

FICHE TECHNIQUE

Instabilité des microsatellites et cancers colorectaux

Microsatellite instability in colorectal cancer

Bruno Buecher¹, Antoine de Pauw¹, Paul Freneaux², Étienne Rouleau³

1. Service de Génétique

2. Service d'Anatomie Pathologique

Institut Curie, 26, rue d'Ulm, F-75248 Paris Cedex 05

3. Institut Curie-Hôpital René Huguenin, 35, rue Dailly, F-92210 Saint-Cloud

bruno.buecher@curie.net

■ L'instabilité des microsatellites : de quoi s'agit-il ?

La genèse de certains cancers colorectaux est liée à une instabilité génétique induite par la défaillance du système de réparation des mésappariements de l'ADN appelé système MMR (*MisMatch Repair*). Ce système est composé de 4 gènes appelés *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* et *PMS2*. Les protéines codées par ces gènes interagissent pour identifier puis corriger les mésappariements de l'ADN qui résultent d'erreurs commises par l'ADN polymérase lors de la réplication de l'ADN. Ces erreurs se produisent préférentiellement au niveau des séquences d'ADN ayant une structure répétitive. La perte de fonction d'une seule des 4 protéines impliquées dans ce système est responsable de son inactivation, d'une perte de la fidélité de la réplication et d'une accumulation de mutations. Les microsatellites correspondent à des séquences d'ADN réparties sur l'ensemble du génome (séquences codantes ou non codantes) dont la structure est répétitive : répétition, un nombre variable de fois, d'un seul nucléotide ou d'un motif di- tri- ou tétra-nucléotidique. On parle de microsatellites mono-, di, tri et tétra-nucléotidiques respectivement. Du fait de cette structure répétitive, ils sont particulièrement sujets aux erreurs de réplication en cas de défaillance du système MMR. L'amplification d'un certain nombre de microsatellites à la recherche d'une « instabilité » (qui témoigne d'une erreur de réplication de l'ADN au niveau tumoral) est donc une technique sensible pour mettre en évidence cette défaillance. Les cancers présentant un tel phénotype sont dits de type MSI (*MicroSatellite Instability*) ou plus rarement dMMR (*deficient MMR*) par opposition aux cancers de type MSS (*MicroSatellite Stability*), également appelés pMMR (*proficient MMR*).

■ Les deux types de cancers de phénotype MSI. Les mécanismes en cause

La défaillance du système MMR (responsable d'un phénotype MSI) est impliquée dans la genèse :

1. de **15 à 20 % de l'ensemble des cancers colorectaux sporadiques**. Le mécanisme en cause est une hyperméthylation du promoteur du gène *MLH1*, modification épigénétique associée à la sénescence de l'épithélium colique, responsable d'un défaut d'expression de ce gène.
2. la **quasi-totalité des cancers colorectaux** (et des cancers d'autres localisations) **survenant dans le contexte du syndrome de Lynch**. Le mécanisme en cause est alors une mutation constitutionnelle, très généralement héritée d'un parent, de l'un des 4 gènes : *MLH1* ou *MSH2* le plus souvent ; *MSH6* plus rarement ; *PMS2* exceptionnellement.

D'un point de vue clinique, il est acquis que les cancers colorectaux de phénotype MSI (qu'ils soient de types sporadiques ou héréditaires) ont un **meilleur pronostic** (à stade égal) et une **moindre sensibilité à la chimiothérapie par 5-fluorouracile (5-FU)** que les cancers de phénotype MSS.

■ Indications actuelles de la recherche d'une instabilité des microsatellites au niveau des cancers colorectaux

À l'heure actuelle, la recherche d'une instabilité des microsatellites est indiquée dans 2 circonstances.

1. Cancers coliques opérés « à visée curative »

En l'absence de facteur pronostique péjoratif (stade T4, tumeur peu différenciée, invasion veineuse, lymphatique ou périnerveuse, nombre de ganglions examinés < 12), il n'y a pas d'indication de chimiothérapie adjuvante après exérèse d'un cancer colique de stade II. En présence d'un ou de plusieurs facteurs péjoratifs, l'indication d'une chimiothérapie peut être discutée, le choix se portant préférentiellement, le cas échéant, sur un schéma peu toxique de type LV5FU2 ou fluoropyrimidine orale. Il est cependant acquis que les cancers coliques de phénotype MSI et de stade II ont un pronostic spontané particulièrement favorable et qu'ils ne tirent pas profit d'une chimiothérapie adjuvante par 5-FU, chimiothérapie qui pourrait même avoir un effet délétère.

Ainsi, **la détermination du statut des microsatellites est-elle indiquée pour les cancers coliques de stade II.** La recommandation actuelle du Thésaurus National de Cancérologie Digestive est de ne pas administrer de chimiothérapie adjuvante dans une telle situation en cas d'instabilité des microsatellites (<http://www.tncd.org>). Certains auteurs considèrent cependant que l'indication d'une telle chimiothérapie mérite d'être discutée en cas de combinaison de facteurs pronostiques péjoratifs (par exemple, cancer du côlon de stade T4 perforé et/ou avec moins de 12 ganglions examinés) en associant l'oxaliplatine au 5-fluorouracile (protocole FOLFOX4).

Il faut noter que l'administration d'une chimiothérapie adjuvante par FOLFOX4 est recommandée après exérèse d'un cancer colique de stade III indépendamment du statut des microsatellites (phénotype moléculaire MSS ou MSI) de telle sorte qu'il n'y a généralement pas d'indication à sa caractérisation dans ce contexte, pas plus qu'en situation métastatique.

2. Cancers colorectaux suspects de survenir dans le contexte d'un syndrome de Lynch

Le diagnostic du syndrome de Lynch est parfois méconnu. Il doit être évoqué devant tout **cancer colorectal** (ou cancer du spectre : *endomètre, ovaire, intestin grêle, estomac, voies biliaires, voies excrétrices urinaires*) **diagnostiqué à un âge inférieur à 60 ans ou quel que soit l'âge au diagnostic, chez un individu ayant un antécédent personnel ou familial au premier degré de cancer colorectal ou du spectre de syndrome de Lynch.** Ces situations correspondent à une indication d'étude des microsatellites. Cette étude est réalisée préférentiellement à partir d'un cancer colorectal mais elle peut également être réalisée à partir de n'importe quelle tumeur du spectre. La mise en évidence d'un phénotype MSI renforce la présomption clinique de syndrome de Lynch et constitue une indication de consultation de génétique oncologique en vue de la recherche d'une mutation constitutionnelle des gènes du système MMR. L'étude de l'expression des protéines MMR en immunohistochimie est intéressante à ce stade puisqu'elle permet d'orienter l'étude constitutionnelle vers le gène en cause (la protéine codée par le gène défectueux n'est généralement plus exprimée au niveau tumoral). L'absence d'instabilité des microsatellites permet au contraire d'exclure le diagnostic.

■ Modalités de recherche d'une instabilité des microsatellites

Matériel requis et étape pré-analytique

La recherche d'une instabilité des microsatellites est réalisée par les plateformes de génétique moléculaire des tumeurs. Elle peut être mise en œuvre à partir de tissu tumoral congelé ou fixé et inclus en paraffine (à condition, dans ce cas, que le fixateur utilisé ne corresponde pas à du liquide de Bouin).

Il est impératif que le matériel utilisé pour l'analyse moléculaire soit réexaminé par l'anatomopathologiste afin de s'assurer qu'il s'agit bien de matériel tumoral mais aussi évaluer le pourcentage de cellules tumorales qui conditionne la sensibilité de l'analyse. Il est en effet souhaitable de sélectionner la zone ayant la plus forte cellularité tumorale. Une cellularité inférieure à 20 % est associée à risque de faux-négatif.

L'analyse est réalisée à partir de l'ADN extrait du tissu tumoral. Il est possible de réaliser l'analyse en parallèle à partir de l'ADN extrait de tissu sain (tissu adjacent à la tumeur) ou des lymphocytes du sang périphérique. Cette analyse comparative permet d'augmenter la sensibilité pour le dépistage de l'instabilité des microsatellites lorsque l'instabilité d'un marqueur ne se manifeste que par un décalage de quelques nucléotides. Ceci est particulièrement souhaitable en cas d'étude d'une tumeur non colorectale et notamment, en cas d'étude d'une tumeur endométriale (Fig. 1,2).

Technique d'analyse

La technique d'analyse du statut des microsatellites est maintenant parfaitement standardisée. Elle fait appel à l'utilisation de kits commercialisés et est basée sur l'amplification de 5 « marqueurs » microsatellites. Alors que les microsatellites étudiés il y a quelques années correspondaient à 2 marqueurs mono-nucléotidiques et à 3 marqueurs di-nucléotidiques (D2S123, D5S346, D17S250), l'étude porte actuellement sur **5 marqueurs mono-nucléotidiques** dont la spécificité est supérieure à celle des répétitions de di-nucléotides pour le diagnostic d'instabilité des microsatellites : BAT-25 localisé dans l'intron 16 du gène *c-kit* ; BAT-26 localisé dans l'intron 5 du gène *MSH2* ; NR-21 localisé dans la région 5' non traduite du gène *SLC7AB* ; NR-24 localisé dans la région 5' non traduite du gène *ZNF-2* et NR-27 (MONO-27) localisé dans la région 5' non traduite du gène *IAP-1*. Ces microsatellites sont dits quasi-monomorphes, c'est-à-dire qu'ils sont caractérisés par un nombre de répétitions, et donc une taille, très homogène dans une population donnée (entre les différents individus et pour les 2 allèles d'un même individu). Les polymorphismes ne sont cependant pas exclus, en particulier pour les marqueurs BAT-25 et NR-21. Ils se traduisent par la présence de 2 pics distincts après amplification. La mise en évidence d'un profil identique après amplification de l'ADN constitutionnel permet de retenir ce diagnostic et d'éliminer un phénomène d'instabilité au niveau

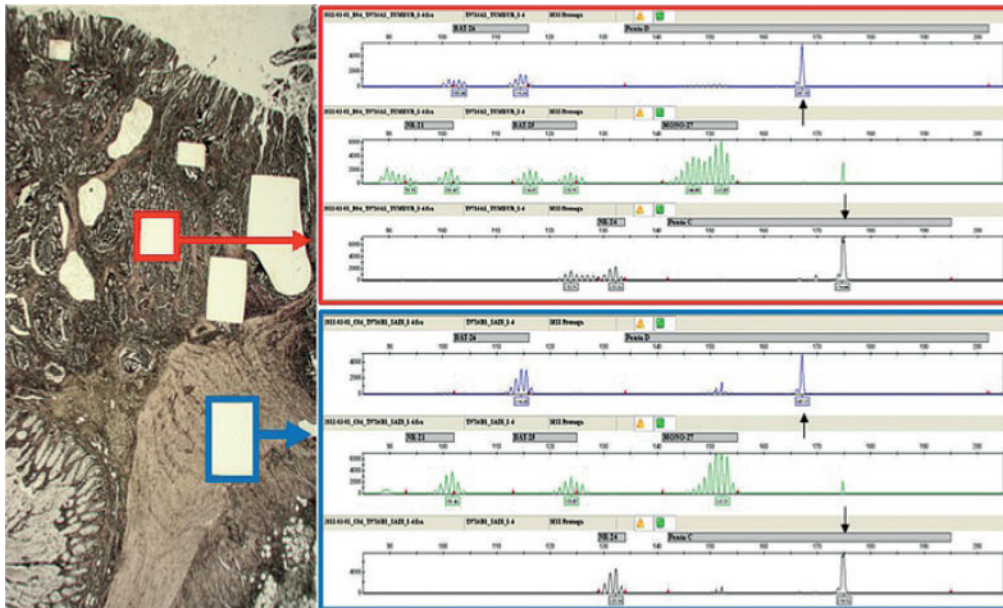


Figure 1
Recherche d'une instabilité des microsatellites au niveau d'un adénocarcinome colique. En rouge, microdissection du tissu tumoral ; en bleu, microdissection du tissu sain. Instabilité des 5 marqueurs microsatellites : BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24, NR-27 (MONO-27). Profil d'amplification identique pour les marqueurs penta-nucléotidiques d'identification (PentaD et PentaC)

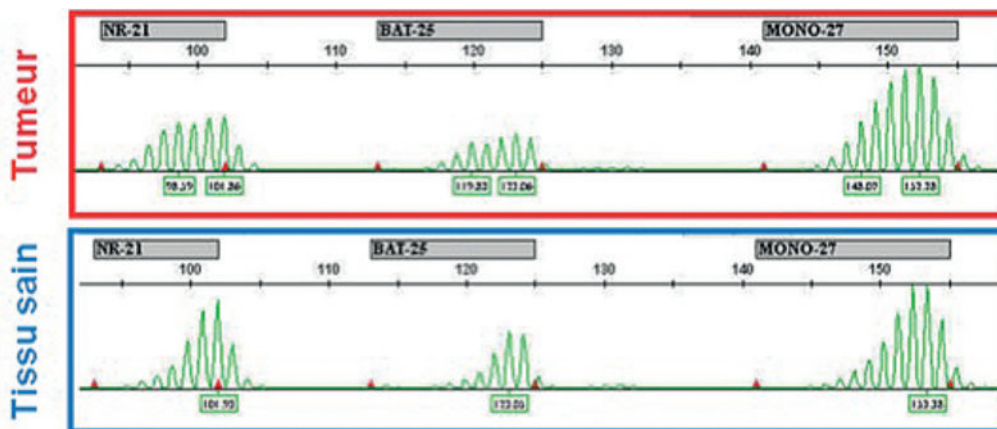


Figure 2
Recherche d'une instabilité des microsatellites au niveau d'un adénocarcinome de l'endomètre. Instabilité des marqueurs NR-21, BAT-25 et NR-27 (MONO-27) dans le tissu tumoral (encadré rouge) et comparaison avec le tissu sain (encadré bleu)

tumoral. Le kit utilisé en routine comporte également deux marqueurs polymorphes de type penta-nucléotides qui permettent de valider la concordance entre le tissu sain et le tissu tumoral étudié et de vérifier l'absence de contamination inter-échantillon car chaque individu a des marqueurs spécifiques.

La technique correspond à une amplification par PCR (*Polymerase Chain Recation*) des marqueurs étudiés. L'amplification des 5 marqueurs testés est généralement simultanée. On parle de PCR multiplex. L'étude des produits d'amplification est réalisée par migration en électrophorèse capillaire sur un séquenceur qui permet une discrimination au nucléotide près. En cas d'approche multiplex, chaque marqueur est marqué avec un fluorophore différent, ce qui permet de les distinguer. Il faut noter que la Taq polymérase n'est pas suffisamment fidèle pour synthétiser le nombre exact de répétitions de nucléotides de telle sorte que, en l'absence

de facteurs de réparation *in vitro*, les profils obtenus correspondent, pour chaque marqueur, à plusieurs pics autour d'un pic principal. C'est le pic principal, qui est caractérisé par la plus forte intensité, qui est utilisé pour évaluer la taille du marqueur. L'instabilité est définie, pour un marqueur donné, par la présence de deux pics principaux voire de deux groupes de pics bien séparés après amplification à partir de l'ADN extrait du tissu tumoral.

L'existence d'une instabilité des microsatellites (phénotype MSI ou dMMR) au niveau d'une tumeur est définie par l'existence d'un profil instable pour au moins 3 marqueurs (sur les 5 amplifiés) en l'absence d'analyse comparative possible avec du tissu sain et pour au moins 2 marqueurs en cas d'analyse comparative avec le profil d'amplification obtenu à partir de l'ADN extrait du tissu sain (qui permet d'exclure pour chaque marqueur un polymorphisme constitutionnel) (Fig. 1,2).

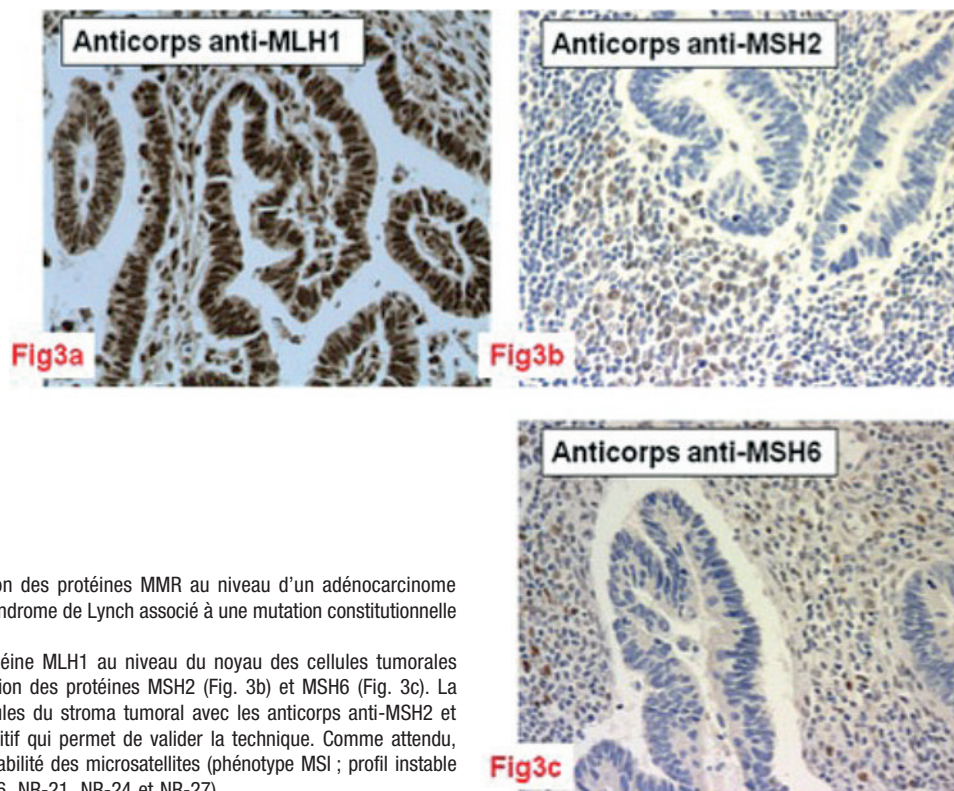


Figure 3

Étude immunohistochimique de l'expression des protéines MMR au niveau d'un adénocarcinome colique diagnostiqué dans un contexte de syndrome de Lynch associé à une mutation constitutionnelle du gène *MSH2*.

La conservation de l'expression de la protéine MLH1 au niveau du noyau des cellules tumorales (Fig. 3a) contraste avec la perte d'expression des protéines MSH2 (Fig. 3b) et MSH6 (Fig. 3c). La positivité du marquage au niveau des cellules du stroma tumoral avec les anticorps anti-MSH2 et anti-MSH6 constitue un témoin interne positif qui permet de valider la technique. Comme attendu, cette tumeur présentait également une instabilité des microsatellites (phénotype MSI ; profil instable pour les marqueurs testés : BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 et NR-27)

Conditions de prescription de la recherche d'une instabilité des microsatellites

La recherche d'une instabilité des microsatellites au niveau tumoral n'est pas conditionnée par l'obtention préalable d'un consentement spécifique. En effet, le tissu tumoral n'est pas considéré comme « spécifique » de l'individu et les marqueurs analysés sont indépendants des caractéristiques génétiques ayant des conséquences sur l'individu ou sur sa famille. La prescription peut donc être réalisée par les différents praticiens prenant en charge le malade, avant de décider de l'administration d'une chimiothérapie adjuvante (exérèse d'un cancer colique de stade II) ou de l'indication d'une consultation de génétique oncologique (suspicion clinique de syndrome de Lynch). On rappelle que cette analyse peut également être réalisée *a posteriori* à partir de matériel archivé (provenant éventuellement d'un individu décédé) dans le cadre de la démarche diagnostique du syndrome de Lynch dans une famille.

■ À part, étude immunohistochimique de l'expression des protéines MMR

Comme indiqué précédemment, l'étude immunohistochimique de l'expression des protéines MMR (MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2) peut être intéressante en complément de la recherche d'une instabilité des microsatellites, en particulier dans le cadre

de la stratégie diagnostique du syndrome de Lynch. En effet, dans la mesure où la protéine normalement codée par le gène muté n'est généralement pas exprimée, le résultat de l'étude immunohistochimique donne une indication sur le gène en cause et permet d'orienter l'étude moléculaire constitutionnelle. Ainsi, un défaut d'expression de la protéine MSH2 (éventuellement associée à un défaut d'expression de sa protéine partenaire MSH6) est quasi-pathognomonique d'un syndrome de Lynch impliquant le gène *MSH2* ; un défaut d'expression isolé de la protéine MSH6 est quasi-pathognomonique d'un syndrome de Lynch impliquant le gène *MSH6* ; un défaut d'expression isolé de la protéine PMS2 est quasi-pathognomonique des exceptionnels syndromes de Lynch impliquant le gène *PMS2*. La perte d'expression de la protéine MLH1 (éventuellement associée à un défaut d'expression de sa protéine partenaire PMS2) pose, en revanche, la question du diagnostic différentiel entre un syndrome de Lynch en rapport avec une mutation constitutionnelle du gène *MLH1* et une tumeur sporadique avec hyperméthylation acquise du promoteur de ce gène. La figure 3 représente le résultat de l'étude immunohistochimique de l'expression des protéines MMR au niveau d'un adénocarcinome Lieberkühnien du côlon sigmoïde survenant dans le contexte d'un syndrome de Lynch en rapport avec une mutation du gène *MSH2*. Elle objective une conservation de l'expression nucléaire de la protéine MLH1 au niveau tumoral contrastant avec la perte d'expression des protéines MSH2 et MSH6.