PAL-003	MSI	MSI	MSH2
PAL-004	MSI	MSI	MSH2
PAL-005	MSI	MSI	MLH1
PAL-006	MSI	MSI	MLH1
PAL-007	MSI	MSI	MLH1
PAL-008	MSI	MSI	MLH1
PAL-009	MSI	MSI	MLH1
PAL-010	MSI	MSI	MSH6
PAL-011	MSI	MSI	MSH2
PAL-012	MSI	MSI	MLH1 and MSH2
PAL-013	MSI	MSI	MLH1
PAL-014	MSI	MSI	MLH1
PAL-015	MSI	MSI	MMR-proficient
PAL-016	MSI	MSI	MSH2
PAL-017	MSI	MSI	MLH1
PAL-018	MSI	MSI	MLH1
PAL-019	MSI	MSI	MLH1
PAL-020	MSI	MSI	MSH2
PAL-021	MSI	MSI	MLH1
PAL-022	MSI	MSI	MSH2
PAL-023	MSI	MSI	MLH1
<i>Uncertain pentaplex status</i>			
PAL-001	MSI/Uncertain	MSI	MLH1
<i>False-negative pentaplex status</i>			
PAL-024	MSS	MSI	MSH2
<i>False-negative HT17 status</i>			
PAL-025	MSI	MSS	MSH6

CRC, colorectal cancer; IHC, immunohistochemistry; MMR, mismatch repair; MSI, microsatellite instability.

A major limitation for the routine detection of MSI using PCR is contamination of the tumour DNA with DNA from non-tumour cells. In this study, HT17 allowed the diagnosis of MSI in 15 primary tumours that were not detected by the pentaplex panel. Fourteen of these samples displayed high levels of contamination with normal DNA, thus highlighting the utility of HT17 for the detection of MSI in this situation. The five MSI samples in which an aberrant HT17 profile was not detected also displayed very low tumour DNA content, illustrating the need for a minimum tumour cell content with this marker as well. Another limitation encountered in routine screening for MSI relates to the detection of rare germline allelic variants outside QMVRs, thus mimicking MSI.^{15–17} Consequently, aberrant variants must be observed in several markers in order to correctly diagnose MSI in a given sample, although the minimum number of unstable markers remains controversial. Our genotype analysis of the HT17 showed that allelic variants outside QMVRs are extremely rare, thus explaining its exceptional specificity even when used alone.

In conclusion, the HT17 profile in tumour DNA is easy to read and interpret, in contrast to the pentaplex markers. The quasi-monomorphism of HT17 is likely to explain the very high sensitivity and specificity of this single marker for the detection of MSI in CRC. Recently, it was reported that MSI status predicted clinical benefit of immune checkpoint blockade with

pembrolizumab, an anti-programmed death 1 immune checkpoint inhibitor, in metastatic patients. These recent findings highlight the clinical interest to phenotype MSI colon tumours using a simple, highly sensitive and specific method. We recommend that HT17 be used alongside the standard pentaplex or NCI panels to identify MSI status. This combined approach should provide maximum sensitivity and therefore clinical benefit, particularly when screening for MSI in samples that are highly contaminated with normal DNA.

Author affiliations

¹INSERM, UMRS 938—Centre de Recherche Saint-Antoine, Equipe 'Instabilité des Microsatellites et Cancers', Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer, Paris, France

²Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

³Centre de Mathématiques Appliquées, Ecole Polytechnique and CNRS UMR 7641, 91128 Palaiseau, France

⁴Programme 'Cartes d'Identité des Tumeurs', Ligue Nationale Contre le Cancer, Paris, France

⁵AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Paris, France

⁶Fondation Jean Dausset-CEPH, Paris, France

⁷AP-HP, Service de Chirurgie Générale et Digestive, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France

⁸Burgundy Cancer Registry, INSERM U866, Burgundy University, Dijon University Hospital, Dijon, France

⁹Faculty of Medicine, INSERM UMR 866, University of Burgundy, Dijon, France

¹⁰INSERM, U682, Développement et Physiopathologie de l'Intestin et du Pancréas, Strasbourg, France

¹¹INSERM, Unité 563, Centre de Recherche sur le Cancer de Toulouse, France

¹²Bendat Family Comprehensive Cancer Centre, St John of God HealthCare, Subiaco, Australia

¹³School of Surgery M507, University of Western Australia, Nedlands, Australia

¹⁴Cancer Science Institute of Singapore, National University of Singapore, Singapore, Singapore

¹⁵Centre de lutte contre le cancer George-François Leclerc, Dijon, France

¹⁶AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Laboratoire Commun de Biologie et Génétique Moléculaires, Paris, France

¹⁷AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Service d'oncologie médicale, Paris, France

Contributors Conception and design: AD. Collection and assembly of data: OB, AL, AC, MC, EG, MS, KG and OL. Data analysis and interpretation: AD, AG, OB and AC. Manuscript writing, revision and review: AD, AC, OB and BI.

Funding This work was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer and by grants from the 'Institut National du Cancer' (INCa). AD group has the label 'La Ligue Contre le Cancer'. AC is a recipient of an INCa fellowship.

Competing interests None declared.

Patient consent Obtained.

Ethics approval The institutional review board/ethics committee of the participating centres approved this study.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

REFERENCES

- Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin PK, Jarvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, Petersen GM, Kinzler KW, Vogelstein B, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993;260:812–16.
- Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993;75:1027–38.
- Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993;363:558–61.
- Duval A, Hamelin R. Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Res* 2002;62:2447–54.
- Colas C, Coulet F, Svrcak M, Collura A, Fléjou JF, Duval A, Hamelin R. Lynch or not Lynch? Is that always a question? *Adv Cancer Res* 2012;113:121–66.
- Stoffel EM, Mangu PB, Gruber SB, Hamilton SR, Kalady MF, Lau MW, Lu KH, Road N, Limburg PJ, American Society of Clinical Oncology, European Society of Clinical Oncology. Hereditary colorectal cancer syndromes: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline endorsement of the familial risk-colorectal cancer: European Society for Medical Oncology Clinical Practice Guidelines. *J Clin Oncol* 2015;33:209–17.

- 7 Vasen HF, Moslein G, Alonso A, Bernstein I, Bertario L, Blanco I, Burn J, Capella G, Engel C, Frayling I, Friedl W, Hes FJ, Hodgson S, Mecklin JP, Møller P, Nagengast F, Parc Y, Renkoren-Sinisalo L, Sampson JR, Stormorken A, Wijnen J. Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer). *J Med Genet* 2007;44:353–62.
- 8 Gruber SB. New developments in Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) and mismatch repair gene testing. *Gastroenterology* 2006;130:577–87.
- 9 Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, Hamilton SR, Laurent-Puig P, Gryfe R, Shepherd LE, Tu D, Redston M, Gallinger S. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003;349:247–57.
- 10 Carethers JM, Smith EJ, Behling CA, Nguyen L, Tajima A, Doctolero RT, Cabrera BL, Goel A, Arnold CA, Miyai K, Boland CR. Use of 5-fluorouracil and survival in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. *Gastroenterology* 2004;126:394–401.
- 11 Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, Thibodeau SN, Labianca R, Hamilton SR, French AJ, Kabat B, Foster NR, Torri V, Ribic C, Grothey A, Moore M, Zaniboni A, Seitz JF, Sinicropo F, Gallinger S. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:3219–26.
- 12 Suraweera N, Duval A, Reperant M, Vaury C, Furlan D, Leroy K, Seruca R, Iacopetta B, Hamelin R. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology* 2002;123:1804–11.
- 13 Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:5248–57.
- 14 Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, Fishel R, Lindor NM, Burgart LJ, Hamelin R, Hamilton SR, Hiatt RA, Jass J, Lindblom A, Lynch HT, Peltomäki P, Ramsey SD, Rodriguez-Bigas MA, Vasen HF, Hawk ET, Bairrett JC, Freedman AN, Srivastava S. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:261–8.
- 15 Buhard O, Cattaneo F, Wong YF, Yim SF, Friedman E, Flejou JF, Duval A, Hamelin R. Multipopulation analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability status of human tumors. *J Clin Oncol* 2006;24:241–51.
- 16 Xicola RM, Llor X, Pons E, Castells A, Alenda C, Piñol V, Andreu M, Castellví-Bel S, Payá A, Jover R, Bessa X, Girós A, Duque JM, Nicolás-Pérez D, García AM, Rigau J, Gassull MA, Gastrointestinal Oncology Group of the Spanish Gastroenterological Association. Performance of different microsatellite marker panels for detection of mismatch repair-deficient colorectal tumors. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:244–52.
- 17 Goel A, Nagasaka T, Hamelin R, Boland CR. An optimized pentaplex PCR for detecting DNA mismatch repair-deficient colorectal cancers. *PLoS ONE* 2010;5:e9393.
- 18 Dorard C, de Thonel A, Collura A, Marisa L, Srceck M, Lagrange A, Jégo G, Wanherdrick K, Joly AL, Buhard O, Gobbo J, Penard-Lacronique V, Zouali H, Tubacher E, Kirzin S, Selves J, Milano G, Etienne-Grimaldi MC, Bengrine-Lefèvre L, Louvet C, Toumigand C, Lefèvre JH, Parc Y, Turet E, Fléjou JF, Gaub MP, Garrido C, Duval A. Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. *Nat Med* 2011;17:1283–9.
- 19 Collura A, Lagrange A, Srceck M, Marisa L, Buhard O, Guilloux A, Wanherdrick K, Dorard C, Taieb A, Saget A, Loh M, Soong R, Zeps N, Platell C, Mews A, Iacopetta B, De Thonel A, Seigneuric R, Marcion G, Chapusot C, Lepage C, Bouvier AM, Gaub MP, Milano G, Selves J, Senet P, Delarue P, Arzouk H, Lacoeste C, Coquelle A, Bengrine-Lefèvre L, Toumigand C, Lefèvre JH, Parc Y, Biard DS, Fléjou JF, Garrido C, Duval A. Patients with colorectal tumors with microsatellite instability and large deletions in HSP110 T17 have improved response to 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Gastroenterology* 2014;146:401–11.e1.
- 20 Cann HM, de Toma C, Cazes L, Legrand MF, Morel V, Piouffe L, Bodmer J, Bodmer WF, Bonne-Tamir B, Cambon-Thomsen A, Chen Z, Chu J, Carcassi C, Contu L, Du R, Excoffier L, Ferrara GB, Friedlaender JS, Groot H, Gurwitz D, Jenkins T, Herrera R, Huang X, Kidd J, Kidd KK, Langaney A, Lin AA, Mehdi SQ, Parham P, Piazza A, Pistillo MP, Qian Y, Shu Q, Xu J, Zhu S, Weber JL, Greely HT, Feldman MW, Thomas G, Dausset J, Cavalli-Sforza LL. A human genome diversity cell line panel. *Science* 2002;296:261–2.
- 21 Srceck M, El-Bchiri J, Chalastanis A, Capel E, Dumont S, Buhard O, Oliveira C, Seruca R, Bossard C, Mosnier JF, Berger F, Leteurtre E, Lavergne-Slove A, Chenard MP, Hamelin R, Cosnes J, Beaugerie L, Turet E, Duval A, Fléjou JF. Specific clinical and biological features characterize inflammatory bowel disease associated colorectal cancers showing microsatellite instability. *J Clin Oncol* 2007;25:4231–8.
- 22 Joseph L, Gyorkos TW, Coupal L. Bayesian estimation of disease prevalence and the parameters of diagnostic tests in the absence of a gold standard. *Am J Epidemiol* 1995;141:263–72.
- 23 Hui SL, Walter SD. Estimating the error rates of diagnostic tests. *Biometrics* 1980;36:167–71.
- 24 Hastings WK. Monte Carlo sampling methods using Markov chains and their applications. *Biometrika* 1970;57:97–109.
- 25 Dempster AP, Laird NM, Rubin DB. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *J R Stat Soc* 1977;39:1–38.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. Détection de cryptes MMR déficientes (MMR-DCF)

A. *Mise en évidence des MMR-DCF*

Nous avons montré dans notre étude que les MMR-DCF étaient retrouvées chez un tiers des patients atteints de syndrome de Lynch. Cette incidence est similaire à celle décrite dans une étude récente (Pai et al. 2018). La première étude rapportant l'existence de ces lésions (Kloor et al. 2012a) décrivait leur présence chez 100% des patients au delà d'une surface analysée de 100mm² de muqueuse normale. Afin de mettre en évidence ces MMR-DCF chez tous les patients il faudrait donc analyser 10 blocs de muqueuse normale sur une pièce de colectomie.

Contrairement aux études précédentes, nous avons cherché à déterminer si l'incidence des MMR-DCF était différente selon la distance à la tumeur en analysant séparément les muqueuses coliques adjacente et distante (définie par un éloignement à plus de 10cm de la tumeur), et nous avons montré que ces lésions surviennent plus fréquemment en muqueuse adjacente qu'en muqueuse distante (ratio 7,6 vs 1,9 MMR-DCF par cm²), et que les foyers multiples surviennent seulement en muqueuse adjacente. Ces éléments incitent à rechercher préférentiellement les MMR-DCF en muqueuse adjacente (plutôt qu'à distance), et les blocs à analyser devraient donc être prélevés au plus près de la tumeur.

En ce qui concerne la formation des MMR-DCF, elles seraient des lésions clonales colonisant une crypte entière et viendraient donc d'une même cellule souche. L'ensemble des cellules d'une crypte aurait pour origine 4 à 6 cellules souches mais sont en grande partie clonales ; elles sont colonisées par les cellules descendant d'une même cellule souche, puis remplacées.

B. Différenciation syndrome de Lynch et CCR sporadique

La différenciation syndrome de Lynch et CCR sporadique est d'un intérêt clinique majeur, pour l'établissement du programme de surveillance du patient ainsi que pour le dépistage des apparentés. Le syndrome de Lynch n'est affirmé qu'en cas de mutation germinale pathogène sur un des gènes MMR, et certains cas posent des problèmes diagnostiques en cas de VSI ou d'absence d'identification d'une mutation délétère ; ces patients sont considérés comme « Lynch-like » en l'absence d'argument pour un CCR MSI sporadique (pas de mutation *BRAF*, ni de méthylation du promoteur de *MLH1*). Les patients « Lynch-like » sont actuellement surveillés dans la plupart des cas comme dans le cadre d'un authentique syndrome de Lynch ; cependant la prise en charge des apparentés est plus difficile à standardiser en l'absence de diagnostic génétique.

Les avancées récentes dans la compréhension de l'oncogénèse MSI permettent désormais de différencier au sein des patients « Lynch-like » (Buchanan et al. 2014; Carethers 2014 ; Carethers & Stoffel 2015; Tanakaya 2018) :

- Des cas de CCR sporadiques, par inactivation somatique bi-allélique d'un gène MMR par un autre mécanisme que l'hyperméthylation du promoteur de *MLH1*
 - o Double mutation somatique, ou mutation somatique monoallélique associée à une perte d'hétérozygotie (Mensenkamp et al. 2014).

Je me suis déjà intéressée à cette thématique en recherchant des mutations somatiques sur les gènes du système MMR dans des tumeurs colorectales de patients « Lynch-like » (Sourrouille et al. 2012). Cette étude avait permis de mettre en évidence deux cas de double mutation somatique.

Certaines études décrivent jusqu'à 30% de double mutation somatique dans le cadre du « Lynch-like » (Pearlman et al. 2019).

Sur le plan clinique, les CCR MSI avec double mutation somatique surviennent chez des patients plus âgés que dans le SL, mais plus jeunes que les CCR sporadiques par hyperméthylation, et présentent plus fréquemment une perte de *MLH1/PMS2* ; le risque de CCR associé est plus faible mais là encore supérieur à celui des patients sporadiques, ce qui suggère que certains de ces cas pourraient être liés à un autre facteur favorisant la survenue de ces mutations.

- Mutation somatique d'un gène indépendant du système MMR conduisant à une inactivation secondaire d'un gène MMR ; cela a été décrit avec les mutations de *POLE*, qui conduisent à un phénotype hypermuté (Kang et al. 2015).
- D'autres phénomènes somatiques non identifiés à ce jour
- Des cas de CCR familiaux
 - Une mutation en mosaïque
 Au cours de l'étude précédemment citée, (Sourrouille et al. 2012) nous avons décrit la première mutation en mosaïque par mutation *de novo* sur un gène du système MMR, avec une transmission à la descendance. Il s'agit d'une mutation survenue au cours de l'embryogénèse et présente seulement dans certains tissus du patient ; les tissus porteurs de la mutation de façon constitutionnelle sont exposés au même risque de cancer que dans un authentique SL mais la mutation n'est pas retrouvée au niveau constitutionnel. Cette mutation est en revanche potentiellement transmissible à la descendance si elle est présente dans les gamètes.
 - Une mutation cryptique sur un des gènes MMR
 Il peut s'agir de mutations des régions promotrices (Kwok et al. 2014) ou régulatrices (Antelo et al. 2019), ou de mutations introniques (Clendenning et al. 2011), non explorées par les techniques de séquençage classiques, qui pourraient être responsables d'un risque de CCR intermédiaire en raison d'une pénétrance plus faible (Dowty et al. 2013).
 De la même façon, l'analyse en NGS (Next Generation Sequencing) a permis d'identifier récemment l'insertion de rétrotransposons Alu ou LINE1 dans les introns de *MLH1* et *MSH2* (Qian et al. 2017; Solassol et al. 2019).
 - Une mutation germinale sur un gène indépendant du système MMR
 Une équipe a récemment montré sur une importante cohorte de patients « Lynch-like » (225 patients) 4% de mutations MYH bialléliques, ce qui représente une fréquence plus importante que dans le cadre de CCR non sélectionnés (Castillejo et al. 2014).

Ces études montrent bien l'hétérogénéité de ce groupe de patients « Lynch-like », et démontrent l'importance de pousser plus loin les investigations pour confirmer ou infirmer

le syndrome de Lynch dans ce contexte. En effet, dans le cas d'une mutation en mosaïque, les apparentés peuvent être dépistés, et être pris en charge dans un programme de surveillance adapté s'ils sont porteurs de la mutation ; à l'inverse si le caractère sporadique peut être confirmé, les apparentés peuvent être dispensés d'une surveillance trop lourde.

Il est donc nécessaire d'affiner les critères permettant de différencier les patients atteints de SL des patients sporadiques. Nous avons confirmé dans notre étude que la présence de MMR-DCF était spécifique du syndrome de Lynch et ne sont jamais observées dans les cas de CCR sporadiques, comme cela a été décrit précédemment (Pai et al. 2018) sur un nombre de cas sporadiques similaire à notre série. La présence de ces lésions peut donc être utilisée comme un argument pour classer un patient comme un authentique syndrome de Lynch. Nous avons d'ailleurs dans notre étude observé des MMR-DCF chez un patient Lynch-like, dont la tumeur avait été analysée dans l'étude précédente (patient n°15). Il s'agit d'un patient ayant développé un CCR à 61 ans, avec perte de MSH2 dans la tumeur. Aucune mutation somatique n'avait été mise en évidence, et son cas restait inexpliqué ; la présence de MMR-DCF oriente pour ce patient vers le diagnostic de syndrome de Lynch. La recherche de MMR-DCF pourrait donc être proposée comme outil diagnostique en routine pour aider au diagnostic des cas douteux, mais n'aurait de valeur que dans le diagnostic positif de SL (en cas de présence de MMR-DCF), alors que l'absence de MMR-DCF en muqueuse adjacente ne permettrait pas de conclure puisque tous les patients SL ne présentent pas de MMR-DCF. Cette recherche pourrait également être proposée dans d'autres situations de diagnostic difficile comme les patients chez qui un VSI sur un des gènes du système MMR est diagnostiqué ; la recherche de MMR-DCF viendrait alors en complément d'autres analyses, comme les tests fonctionnels, dans les cas restant douteux à l'issue de ces analyses. Nous proposons à l'issue de nos travaux un algorithme pour aider au diagnostic des CCR MSI difficilement classables, en utilisant la recherche de MMR-DCF en muqueuse adjacente [Figure 19].

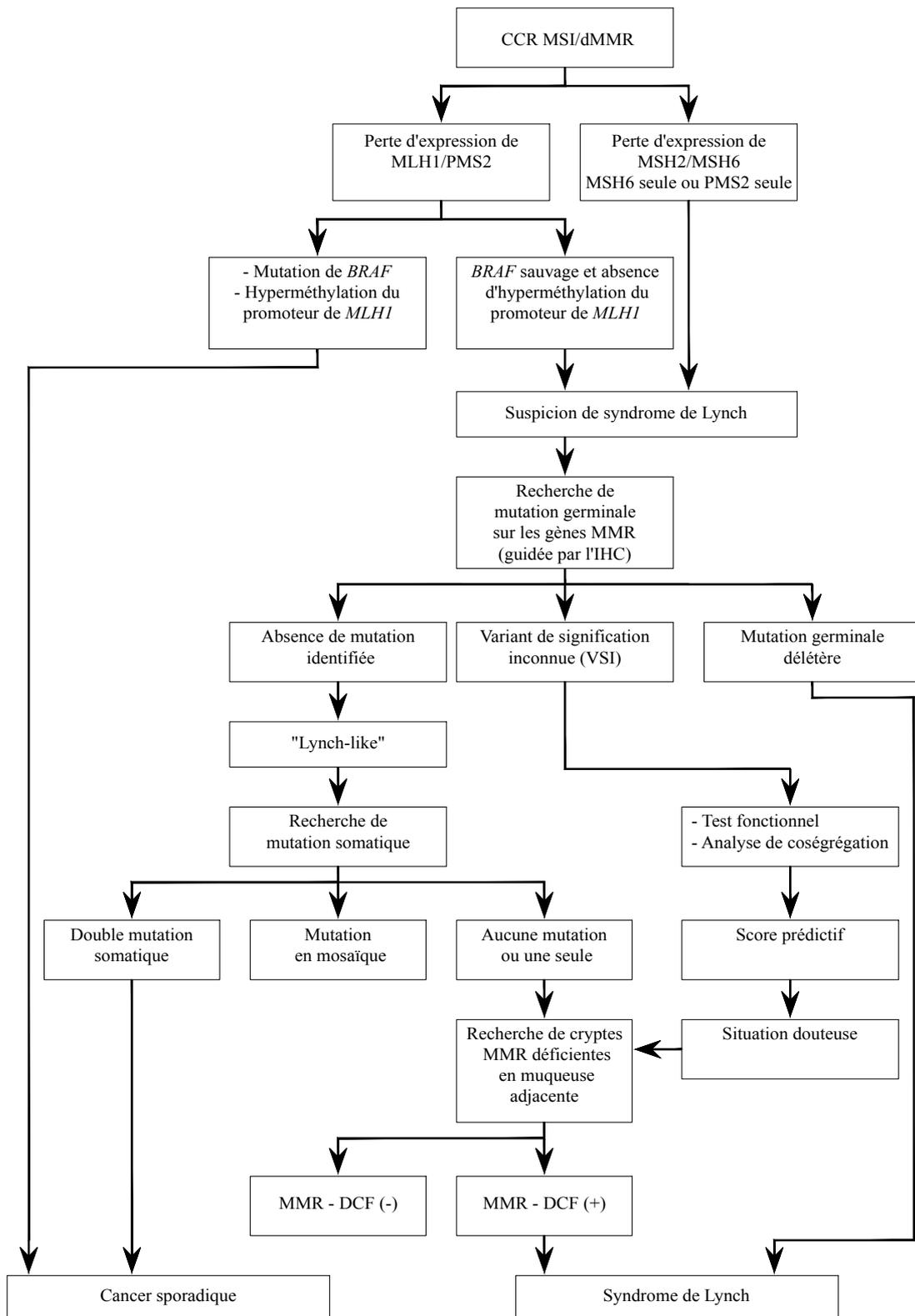


Figure 19 : Algorithme diagnostique pour les patients ayant un CCR MSI difficilement classable

C. Implications thérapeutiques

Les MMR-DCF ont été décrites assez récemment et pour le moment peu d'études s'y sont intéressées. L'évolution naturelle de ces lésions n'est pas bien connue. Le fait que certains patients ont des foyers multiples de MMR-DCF alors que les CCR synchrones sont relativement rares laisse penser que la plupart de ces lésions n'évolueraient finalement pas vers un CCR, même si les lésions synchrones observées (CCR et cryptes MMR-D) correspondent à des lésions d'âges différents.

Différentes hypothèses pourraient expliquer cette non-évolution :

- la crypte MMR-D serait recolonisée à un moment donné par des cellules issues d'une cellule souche MMR proficiente
- l'absence de survenue d'une mutation délétère oncogénique au sein de la crypte
- la survenue de multiples foyers de cryptes MMR-D favoriserait l'exposition précoce à des néoantigènes, et induirait une autovaccination facilitant la destruction de ces foyers par le système immunitaire du patient (Boland 2016)

L'intérêt pronostique de la recherche de MMR-DCF est donc moins évident que son intérêt diagnostique, dans la mesure où on ne sait pas quelle proportion de ces MMR-DCF est susceptible de se transformer. Dans notre étude, leur présence tendait à être associée à un risque plus élevé de 2ème CCR (HR 3,52) mais cette différence n'était pas significative ($p=0,082$). Le traitement chirurgical dans le Syndrome de Lynch n'est aujourd'hui pas standardisé en cas de CCR : il est admis de faire une colectomie segmentaire, ou une colectomie subtotalaire. Les recommandations de l'InCa laissent le choix aux cliniciens, en mettant en balance une chirurgie plus agressive et une surveillance ultérieure allégée avec un risque moindre de récurrence. Certaines études rétrospectives ont montré que la réalisation d'une colectomie subtotalaire plutôt que segmentaire pouvait faire passer le risque de récurrence de 25% à moins de 10% (Kalady et al. 2010; Natarajan et al. 2010), le risque de lésion métachrone pouvant atteindre en cas de colectomie segmentaire 40% et 60% à 20 et 30 ans (Parry et al. 2011). Il n'existe pas de données prospectives comparant la colectomie subtotalaire à la colectomie segmentaire avec surveillance endoscopique assidue. La présence de MMR-DCF pourrait être un argument de décision en faveur d'une colectomie plus étendue (Shawki & Kalady 2016). Cela est cependant difficile à mettre en œuvre, car toutes les études ayant mis en évidence des MMR-DCF l'ont fait sur des pièces opératoires, avec

une grande quantité de matériel analysé ; le diagnostic est donc fait *a posteriori* de l'intervention chirurgicale. L'étude de la muqueuse colique normale à la recherche de MMR-DCF en préopératoire semble difficile. Tout d'abord, contrairement aux ACF, les MMRDCF ne sont pas détectables en chromoendoscopie car elles ne présentent pas d'élargissement luminal. Ensuite, dans le premier article décrivant les MMR-DCF, Kloor estimait la probabilité de détection de MMR-DCF sur des fragments biopsiques millimétriques à 1% (Kloor et al. 2012). Il pourrait être intéressant de réaliser des biopsies plus étendues, de type mucosectomie afin d'en augmenter la probabilité dans la détection, et ce, de préférence en muqueuse adjacente puisque nous avons montré que le ratio de MMR-DCF y était plus important. Cela exposerait cependant à un risque de complication endoscopique plus important.

Les patients porteurs de MMR-DCF seraient peut-être également ceux qui pourraient avoir un bénéfice d'un traitement préventif. Ce traitement est encore en cours d'évaluation mais les résultats à long terme de l'étude CAPP2 suggéraient une diminution du risque de CCR chez les patients Lynch traités par Aspirine au long cours (Burn et al. 2011).

II. Survenue de MMR-DCF et défaut de champ en MGMT

A. Scénario physiopathologique

Une étude précédente de notre groupe avait montré que l'effet de champ en MGMT était plus fréquent dans les CCR MSI que dans les CCR MSS, quel que soit le contexte clinique (Svrcek et al. 2010). Nous avons montré que la survenue de MMR-DCF était associée à l'existence d'une perte d'expression de la MGMT ($p=0.004$), et que l'effet de champ en MGMT pourrait être un événement précurseur de la déficience MMR. Cela nous a conduits à proposer un scénario multi étapes de l'oncogenèse MSI, fondé sur le mécanisme de formation clonale des cryptes :

(1) Dans les cellules déficitaires en MGMT, les lésions O6MeG non réparées conduisent à la mort cellulaire selon un schéma dépendant de MMR. Cette hypothèse est étayée *in vivo* par le fait que les souris MGMT déficientes ont un haut niveau de mort cellulaire dans le tissu colique après administration d'un agent méthylant, ce qui n'est pas le cas chez les souris qui sont à la fois MGMT et MMR déficientes (Bugni et al. 2008).

(2) Ce contexte de déficit MGMT permettrait la sélection de clones MMR-déficients échappant à la mort cellulaire, *via* le phénomène de tolérance à la méthylation. L'inactivation somatique du système MMR est facilitée chez les patients Lynch du fait de l'existence d'une mutation germinale sur un gène MMR.

(3) L'inactivation d'un gène MMR survient dans une cellule souche d'une crypte colique, et colonise l'ensemble de la crypte en formant un foyer MMR déficient monocryptique

(4) La crypte MMR-D se divise et conduit à la formation de cryptes clonales adjacentes, et de foyers polycryptiques.

(5) Enfin, la déficience MMR entraîne l'accumulation de mutations spontanées génomiques entraînant une transformation cellulaire

Nous avons cherché à démontrer ce scénario *in vivo* sur un modèle murin, en administrant un agent méthylant à des souris *Mgmt^{ko}*, déficientes ou non pour le système MMR. Nous avons malheureusement rencontré des difficultés dans l'établissement de ce modèle en raison d'une très grande sensibilité des souris *Mgmt^{ko}/Msh2^{wt}* aux agents méthylants entraînant une mort précoce. Nous avons cherché, à l'instar de ce que nous avons fait dans l'étude sur le modèle murin de lymphomagenèse avec les thiopurines (Bodo et al. 2015), à jouer sur une balance entre les propriétés cytotoxiques et oncogéniques des agents méthylants en diminuant les doses, mais les CCR induits dans ces conditions étaient MSS.

B. Prise en charge du syndrome de Lynch

1. Prévention chez les patients Lynch

Le syndrome de Lynch a une pénétrance incomplète, ce qui suggère l'existence d'autres facteurs (génétiques, environnementaux,...) qui pourraient favoriser le développement d'un CCR. Nos résultats suggèrent que les patients Lynch pourraient être plus sensibles aux carcinogènes comme les composés N-nitroso (NOC) qui favorisent la formation de lésions O6MeG, et sont présents en grande quantité dans la fumée de cigarette et certains aliments. La MGMT est un facteur majeur de défense contre les lésions de l'ADN induites par les NOC ; la consommation régulière et en grande quantité d'aliments riches en NOC peut saturer l'activité de la MGMT dans le colon, et induire la persistance de lésions O6MeG non réparées. Chez les patients atteints de syndrome de Lynch, ces lésions peuvent favoriser la

sélection de clones MMR déficients, sous forme de MMR-DCF. Ces résultats suggèrent qu'il faudrait recommander des règles hygiéno-diététiques aux patients atteints de syndrome de Lynch afin de réduire le risque de développer un défaut de champ en MGMT. Ces mesures devraient comporter un sevrage tabagique (qui est déjà recommandé dans le syndrome de Lynch en raison du risque de carcinome urothélial), et un régime pauvre en nitrosamines.

2. Implications thérapeutiques

De la même façon, certaines drogues de chimiothérapie comme les agents méthylants sont aussi source de NOC, et peuvent entraîner une saturation de la MGMT et favoriser l'apparition d'un défaut de champ en MGMT dans le colon ; cela favoriserait la sélection de clones MMR-déficients via le phénomène de tolérance à la méthylation. C'est notamment le cas du temozolomide (TMZ) qui est le traitement standard des glioblastomes, une tumeur qui survient occasionnellement chez les patients LS (Barrow et al. 2009). Nos résultats suggèrent que l'utilisation de ces drogues doit être évitée dans le cadre du syndrome de Lynch.

Par un mécanisme similaire, les thiopurines pourraient favoriser l'apparition de tumeurs MSI chez les patients atteints de syndrome de Lynch et leur utilisation devrait aussi être évitée dans ce contexte, comme cela a déjà été démontré chez la souris (Chalastanis et al. 2010; Bodo et al. 2015).

CONCLUSION

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée aux facteurs génétiques et environnementaux favorisant l'émergence de lésions précancéreuses de la cancérogénèse MSI, les cryptes MMR-déficientes. Mes travaux ont permis de confirmer que ces lésions n'étaient observées que dans le contexte clinique du syndrome de Lynch et jamais dans les cancers colorectaux MSI sporadiques. Ils ont également permis d'apporter des éléments sur la genèse de ces lésions en montrant que les foyers de cryptes MMR déficients s'accumulent dans des régions de la muqueuse qui ont perdu l'expression de MGMT et sont situées à proximité de la tumeur.

Les découvertes récentes concernant le caractère prédictif du phénotype tumoral MSI sur la réponse au traitement (notamment l'immunothérapie) ont permis de susciter l'intérêt des cliniciens et d'inciter de plus en plus d'équipes à réaliser un screening MSI systématique en cas de CCR, comme cela était préconisé depuis plusieurs années. En effet, l'importance de connaître ce phénotype est désormais non seulement diagnostique mais aussi thérapeutique. Cela a soulevé de nouvelles questions sur les mécanismes de l'oncogénèse MSI, en particulier pour les patients « Lynch-like » qui posent un problème diagnostique. Nos travaux ont permis de proposer une stratégie d'aide au diagnostic à mettre en place chez ces patients, mais aussi de montrer le rôle de la déficience en MGMT comme événement précurseur de la cancérogénèse dans ce contexte.

REFERENCES

- Aaltonen, L.A. et al., 1993. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 260(5109), pp.812–816.
- Aaltonen, L.A. et al., 1998. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *The New England journal of medicine*, 338(21), pp.1481–1487.
- Abe, H. et al., 2018. MGMT Expression Contributes to Temozolomide Resistance in H3K27M-Mutant Diffuse Midline Gliomas and MGMT Silencing to Temozolomide Sensitivity in IDH-Mutant Gliomas. *Neurol Med Chir* 58 (7): 290–95.
- Aggarwal, N. et al., 2017. The Association of Low-Penetrance Variants in DNA Repair Genes with Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nature Publishing Group*, 8(7), p.e109.
- Akbulut, H. et al., 2004. Activity of irinotecan, cisplatin and dacarbazine (CPD) combination in previously treated patients with advanced colorectal carcinoma. *Experimental oncology*, 26(2), pp.149–152.
- Akiyama, Y. et al., 1997. Germ-line mutation of the hMSH6/GTBP gene in an atypical hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindred. *Cancer Research*, 57(18), pp.3920–3923.
- Allan, J.M. & Travis, L.B., 2005. Mechanisms of Therapy-Related Carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 5(12), pp.943–955.
- Allay, E., Veigl, M. & Gerson, S.L., 1999. Mice over-expressing human O6 alkylguanine-DNA alkyltransferase selectively reduce O6 methylguanine mediated carcinogenic mutations to threshold levels after N-methyl-N-nitrosourea. *Oncogene*, 18(25), pp.3783–3787.
- Amatu, A. et al., 2013. Promoter CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme MGMT predicts clinical response to dacarbazine in a phase II study for metastatic colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, 19(8), pp.2265–2272.
- Andre, T. et al., 2015. Adjuvant Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin in Stage II to III Colon Cancer: Updated 10-Year Survival and Outcomes According to BRAF Mutation and Mismatch Repair Status of the MOSAIC Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33(35), pp.4176–4187.
- Antelo, M. et al., 2019. Lynch-like syndrome is as frequent as Lynch syndrome in early-onset nonfamilial nonpolyposis colorectal cancer. *International Journal of Cancer*, 61, p.69.
- Appelqvist, F. et al., 2014. Deletion of the MGMT gene in familial melanoma. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 53(8), pp.703–711.

- Arnold, C.N., Goel, A. & Boland, C.R., 2003. Role of hMLH1 promoter hypermethylation in drug resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer cell lines. *International Journal of Cancer*, 106(1), pp.66–73.
- Atkins, R.J. et al., 2015. Repair mechanisms help glioblastoma resist treatment. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 22(1), pp.14–20.
- Atreya, I. & Neurath, M.F., 2008a. Azathioprine in inflammatory bowel disease: improved molecular insights and resulting clinical implications. *Expert review of gastroenterology & hepatology*, 2(1), pp.23–34.
- Atreya, I. & Neurath, M.F., 2008b. Immune cells in colorectal cancer: prognostic relevance and therapeutic strategies. *Expert review of anticancer therapy*, 8(4), pp.561–572.
- Barrow, E. et al., 2009. Cumulative lifetime incidence of extracolonic cancers in Lynch syndrome: a report of 121 families with proven mutations. *Clinical Genetics*, 75(2), pp.141–149.
- Becker, K. et al., 2003. DNA repair protein MGMT protects against N-methyl-N-nitrosourea-induced conversion of benign into malignant tumors. *Carcinogenesis*, 24(3), pp.541–546.
- Becker, K. et al., 1996. Targeted expression of human O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in transgenic mice protects against tumor initiation in two-stage skin carcinogenesis. *Cancer Research*, 56(14), pp.3244–3249.
- Bellizzi, A.M. & Frankel, W.L., 2009. Colorectal cancer due to deficiency in DNA mismatch repair function: a review. *Advances in anatomic pathology*, 16(6), pp.405–417.
- Bendardaf, R. et al., 2018. Patients with hMLH1 or/and hMSH2-deficient Metastatic Colorectal Cancer Are Associated with Reduced Levels of Vascular Endothelial Growth Factor-1 Expression and Higher Response Rate to Irinotecan-based Regimen. *Anticancer research*, 38(11), pp.6399–6404.
- Bhattacharya, S.K. et al., 1999. A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature*, 397(6720), pp.579–583.
- Billson, H.A. et al., 2009. Dietary variables associated with DNA N7-methylguanine levels and O6-alkylguanine DNA-alkyltransferase activity in human colorectal mucosa. *Carcinogenesis*, 30(4), pp.615–620.
- Bingham, S.A. et al., 1996. Does increased endogenous formation of N-nitroso compounds in the human colon explain the association between red meat and colon cancer? *Carcinogenesis*, 17(3), pp.515–523.
- Bodo, S. et al., 2015. Azathioprine induction of tumors with microsatellite instability: risk evaluation using a mouse model. *Oncotarget*, 6(28), pp.24969–24977.
- Boland, C.R., 2016. Recent discoveries in the molecular genetics of Lynch syndrome. *Familial Cancer*, 15(3), pp.395–403.

- Boland, C.R. & Lynch, H.T., 2013. The History of Lynch Syndrome. *Familial Cancer*, 12(2), pp.145–157.
- Boland, C.R. & Shike, M., 2010. Report From the Jerusalem Workshop on Lynch Syndrome-Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 138(7), pp.2197.e1–2197.e7.
- Boland, C.R. & Troncale, F.J., 1984. Familial colonic cancer without antecedent polyposis. *Annals of internal medicine*, 100(5), pp.700–701.
- Boland, C.R. et al., 1998. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. In *Cancer research*. pp. 5248–5257.
- Borie, C. et al., 2009. The mechanisms underlying MMR deficiency in immunodeficiency-related non-Hodgkin lymphomas are different from those in other sporadic microsatellite instable neoplasms. *International Journal of Cancer*, 125(10), pp.2360–2366.
- Bouvet, D et al., 2019. Improved Functional Characterization of Lynch Syndrome Associated Mlh1 and Msh2 Variants Based on Methylation Tolerance. *Gastroenterology*, in press.
- Boiyadzis, M.M. et al., 2018. Significance and implications of FDA approval of pembrolizumab for biomarker-defined disease. pp.1–7.
- Branch, P. et al., 1993. Defective mismatch binding and a mutator phenotype in cells tolerant to DNA damage. *Nature*, 362(6421), pp.652–654.
- Bronner, C.E. et al., 1994. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature*, 368(6468), pp.258–261.
- Buchanan, D.D. et al., 2014. Clinical problems of colorectal cancer and endometrial cancer cases with unknown cause of tumor mismatch repair deficiency (suspected Lynch syndrome). *The application of clinical genetics*, 7, pp.183–193.
- Buermeyer, A.B. et al., 1999. The human MLH1 cDNA complements DNA mismatch repair defects in Mlh1-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Cancer Research*, 59(3), pp.538–541.
- Bugni, J.M., Meira, L.B. & Samson, L.D., 2008. Alkylation-induced colon tumorigenesis in mice deficient in the Mgmt and Msh6 proteins. *Oncogene*, 28(5), pp.734–741.
- Buhard, O. et al., 2016. HSP110T17 simplifies and improves the microsatellite instability testing in patients with colorectal cancer. *Journal of Medical Genetics*, 53(6), pp.377–384.

- Buhard, O. et al., 2006. Multipopulation Analysis of Polymorphisms in Five Mononucleotide Repeats Used to Determine the Microsatellite Instability Status of Human Tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24(2), pp.241–251.
- Burn, J. et al., 2011. Long-term effect of aspirin on cancer risk in carriers of hereditary colorectal cancer: an analysis from the CAPP2 randomised controlled trial. *Lancet*, 378(9809), pp.2081–2087.
- Canard, G. et al., 2011. Screening for Lynch Syndrome in Colorectal Cancer: Are We Doing Enough? *Annals of Surgical Oncology*.
- Capel, E., Fléjou, J.F. & Hamelin, R., 2007. Assessment of MLH1 promoter methylation in relation to gene expression requires specific analysis. *Oncogene*, 26(54), pp.7596–7600.
- Carethers, J.M., 2014. Differentiating Lynch-like from Lynch syndrome. *Gastroenterology*, 146(3), pp.602–604.
- Carethers, J.M. & Stoffel, E.M., 2015. Lynch syndrome and Lynch syndrome mimics: The growing complex landscape of hereditary colon cancer. *World journal of gastroenterology : WJG*, 21(31), pp.9253–9261.
- Castillejo, A. et al., 2014. Prevalence of germline MUTYH mutations among Lynch-like syndrome patients. *European Journal of Cancer*, 50(13), pp.2241–2250.
- Chalastanis, A. et al., 2010. Azathioprine-induced carcinogenesis in mice according to Msh2 genotype. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 102(22), pp.1731–1740.
- Chan, A.O.-O. et al., 2002. CpG island methylation in aberrant crypt foci of the colorectum. *The American journal of pathology*, 160(5), pp.1823–1830.
- Chan, T.L. et al., 2006. Heritable germline epimutation of MSH2 in a family with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nature Genetics*, 38(10), pp.1178–1183.
- Chang, B.D. et al., 1993. Estrous cycle modulation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase expression in rat mammary epithelial cells. *Cancer letters*, 75(1), pp.11–18.
- Christmann, M. et al., 2011. O(6)-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in normal tissues and tumors: enzyme activity, promoter methylation and immunohistochemistry. *Biochimica et biophysica acta*, 1816(2), pp.179–190.
- Claverys, J.P. & Lacks, S.A., 1986. Heteroduplex deoxyribonucleic acid base mismatch repair in bacteria. *Microbiological reviews*, 50(2), pp.133–165.
- Clendenning, M. et al., 2011. Mutation deep within an intron of MSH2 causes Lynch syndrome. *Familial Cancer*, 10(2), pp.297–301.
- Cohen, R. et al., 2018. Association of Primary Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors in Metastatic Colorectal Cancer With Misdiagnosis of Microsatellite Instability or Mismatch Repair Deficiency Status. *JAMA Oncology*, pp.1–9.

- Collura, A. et al., 2014. Patients With Colorectal Tumors With Microsatellite Instability and Large Deletions in HSP110 T. *Gastroenterology*, 146(2), pp.401–411.e1.
- Cooper, D.L., Lahue, R.S. & Modrich, P., 1993. Methyl-directed mismatch repair is bidirectional. *The Journal of biological chemistry*, 268(16), pp.11823–11829.
- Cooper, H.S. et al., 2000. Dysplasia and cancer in the dextran sulfate sodium mouse colitis model. Relevance to colitis-associated neoplasia in the human: a study of histopathology, B-catenin and p53 expression and the role of inflammation. *Carcinogenesis*, 21(4), pp.757–768.
- de Jong, A.E. et al., 2006. Decrease in mortality in Lynch syndrome families because of surveillance. *Gastroenterology*, 130(3), pp.665–671.
- Diaz, L.A. & Le, D.T., 2015. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *The New England journal of medicine*, 373(20), pp.1979–1979.
- Dillon, J.L. et al., 2017. Universal screening for Lynch syndrome in endometrial cancers: frequency of germline mutations and identification of patients with Lynch-like syndrome. *Human Pathology*, 70, pp.121–128.
- Dorard, C. et al., 2011. Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. *Nature Medicine*, 17(10), pp.1283–1289.
- Dowty, J.G. et al., 2013. Cancer Risks for MLH1 and MSH2 Mutation Carriers. *Human Mutation*, 34(3), pp.490–497.
- Dunlop, M.G. et al., 1997. Cancer risk associated with germline DNA mismatch repair gene mutations. *Human molecular genetics*, 6(1), pp.105–110.
- Duval, A. & Hamelin, R., 2002. Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Research*, 62(9), pp.2447–2454.
- Edelmann, W. et al., 2000. The DNA mismatch repair genes Msh3 and Msh6 cooperate in intestinal tumor suppression. *Cancer Research*, 60(4), pp.803–807.
- Ellegren, H., 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5(6), pp.435–445.
- Erasimus, H. et al., 2016. DNA repair mechanisms and their clinical impact in glioblastoma. *Mutation research. Reviews in mutation research*, 769, pp.19–35.
- Felton, K., Gilchrist, D.M. & Andrew, S.E., 2007. Constitutive deficiency in DNA mismatch repair: is it time for Lynch III? *Clinical Genetics*, 71(6), pp.499–500.
- Fishel, R., 1999. Signaling mismatch repair in cancer. *Nature Medicine*, 5(11), pp.1239–1241.
- Fishel, R. et al., 1993. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell*, 75(5), pp.1027–1038.

- Furlan, D. et al., 2002. Genetic progression in sporadic endometrial and gastrointestinal cancers with high microsatellite instability. *The Journal of Pathology*, 197(5), pp.603–609.
- Gatalica, Z. et al., 2014. Programmed cell death 1 (PD-1) and its ligand (PD-L1) in common cancers and their correlation with molecular cancer type. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, 23(12), pp.2965–2970.
- Genschel, J. et al., 1998. Isolation of MutSbeta from human cells and comparison of the mismatch repair specificities of MutSbeta and MutSalpha. *The Journal of biological chemistry*, 273(31), pp.19895–19901.
- Germano, G. et al., 2017. Inactivation of DNA repair triggers neoantigen generation and impairs tumour growth. *Nature Publishing Group*, 552(7683), pp.116–120.
- Ghissassi, el, F. et al., 1995. Formation of 1,N6-ethenoadenine and 3,N4-ethenocytosine by lipid peroxidation products and nucleic acid bases. *Chem Res Toxicol*, 8(2), pp.278–283.
- Gil Del Alcazar, C.R. et al., 2016. Augmented HR Repair Mediates Acquired Temozolomide Resistance in Glioblastoma. *Molecular cancer research : MCR*, 14(10), pp.928–940.
- Glassner, B.J. et al., 1999. DNA repair methyltransferase (Mgmt) knockout mice are sensitive to the lethal effects of chemotherapeutic alkylating agents. *Mutagenesis*, 14(3), pp.339–347.
- Glickman, B., van den Elsen, P. & Radman, M., 1978. Induced mutagenesis in dam- mutants of Escherichia coli: a role for 6-methyladenine residues in mutation avoidance. *Molecular & general genetics : MGG*, 163(3), pp.307–312.
- Goel, A. et al., 2010. Aberrant DNA Methylation in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Without Mismatch Repair Deficiency. *Gastroenterology*, 138(5), pp.1854–1862.e1.
- Gologan, A. et al., 2005. Performance of the revised Bethesda guidelines for identification of colorectal carcinomas with a high level of microsatellite instability. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 129(11), pp.1390–1397.
- Grady, W.M. & Carethers, J.M., 2008. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*, 135(4), pp.1079–1099.
- Gryfe, R. et al., 2000. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *The New England journal of medicine*, 342(2), pp.69–77.
- Guinney, J. et al., 2015. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature Medicine*, 21(11), pp.1350–1356.
- Halling, K.C. et al., 1999. Microsatellite instability and 8p allelic imbalance in stage B2 and C colorectal cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 91(15), pp.1295–1303.

- Hampel, H. et al., 2005. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *The New England journal of medicine*, 352(18), pp.1851–1860.
- Haraldsdottir, S. et al., 2014. Colon and endometrial cancers with mismatch repair deficiency can arise from somatic, rather than germline, mutations. *Gastroenterology*, 147(6), pp.1308–1316.e1.
- Håvik, A.B. et al., 2012. MGMT promoter methylation in gliomas-assessment by pyrosequencing and quantitative methylation-specific PCR. *Journal of translational medicine*, 10(1), p.36.
- Hegi, M.E. et al., 2005. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *The New England journal of medicine*, 352(10), pp.997–1003.
- Heighway, J., Margison, G.P. & Santibáñez-Koref, M.F., 2003. The alleles of the DNA repair gene O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase are expressed at different levels in normal human lung tissue. *Carcinogenesis*, 24(10), pp.1691–1694.
- Hempen, P.M. et al., 2003. Evidence of selection for clones having genetic inactivation of the activin A type II receptor (ACVR2) gene in gastrointestinal cancers. *Cancer Research*, 63(5), pp.994–999.
- Her, C. & Doggett, N.A., 1998. Cloning, structural characterization, and chromosomal localization of the human orthologue of *Saccharomyces cerevisiae* MSH5 gene. *Genomics*, 52(1), pp.50–61.
- Hewish, M. et al., 2010. Mismatch repair deficient colorectal cancer in the era of personalized treatment. *Nature reviews. Clinical oncology*, 7(4), pp.197–208.
- Hickman, M.J. & Samson, L.D., 1999. Role of DNA mismatch repair and p53 in signaling induction of apoptosis by alkylating agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(19), pp.10764–10769.
- Hitchins, M.P. & Ward, R.L., 2009. Constitutional (germline) MLH1 epimutation as an aetiological mechanism for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Journal of Medical Genetics*, 46(12), pp.793–802.
- Hoff, Von, D.D. et al., 2010. Pilot study using molecular profiling of patients' tumors to find potential targets and select treatments for their refractory cancers. *Journal of Clinical Oncology*, 28(33), pp.4877–4883.
- Hollingsworth, N.M., Ponte, L. & Halsey, C., 1995. MSH5, a novel MutS homolog, facilitates meiotic reciprocal recombination between homologs in *Saccharomyces cerevisiae* but not mismatch repair. *Genes & development*, 9(14), pp.1728–1739.
- Hussain, S.P. et al., 2000. Increased p53 mutation load in noncancerous colon tissue from ulcerative colitis: a cancer-prone chronic inflammatory disease. *Cancer Research*, 60(13), pp.3333–3337.

- Içli, F. et al., 1999. Phase II study of cisplatin and dacarbazine for metastatic colorectal carcinoma resistant to 5-fluorouracil. *Oncology*, 56(4), pp.297–300.
- Ionov, Y. et al., 2000. Mutational inactivation of the proapoptotic gene BAX confers selective advantage during tumor clonal evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(20), pp.10872–10877.
- Jansen, M. et al., 2001. Protection of hematopoietic cells from O(6)-alkylation damage by O(6)-methylguanine DNA methyltransferase gene transfer: studies with different O(6)-alkylating agents and retroviral backbones. *European journal of haematology*, 67(1), pp.2–13.
- Jasperson, K.W. et al., 2010. Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterology*, 138(6), pp.2044–2058.
- Järvinen, H.J. et al., 2000. Controlled 15-year trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology*, 118(5), pp.829–834.
- Järvinen, H.J. et al., 2009. Ten years after mutation testing for Lynch syndrome: cancer incidence and outcome in mutation-positive and mutation-negative family members. *Journal of Clinical Oncology*, 27(28), pp.4793–4797.
- Jiricny, J., 2006. The multifaceted mismatch-repair system. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(5), pp.335–346.
- Johannessen, L.E. et al., 2018. MGMT Gene Promoter Methylation Status - Assessment of Two Pyrosequencing Kits and Three Methylation-specific PCR Methods for their Predictive Capacity in Glioblastomas. *Cancer Genomics - Proteomics*, 15(6), pp.437–446.
- Jonchere, V. et al., 2018. Identification of Positively and Negatively Selected Driver Gene Mutations Associated With Colorectal Cancer With Microsatellite Instability. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 6(3), pp.277–300.
- Jourdan, F. et al., 2003. Tissue microarray technology: validation in colorectal carcinoma and analysis of p53, hMLH1, and hMSH2 immunohistochemical expression. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 443(2), pp.115–121.
- Julié, C. et al., 2008. Identification in Daily Practice of Patients With Lynch Syndrome (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer): Revised Bethesda Guidelines-Based Approach VersusMolecular Screening. *The American Journal of Gastroenterology*, 103(11), pp.2825–2835.
- Kaina, B. et al., 1997. Chromosomal instability, reproductive cell death and apoptosis induced by O6-methylguanine in Mex-, Mex+ and methylation-tolerant mismatch repair compromised cells: facts and models. *Mutation research*, 381(2), pp.227–241.
- Kaina, B. et al., 2007. MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA repair*, 6(8), pp.1079–1099.

- Kaina, B. et al., 1991. Transfection and expression of human O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) cDNA in Chinese hamster cells: the role of MGMT in protection against the genotoxic effects of alkylating agents. *Carcinogenesis*, 12(10), pp.1857–1867.
- Kaina, B., Margison, G.P. & Christmann, M., 2010. Targeting O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase with specific inhibitors as a strategy in cancer therapy. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 67(21), pp.3663–3681.
- Kalady, M.F., 2013. Sessile serrated polyps: an important route to colorectal cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*, 11(12), pp.1585–1594.
- Kalady, M.F. et al., 2010. Risk of Colorectal Adenoma and Carcinoma After Colectomy for Colorectal Cancer in Patients Meeting Amsterdam Criteria. *Transactions of the ... Meeting of the American Surgical Association*, 128, pp.105–112.
- Kane, M.F. et al., 1997. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Research*, 57(5), pp.808–811.
- Kang, S.Y. et al., 2015. Lynch-like syndrome: characterization and comparison with EPCAM deletion carriers. *International Journal of Cancer*, 136(7), pp.1568–1578.
- Karran, P., 2001. Mechanisms of tolerance to DNA damaging therapeutic drugs. *Carcinogenesis*, 22(12), pp.1931–1937.
- Karran, P. & Bignami, M., 1992. Self-destruction and tolerance in resistance of mammalian cells to alkylation damage. *Nucleic acids research*, 20(12), pp.2933–2940.
- Kastrinos, F. et al., 2017. Development and Validation of the PREMM5 Model for Comprehensive Risk Assessment of Lynch Syndrome. *Journal of Clinical Oncology*, 35(19), pp.2165–2172.
- Katz, L.H. et al., 2016. Screening adherence and cancer risk perceptions in colorectal cancer survivors with Lynch-like syndrome. *Clinical Genetics*, 89(3), pp.392–398.
- Kawate, H. et al., 2000. A defect in a single allele of the Mlh1 gene causes dissociation of the killing and tumorigenic actions of an alkylating carcinogen in methyltransferase-deficient mice. *Carcinogenesis*, 21(2), pp.301–305.
- Kawate, H. et al., 1998. Separation of killing and tumorigenic effects of an alkylating agent in mice defective in two of the DNA repair genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(9), pp.5116–5120.
- Khan, O.A. et al., 2008. A phase II trial of lomeguatrib and temozolomide in metastatic colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, 98(10), pp.1614–1618.
- Kim, H. et al., 1994. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *The American journal of pathology*, 145(1), pp.148–156.

- Kim, S.T. et al., 2018. The impact of microsatellite instability status and sidedness of the primary tumor on the effect of bevacizumab-containing chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of Cancer*, 9(10), pp.1791–1796.
- Kim, S.T. et al., 2017. The Impact of Microsatellite Instability Status and Sidedness of the Primary Tumor on the Effect of Cetuximab-Containing Chemotherapy in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Journal of Cancer*, 8(14), pp.2809–2815.
- Kimura, H. et al., 1998. Increased expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. *Gut*, 42(2), pp.180–187.
- Klingbiel, D. et al., 2014. Prognosis of stage II and III colon cancer treated with adjuvant 5-fluorouracil or FOLFIRI in relation to microsatellite status: results of the PETACC-3 trial. *Annals of Oncology*, 26(1), pp.126–132.
- Kloor, M., Huth, C., Voigt, A.Y., Benner, A., Schirmacher, P., Knebel Doeberitz, von, M. & Bläker, H., 2012a. Prevalence of mismatch repair-deficient crypt foci in Lynch syndrome: a pathological study. *The Lancet Oncology*, 13(6), pp.598–606.
- Kloor, M., Huth, C., Voigt, A.Y., Benner, A., Schirmacher, P., Knebel Doeberitz, von, M. & Bläker, H., 2012b. Prevalence of mismatch repair-deficient crypt foci in Lynch syndrome: a pathological study. *The Lancet Oncology*, 13(6), pp.598–606.
- Knudson, A.G., 1985. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Research*, 45(4), pp.1437–1443.
- Kolodner, R.D. & Marsischky, G.T., 1999. Eukaryotic DNA mismatch repair. *Current Opinion in Genetics & Development*, 9(1), pp.89–96.
- Kondelin, J. et al., 2017. Comprehensive Evaluation of Protein Coding Mononucleotide Microsatellites in Microsatellite-Unstable Colorectal Cancer. *Cancer Research*, 77(15), pp.4078–4088.
- Kondo, E., Horii, A. & Fukushige, S., 2001. The interacting domains of three MutL heterodimers in man: hMLH1 interacts with 36 homologous amino acid residues within hMLH3, hPMS1 and hPMS2. *Nucleic acids research*, 29(8), pp.1695–1702.
- Koyama, H. et al., 2017. Synthesis of PET probe O6-[(3-[¹¹C]methyl)benzyl]guanine by Pd0-mediated rapid C-[¹¹C]methylation toward imaging DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase in glioblastoma. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27(9), pp.1892–1896.
- Kwok, C.-T. 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. *European Journal of Human Genetics*, 22(5), pp.617–624.
- Lanneau, D. et al., 2008. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *Journal of cellular and molecular medicine*, 12(3), pp.743–761.

- Latham, A. et al., 2019. Microsatellite Instability Is Associated With the Presence of Lynch Syndrome Pan-Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 37(4), pp.286–295.
- Lewin, M.H. et al., 2006. Red meat enhances the colonic formation of the DNA adduct O6-carboxymethyl guanine: implications for colorectal cancer risk. *Cancer Research*, 66(3), pp.1859–1865.
- Li, G.-M., 2008. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell research*, 18(1), pp.85–98.
- Li, S.K.H. & Martin, A., 2016. Mismatch Repair and Colon Cancer: Mechanisms and Therapies Explored. *Trends in Molecular Medicine*, 22(4), pp.274–289.
- Ligtenberg, M.J.L. et al., 2009. Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nature Genetics*, 41(1), pp.112–117.
- Lijinsky, W., 1999. N-Nitroso compounds in the diet. *Mutation research*, 443(1-2), pp.129–138.
- Liljegren, A. et al., 2008. Prevalence of adenomas and hyperplastic polyps in mismatch repair mutation carriers among CAPP2 participants: report by the colorectal adenoma/carcinoma prevention programme 2. *Journal of Clinical Oncology*, 26(20), pp.3434–3439.
- Lindgren, G. et al., 2002. Adenoma prevalence and cancer risk in familial non-polyposis colorectal cancer. *Gut*, 50(2), pp.228–234.
- Linnebacher, M. et al., 2001. Frameshift peptide-derived T-cell epitopes: a source of novel tumor-specific antigens. *International Journal of Cancer*, 93(1), pp.6–11.
- Lothe, R.A. et al., 1993. Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Research*, 53(24), pp.5849–5852.
- Lupinacci, R.M. et al., 2018. Prevalence of Microsatellite Instability in Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas. *Gastroenterology*, 154(4), pp.1061–1065.
- Lynch, H.T. & Krush, A.J., 1971a. Cancer family “G” revisited: 1895-1970. *Cancer*, 27(6), pp.1505–1511.
- Lynch, H.T. & Krush, A.J., 1971b. The cancer family syndrome and cancer control. *Surgery, gynecology & obstetrics*, 132(2), pp.247–250.
- Lynch, H.T. & la Chapelle, de, A., 2003. Hereditary colorectal cancer. A. E. Guttmacher & F. S. Collins, eds. *The New England journal of medicine*, 348(10), pp.919–932.
- Lynch, H.T. & Lynch, P.M., 2013. Foreword for "100 years of Lynch syndrome". *Familial Cancer*, 12(2), pp.143–144.

- Lynch, H.T. et al., 1966. Hereditary factors in cancer. Study of two large midwestern kindreds. *Arch Intern Med*, 117(2), pp.206–212.
- Lynch, H.T. et al., 2015. Milestones of Lynch syndrome: 1895-2015. *Nature Reviews Cancer*, 15(3), pp.181–194.
- Macario, A.J.L. & Conway de Macario, E., 2005. Sick chaperones, cellular stress, and disease. *The New England journal of medicine*, 353(14), pp.1489–1501.
- Margison, G.P. et al., 2003. Variability and regulation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis*, 24(4), pp.625–635.
- Marinus, M.G. & Konrad, E.B., 1976. Hyper-recombination in dam mutants of Escherichia coli K-12. *Molecular & general genetics : MGG*, 149(3), pp.273–277.
- Marisa, L. et al., 2018. The Balance Between Cytotoxic T-cell Lymphocytes and Immune Checkpoint Expression in the Prognosis of Colon Tumors. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 110(1), pp.68–77.
- Markowitz, S.D. & Roberts, A.B., 1996. Tumor suppressor activity of the TGF-beta pathway in human cancers. *Cytokine & growth factor reviews*, 7(1), pp.93–102.
- Mas-Moya, J. et al., 2015. Clinicopathological comparison of colorectal and endometrial carcinomas in patients with Lynch-like syndrome versus patients with Lynch syndrome. *Human Pathology*, 46(11), pp.1616–1625.
- Maxwell, J.A. et al., 2006. Quantitative analysis of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase in malignant glioma. *Molecular cancer therapeutics*, 5(10), pp.2531–2539.
- McGivern, A. et al., 2004. Promoter hypermethylation frequency and BRAF mutations distinguish hereditary non-polyposis colon cancer from sporadic MSI-H colon cancer. *Familial Cancer*, 3(2), pp.101–107.
- Mello, J.A. et al., 1996. The mismatch-repair protein hMSH2 binds selectively to DNA adducts of the anticancer drug cisplatin. *Chemistry & biology*, 3(7), pp.579–589.
- Mensenkamp, A.R. et al., 2014. Somatic mutations in MLH1 and MSH2 are a frequent cause of mismatch-repair deficiency in Lynch syndrome-like tumors. *Gastroenterology*, 146(3), pp.643–646.e8.
- Mercader, P., 2010. Muir-Torre syndrome. *Advances in experimental medicine and biology*, 685, pp.186–195.
- Minoo, P., 2013. Toward a Molecular Classification of Colorectal Cancer: The Role of MGMT. *Frontiers in Oncology*, 3, p.266.
- Mirvish, S.S. et al., 2003. N-nitroso compounds in the gastrointestinal tract of rats and in the feces of mice with induced colitis or fed hot dogs or beef. *Carcinogenesis*, 24(3), pp.595–603.

- Modrich, P. & Lahue, R., 1996. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annual review of biochemistry*, 65(1), pp.101–133.
- Moreira, L. et al., 2012. Identification of Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 308(15), pp.1555–1565.
- Moreland, N.J. et al., 1999. Modulation of drug resistance mediated by loss of mismatch repair by the DNA polymerase inhibitor aphidicolin. *Cancer Research*, 59(9), pp.2102–2106.
- Muir, E.G., Bell, A.J. & Barlow, K.A., 1967. Multiple primary carcinomata of the colon, duodenum, and larynx associated with kerato-acanthomata of the face. *British Journal of Surgery*, 54(3), pp.191–195.
- Nagasaka, T. et al., 2010. Somatic Hypermethylation of MSH2 Is a Frequent Event in Lynch Syndrome Colorectal Cancers. *Cancer Research*, 70(8), pp.3098–3108.
- Nagel, Z.D. et al., 2017. DNA Repair Capacity in Multiple Pathways Predicts Chemoresistance in Glioblastoma Multiforme. *Cancer Research*, 77(1), pp.198–206.
- Nakao, M., 2001. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene*, 278(1-2), pp.25–31.
- Natarajan, N. et al., 2010. Comparison of Extended Colectomy and Limited Resection in Patients With Lynch Syndrome. *Diseases of the Colon & Rectum*, 53(1), pp.77–82.
- Natrajan, G. et al., 2003. Structures of Escherichia coli DNA mismatch repair enzyme MutS in complex with different mismatches: a common recognition mode for diverse substrates. *Nucleic acids research*, 31(16), pp.4814–4821.
- Nicolaides, N.C. et al., 1994. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature*, 371(6492), pp.75–80.
- Niessen, R.C. et al., 2009. Germline hypermethylation of MLH1 and EPCAM deletions are a frequent cause of Lynch syndrome. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 48(8), pp.737–744.
- Niture, S.K., Rao, U.S. & Srivenugopal, K.S., 2006. Chemopreventative strategies targeting the MGMT repair protein: augmented expression in human lymphocytes and tumor cells by ethanolic and aqueous extracts of several Indian medicinal plants. *Int J Oncol*, 29(5), pp.1269–1278.
- Ochs, K. & Kaina, B., 2000. Apoptosis induced by DNA damage O6-methylguanine is Bcl-2 and caspase-9/3 regulated and Fas/caspase-8 independent. *Cancer Research*, 60(20), pp.5815–5824.
- Ogino, S. et al., 2007. MGMT germline polymorphism is associated with somatic MGMT promoter methylation and gene silencing in colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 28(9), pp.1985–1990.

- Oliveira, C. et al., 2003. BRAF mutations characterize colon but not gastric cancer with mismatch repair deficiency. *Oncogene*, 22(57), pp.9192–9196.
- Overbeek, L.I.H. et al., 2007. Patients with an unexplained microsatellite instable tumour have a low risk of familial cancer. *British Journal of Cancer*, 96(10), pp.1605–1612.
- Overman, M.J. et al., 2017. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *The Lancet Oncology*, 18(9), pp.1182–1191.
- Pagès, F. et al., 2005. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *The New England journal of medicine*, 353(25), pp.2654–2666.
- Pai, R.K. et al., 2018. DNA mismatch repair protein deficient non-neoplastic colonic crypts: a novel indicator of Lynch syndrome. *Modern Pathology*, 11(Suppl 6), p.35.
- Paquis-Flucklinger, V. et al., 1997. Cloning and expression analysis of a meiosis-specific MutS homolog: the human MSH4 gene. *Genomics*, 44(2), pp.188–194.
- Parry, S. et al., 2011. Metachronous colorectal cancer risk for mismatch repair gene mutation carriers: the advantage of more extensive colon surgery. *Gut*, 60(7), pp.950–957.
- Pearlman, R. et al., 2019. Clinical characteristics of patients with colorectal cancer with double somatic mismatch repair mutations compared with Lynch syndrome. *Journal of Medical Genetics*, pp.jmedgenet–2018–105698.
- Pearlman, R. et al., 2018. Two-stain immunohistochemical screening for Lynch syndrome in colorectal cancer may fail to detect mismatch repair deficiency. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 31(12), pp.1891–1900.
- Pegg, A.E., Dolan, M.E. & Moschel, R.C., 1995. Structure, function and inhibition of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 51, pp.167–223.
- Peltomäki, P., 2016. Update on Lynch syndrome genomics. *Familial Cancer*, 15(3), pp.385–393.
- Pierre, F. et al., 2008. Beef meat promotion of dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis biomarkers is suppressed by dietary calcium. *The British journal of nutrition*, 99(5), pp.1000–1006.
- Piñol, V. et al., 2005. Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 293(16), pp.1986–1994.
- Plazzer, J.P. et al., 2013. The InSiGHT database: utilizing 100 years of insights into Lynch syndrome. *Familial Cancer*, 12(2), pp.175–180.

- Popat, S., Hubner, R. & Houlston, R.S., 2005. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(3), pp.609–618.
- Porkka, N. et al., 2018. Epidemiological, clinical and molecular characterization of Lynch-like syndrome: A population-based study. *International Journal of Cancer*, 487, p.330.
- Potocnik, U. et al., 2001. Causes of microsatellite instability in colorectal tumors: implications for hereditary non-polyposis colorectal cancer screening. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 126(2), pp.85–96.
- Pourquier, P., 2011. [Alkylating agents]. *Bulletin du CANCER*, 98(11), pp.1237–1251.
- Povey, A.C., Margison, G.P. & Santibáñez-Koref, M.F., 2007. Lung cancer risk and variation in MGMT activity and sequence. *DNA repair*, 6(8), pp.1134–1144.
- Preuss, I. et al., 1995. O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity in breast and brain tumors. *International Journal of Cancer*, 61(3), pp.321–326.
- Psaroudi, MC., 2000. Toxicity, Mutation Frequency and Mutation Spectrum Induced by Dacarbazine in CHO Cells Expressing Different Levels of O(6)-Methylguanine-DNA Methyltransferase. *Mutation Research*, 447 (2): 257–65.
- Qian, Y. et al., 2017. Identification of pathogenic retrotransposon insertions in cancer predisposition genes. *Cancer Genetics*, 216-217, pp.159–169.
- Rasmussen, L.J. et al., 2012. Pathological assessment of mismatch repair gene variants in Lynch syndrome: past, present, and future. *Human Mutation*, 33(12), pp.1617–1625.
- Ribic, C.M. et al., 2003. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *The New England journal of medicine*, 349(3), pp.247–257.
- Robertson, A., Pattishall, S.R. & Matson, S.W., 2006. The DNA binding activity of MutL is required for methyl-directed mismatch repair in Escherichia coli. *The Journal of biological chemistry*, 281(13), pp.8399–8408.
- Rodriguez-Bigas, M.A. et al., 1997. A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. In *Journal of the National Cancer Institute*. pp. 1758–1762.
- Rodríguez-Soler, M. et al., 2013. Risk of cancer in cases of suspected lynch syndrome without germline mutation. *Gastroenterology*, 144(5), pp.926–932.e1– quiz e13–4.
- Roos, W.P. et al., 2007. Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine. *Oncogene*, 26(2), pp.186–197.
- Ross-Macdonald, P. & Roeder, G.S., 1994. Mutation of a meiosis-specific MutS homolog

- decreases crossing over but not mismatch correction. *Cell*, 79(6), pp.1069–1080.
- Saeterdal, I., Bjørheim, J., et al., 2001. Frameshift-mutation-derived peptides as tumor-specific antigens in inherited and spontaneous colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(23), pp.13255–13260.
- Saeterdal, I., Gjertsen, M.K., et al., 2001. A TGF betaRII frameshift-mutation-derived CTL epitope recognised by HLA-A2-restricted CD8+ T cells. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 50(9), pp.469–476.
- Sakumi, K. et al., 1997. Methylnitrosourea-induced tumorigenesis in MGMT gene knockout mice. *Cancer Research*, 57(12), pp.2415–2418.
- Sakumi, K. et al., 2006. Methylnitrosourea-induced tumorigenesis in MGMT gene knockout mice. *Cancer Research*, 57(12), pp.2415–2418.
- Salovaara, R. et al., 2000. Population-based molecular detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 18(11), pp.2193–2200.
- Samowitz, W.S. et al., 2001. Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, 10(9), pp.917–923.
- Samson, L. et al., 1997. Mammalian DNA repair methyltransferases shield O4MeT from nucleotide excision repair. *Carcinogenesis*, 18(5), pp.919–924.
- Sanada, M. et al., 2004. Killing and mutagenic actions of dacarbazine, a chemotherapeutic alkylating agent, on human and mouse cells: effects of Mgmt and Mlh1 mutations. *DNA repair*, 3(4), pp.413–420.
- Sargent, D.J. et al., 2010. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28(20), pp.3219–3226.
- Sargent, D.J. et al., 2014. Prognostic impact of deficient mismatch repair (dMMR) in 7,803 stage II/III colon cancer (CC) patients (pts): A pooled individual pt data analysis of 17 adjuvant trials in the ACCENT database. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 32(15_suppl), pp.3507–3507.
- Schlagman, S.L., Hattman, S. & Marinus, M.G., 1986. Direct role of the Escherichia coli Dam DNA methyltransferase in methylation-directed mismatch repair. *Journal of bacteriology*, 165(3), pp.896–900.
- Schwitalle, Y. et al., 2008. Immune response against frameshift-induced neopeptides in HNPCC patients and healthy HNPCC mutation carriers. *Gastroenterology*, 134(4), pp.988–997.
- Scott, R.H., Homfray, T., et al., 2007. Familial T-cell non-Hodgkin lymphoma caused by biallelic MSH2 mutations. *Journal of Medical Genetics*, 44(7), pp.e83–e83.

- Scott, R.H., Mansour, S., et al., 2007. Medulloblastoma, acute myelocytic leukemia and colonic carcinomas in a child with biallelic MSH6 mutations. *Nature clinical practice. Oncology*, 4(2), pp.130–134.
- Sekiguchi M et al.,1999. Alkylation Carcinogenesis in Mice with Altered Levels of DNA Repair Methyltransferase. *Prog Exp Tumor Res* 35: 25–36.
- Senter, L. et al., 2008. The Clinical Phenotype of Lynch Syndrome Due to Germ-Line PMS2 Mutations. *Gastroenterology*, 135(2), pp.419–428.e1.
- Shacham-Shmueli, E. et al., 2011. Response to temozolomide in patients with metastatic colorectal cancer with loss of MGMT expression: a new approach in the era of personalized medicine? *Journal of Clinical Oncology*, 29(10), pp.e262–5.
- Shawki, S. & Kalady, M.F., 2016. Recent advances in understanding Lynch syndrome. *F1000Research*, 5, p.2889.
- Shen, L. et al., 2005. MGMT Promoter Methylation and Field Defect in Sporadic Colorectal Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(18), pp.1330–1338.
- Sheng, Z., Kang, M. & Wang, H., 2018. The potential role of MGMTTrs12917 polymorphism in cancer risk: an updated pooling analysis with 21010 cases and 34018 controls. *Bioscience Reports*, 38(5), pp.BSR20180942–12.
- Shia, J., 2008. Immunohistochemistry versus Microsatellite Instability Testing For Screening Colorectal Cancer Patients at Risk For Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 10(4), pp.293–300.
- Shia, J. et al., 2009. Immunohistochemistry as first-line screening for detecting colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: a 2-antibody panel may be as predictive as a 4-antibody panel. *The American journal of surgical pathology*, 33(11), pp.1639–1645.
- Shinsato, Y. et al., 2013. Reduction of MLH1 and PMS2 confers temozolomide resistance and is associated with recurrence of glioblastoma. *Oncotarget*, 4(12), pp.2261–2270.
- Shirts, B.H. et al., 2018. Using Somatic Mutations from Tumors to Classify Variants in Mismatch Repair Genes. *American journal of human genetics*, 103(1), pp.19–29.
- Silber, J.R. et al., 1996. Lack of the DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase in histologically normal brain adjacent to primary human brain tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(14), pp.6941–6946.
- Slaby, O. et al., 2009. Significant overexpression of Hsp110 gene during colorectal cancer progression. *Oncology reports*, 21(5), pp.1235–1241.
- Smyrk, T.C. et al., 2001. Tumor-infiltrating lymphocytes are a marker for microsatellite instability in colorectal carcinoma. *Cancer*, 91(12), pp.2417–2422.

- Solassol, J. et al., 2019. Alu element insertion in the MLH1 exon 6 coding sequence as a mutation predisposing to Lynch syndrome. *Human Mutation*.
- Sourrouille, I. et al., 2012. Somatic mosaicism and double somatic hits can lead to MSI colorectal tumors. *Familial Cancer*.
- Spratt, T.E. & Levy, D.E., 1997. Structure of the hydrogen bonding complex of O6-methylguanine with cytosine and thymine during DNA replication. *Nucleic acids research*, 25(16), pp.3354–3361.
- Staffa, L. et al., 2015. Mismatch Repair-Deficient Crypt Foci in Lynch Syndrome – Molecular Alterations and Association with Clinical Parameters J. S. Castresana, ed. *PLoS ONE*, 10(3), p.e0121980.
- Svrcek, M. et al., 2016. Azathioprine May Not be Associated With Development of Colorectal Tumors With Microsatellite Instability in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *The American Journal of Gastroenterology*, 111(1), pp.149–151.
- Svrcek, M. et al., 2010. Methylation tolerance due to an O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) field defect in the colonic mucosa: an initiating step in the development of mismatch repair-deficient colorectal cancers. *Gut*, 59(11), pp.1516–1526.
- Svrcek, M. et al., 2007. Specific clinical and biological features characterize inflammatory bowel disease associated colorectal cancers showing microsatellite instability. *Journal of Clinical Oncology*, 25(27), pp.4231–4238.
- Swann, P.F. et al., 1996. Role of postreplicative DNA mismatch repair in the cytotoxic action of thioguanine. *Science (New York, N.Y.)*, 273(5278), pp.1109–1111.
- Takagi, Y. et al., 2003. Roles of MGMT and MLH1 proteins in alkylation-induced apoptosis and mutagenesis. *DNA repair*, 2(10), pp.1135–1146.
- Takayama, T. et al., 1998. Aberrant Crypt Foci of the Colon as Precursors of Adenoma and Cancer..” *The New England Journal of Medicine* 339 (18): 1277–84.
- Tanakaya, K., 2018. Current clinical topics of Lynch syndrome. *International journal of clinical oncology / Japan Society of Clinical Oncology*, 12, pp.546–7.
- Tempero, M.A. et al., 1984. Serum and hair selenium levels in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Biological trace element research*, 6(1), pp.51–55.
- Thibodeau, S.N., Bren, G. & Schaid, D., 1993. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science (New York, N.Y.)*, 260(5109), pp.816–819.
- Topalian, S.L. et al., 2012. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *The New England journal of medicine*, 366(26), pp.2443–2454.
- Torre, D., 1968. Multiple sebaceous tumors. *Archives of dermatology*, 98(5), pp.549–551.

- Truninger, K. et al., 2005. Immunohistochemical analysis reveals high frequency of PMS2 defects in colorectal cancer. *Gastroenterology*, 128(5), pp.1160–1171.
- Tsuzuki, T. et al., 1996. Targeted disruption of the DNA repair methyltransferase gene renders mice hypersensitive to alkylating agent. *Carcinogenesis*, 17(6), pp.1215–1220.
- Turcot, J., Despres, J.P. & St Pierre, F., 1959. Malignant tumors of the central nervous system associated with familial polyposis of the colon: report of two cases. *Diseases of the Colon & Rectum*, 2, pp.465–468.
- Ueda, S. et al., 2004. Induction of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by dexamethasone in glioblastomas. *Journal of neurosurgery*, 101(4), pp.659–663.
- Umar, A. et al., 2004. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. In *Journal of the National Cancer Institute*. pp. 261–268.
- van Engeland, M. et al., 2003. Effects of dietary folate and alcohol intake on promoter methylation in sporadic colorectal cancer: the Netherlands cohort study on diet and cancer. *Cancer Research*, 63(12), pp.3133–3137.
- Vasen, H.F. et al., 1999. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. In *Gastroenterology*. pp. 1453–1456.
- Vasen, H.F. et al., 1991. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). In *Diseases of the colon and rectum*. pp. 424–425.
- Vasen, H.F.A. et al., 2007. Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer). *Journal of Medical Genetics*, 44(6), pp.353–362.
- Veigl, M.L. et al., 1998. Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(15), pp.8698–8702.
- Viswanathan, M. et al., 2001. Redundant exonuclease involvement in Escherichia coli methyl-directed mismatch repair. *The Journal of biological chemistry*, 276(33), pp.31053–31058.
- Wagner, R. & Meselson, M., 1976. Repair tracts in mismatched DNA heteroduplexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(11), pp.4135–4139.
- Wali, R.K. et al., 1999. Inhibition of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase increases azoxymethane-induced colonic tumors in rats. *Carcinogenesis*, 20(12), pp.2355–2360.
- Wang, H.-W. et al., 2017. Correlations of MGMT genetic polymorphisms with temozolomide resistance and prognosis of patients with malignant gliomas: a population-based study in China. *Cancer gene therapy*, 24(5), pp.215–220.

- Warthin, A.S., 1913. Heredity with Reference to Carcinoma As Shown By the Study of the Cases Examined in the Pathological Laboratory Of the University of Michigan, 1895-1913. *Arch Intern Med*, 12, pp.546–555.
- Waters, T.R. & Swann, P.F., 1997. Cytotoxic mechanism of 6-thioguanine: hMutS α , the human mismatch binding heterodimer, binds to DNA containing S6-methylthioguanine. *Biochemistry*, 36(9), pp.2501–2506.
- Wildenberg, J. & Meselson, M., 1975. Mismatch repair in heteroduplex DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(6), pp.2202–2206.
- Wimmer, K. & Etzler, J., 2008. Constitutional mismatch repair-deficiency syndrome: have we so far seen only the tip of an iceberg? *Human Genetics*, 124(2), pp.105–122.
- Wimmer, K. et al., 2014. Diagnostic criteria for constitutional mismatch repair deficiency syndrome: suggestions of the European consortium “care for CMMRD” (C4CMMRD). *Journal of Medical Genetics*, 51(6), pp.355–365.
- Win, A.K. et al., 2012. Risks of primary extracolonic cancers following colorectal cancer in lynch syndrome. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 104(18), pp.1363–1372.
- Win, A.K. et al., 2015. Role of tumour molecular and pathology features to estimate colorectal cancer risk for first-degree relatives. *Gut*, 64(1), pp.101–110.
- Winand, N.J., Panzer, J.A. & Kolodner, R.D., 1998. Cloning and characterization of the human and *Caenorhabditis elegans* homologs of the *Saccharomyces cerevisiae* MSH5 gene. *Genomics*, 53(1), pp.69–80.
- Woerner, S.M. et al., 2006. Microsatellite instability in the development of DNA mismatch repair deficient tumors. *Cancer biomarkers*, 2(1-2), pp.69–86.
- Wolf, B. et al., 2006. Efficiency of the revised Bethesda guidelines (2003) for the detection of mutations in mismatch repair genes in Austrian HNPCC patients. *International Journal of Cancer*, 118(6), pp.1465–1470.
- Wolffe, A.P. & Matzke, M.A., 1999. Epigenetics: regulation through repression. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5439), pp.481–486.
- Xiao, H. et al., 2013. Poorly differentiated colorectal cancers: correlation of microsatellite instability with clinicopathologic features and survival. *American journal of clinical pathology*, 140(3), pp.341–347.
- Yamamoto, H. & Imai, K., 2015. Microsatellite instability: an update. *Archives of Toxicology*, pp.1–23.
- Yamashita, S. et al., 2018. MGMT promoter methylation in patients with glioblastoma: is methylation-sensitive high-resolution melting superior to methylation-sensitive polymerase chain reaction assay? *Journal of neurosurgery*, 269, pp.1–9.

- Yip, S. et al., 2009. MSH6 mutations arise in glioblastomas during temozolomide therapy and mediate temozolomide resistance. *Clinical Cancer Research*, 15(14), pp.4622–4629.
- Zaidi, N.H. et al., 1995. Transgenic expression of human MGMT protects against azoxymethane-induced aberrant crypt foci and G to A mutations in the K-ras oncogene of mouse colon. *Carcinogenesis*, 16(3), pp.451–456.
- Zhang, L., 2008. Immunohistochemistry versus Microsatellite Instability Testing for Screening Colorectal Cancer Patients at Risk for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 10(4), pp.301–307.