



Article Original

Place de l'Immunohistochimie dans le Diagnostic des Cancers Colorectaux Héréditaires à Brazzaville

Value of immunohistochemistry in the diagnosis of hereditary colorectal cancer at Brazzaville

Poaty H^{1,2}, Bolenga Liboko AF³, Ondima I⁴, Mongo A⁵, Aba Gandzion C², Pecko JF⁶, Gassaye D⁴

¹Institut National de Recherche en Sciences de la Santé, Brazzaville, Congo

²Faculté des Sciences de la Santé, Université Marien Ngouabi, Brazzaville, Congo.
henriettepoaty@gmail.com

³Service de Cancérologie, CHU de Brazzaville, Congo. alexisfortuneb@gmail.com

⁴Chirurgie Pédiatrique, CHU de Brazzaville, Congo.

⁵Service Gastro-Entérologie, CHU de Brazzaville, Congo
debygassaye@yahoo.fr
mongoarnaud@yahoo.fr

⁶Service d'Anatomie pathologique, CHU de Brazzaville, Congo. jfpecko@hotmail.fr

Correspondance: Henriette Poaty, IRSSA-Cité scientifique, Route de l'Auberge de Gascogne, Château d'eau, Brazzaville, Congo. Tél : (00242) 06 686 57 61

E-mail: henriettepoaty@gmail.com

Mots-clés : Cancers colorectaux héréditaires; syndrome de Lynch; Immunohistochimie.

RÉSUMÉ

Objectif. le but du présent travail est d'illustrer l'intérêt de l'immunohistochimie (IHC) dans la recherche étiologique des cancers colorectaux (CCR) héréditaires. **Patients et Méthodes.** Par la technique d'IHC, nous avons analysé 34 CCR familiaux suspectés syndrome de Lynch (SL) à partir des critères cliniques directifs de Bethesda et des pedigrees en faveur d'un mode de transmission autosomique dominant. Le diagnostic du cancer a reposé sur la clinique et l'examen anatomopathologique. Les anticorps anti-MMR : MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 et EpCam ont été utilisés pour la détection des protéines. **Résultat.** Au moyen de cette technique, nous avons trouvé cinq malades soit 5% des CCR porteurs d'une immunodéficience de l'un des gènes MMR impliquant MLH1 and MSH2 en faveur du SL. **Conclusion.** L'IHC associée aux arbres généalogiques et aux critères cliniques, est une bonne alternative au diagnostic de certitude du SL.

ABSTRACT

Objective. The aim of our work is to illustrate the value of immunohistochemistry (IHC) in the etiological investigation of hereditary colorectal cancer (CRC). **Patients and methods.** We used IHC methods to analyze 34 familial CRCs suspected of Lynch syndrome (LS), according to Bethesda criteria and pedigrees pointing to autosomal dominant transmission. The diagnosis of the cancer was based on clinical signs and pathological analysis. Anti-MMR antibodies (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) and Epcam were used for proteins detection. **Results.** Using this technique, we found five patients (5% of CRCs) carrying an immunodeficiency of one of the MMR genes involving MLH1 and MSH2 in favour of LS. **Conclusion.** IHC associated with pedigrees and clinical criteria is a good alternative for definite LS diagnosis.

INTRODUCTION

Les cancers colorectaux (CCR) sont des pathologies très en hausse avec un taux de mortalité très élevé. Ils constituent la deuxième cause de décès dans le monde. En Belgique par exemple, ils occupent le troisième rang des cancers chez l'homme avec une incidence de 5, 57% et le deuxième rang chez la femme avec une incidence de 4,11% (Registre des cancers de Belgique 2014). En France, d'après le rapport de INCa (Institut National du cancer) 2014, le CCR en 2012 occupait la troisième place des cancers avec une incidence de 11,6% chez l'homme et le deuxième rang chez la femme avec une incidence de 12,2% (WWW.e-cancer.fr). Au Congo Brazzaville, ils occupent le quatrième rang chez l'homme avec une incidence de 4,2 % et le septième rang chez la femme avec une incidence de 1,8 (Registre des cancers de Brazzaville 2013). Dans la majorité des cas,

les CCRs ont une origine sporadique, mais 15 à 30% d'entre eux relèvent d'une origine familiale [1]. Dans cette dernière catégorie, les CCRs surviennent auprès de sujets plus jeunes ayant des antécédents familiaux dans la mesure où plusieurs personnes sont affectées au sein de la même famille [2]. Il existe plusieurs syndromes héréditaires qui prédisposent fortement au CCR, les plus connus sont: le syndrome de Lynch (SL), la polypose adénomateuse familiale (PAF), le syndrome de polypose juvénile (JPS) autrefois appelée polypose juvénile familiale, le syndrome de Peutz-Jeghers (SPJ), le syndrome de Cowden ainsi que le syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba [3, 4, 5].

Le syndrome de Lynch (SL), autrement appelé cancer colorectal héréditaire sans polypose ou syndrome HNPCC (hereditary non polyposis colorectal cancer) est

une maladie héréditaire transmise sur le mode autosomique dominant [1, 4]. Il est due à une mutation germinale d'un gène suppresseur de tumeur du système de réparation de l'ADN Mismatch repair (MMR): MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 ou EpCAM [1, 2, 4]. Cette mutation entraîne la perte d'expression du gène muté et prédispose très fortement les personnes affectées au développement (dans 60 à 80% des cas) d'un CCR, avec un siège préférentiel dans le colon proximal (70 à 85% des cas) [1, 4]. Il est important de préciser que l'altération des gènes MMR engendre de multiples cancers extracoliques (par exemple dans l'endomètre, l'estomac, l'ovaire ou le pancréas) dans environ 25 à 30% des cas [1, 4].

Plusieurs techniques de génétique moléculaire dont L'immunohistochimie (IHC) permettent de détecter la mutation de ces gènes. L'IHC est une technique de cytogénétique moléculaire qui associe à la fois les principes d'immunologie, d'histochimie et de génétique. Cette méthode (dont le principe est schématisé dans la figure 1) permet en présence d'un traceur (la peroxydase) et l'usage d'un anticorps primaire de détecter quantitativement l'expression d'un gène (protéine) dans un tissu donné en microscopie optique.

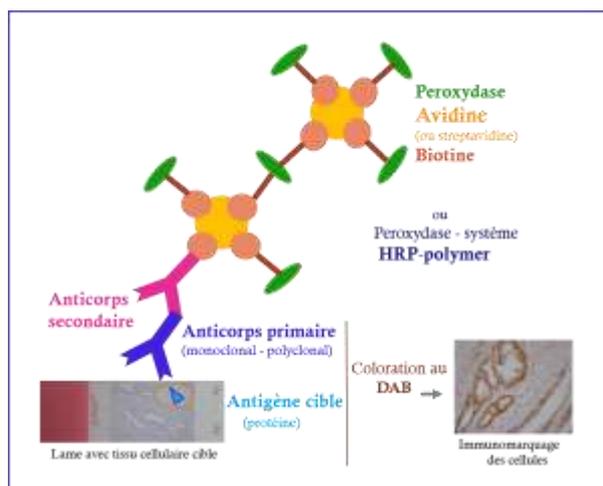


Figure 1. Schéma du principe de la technique d'immunohistochimie

Le but du présent travail est de montrer la place de l'IHC dans le diagnostic positif des cancers colorectaux héréditaires notamment le syndrome de Lynch.

PATIENTS ET MÉTHODES

Nous avons colligé 34 dossiers de CCR familiaux suspects de syndrome de Lynch. Ils ont été sélectionnés (au sein de 89 CCR tout venant) à partir d'au moins trois critères cliniques directifs de Bethesda (tableau I) et des

arbres généalogiques. Les anticorps monoclonaux de souris anti MMR utilisés pour l'identification du SL étaient: MLH1 (prédi-lu, Invitrogen), MSH2 (prédi-lu, Dako), MSH6 (1:100, Dako), PMS2 (1:100, Ventana) et EpCam (prédi-lu, Ventana).

Tableau I: Critères révisés de Bethesda [4, 7]

Critères	Critères directifs de Bethesda
1	Cancer colorectal diagnostiqué avant 50 ans.
2	Présence d'au moins 2 tumeurs du spectre large synchrones ou métachrones quel que soit l'âge.
3	Cancer colorectal d'histologie évocatrice d'un phénotype MSI diagnostiqué avant 60 ans.
4	Patient atteint de CCR ayant un apparenté au premier degré atteint d'une tumeur du spectre large, l'une des tumeurs ayant été diagnostiqué avant 50 ans.
5	Patient atteint de CCR ayant 2 apparentés ou plus au premier ou deuxième degré atteint d'une tumeur du spectre large, quel que soit l'âge.

Le caractère Mendélien de la maladie a été affirmé par l'élaboration des arbres généalogiques. L'examen anatomo-pathologique, plus précisément la technique d'hématoxyline-éosine a permis de confirmer l'existence du cancer. L'IHC réalisée sur les coupes en paraffine a permis de vérifier l'expression des gènes MMR.

La technique d'IHC a été réalisée à partir du Kit Novolink Polymer™ détection System (Novocastra. Référence RE77290-K, lot 406045017) qui utilise le système HRP-polymer.

Les lames cibles coupées à 3µm et gardées à -4°C, ont été utilisées dans un délai d'une semaine. La méthode a été pratiquée selon les étapes habituelles de: (i) déparaffinage des lames dans des bains de xylène; (ii) réhydratation des lames dans des bains d'éthanol absolu; (iii) démasquage des sites antigéniques dans du citrate 0,1M, pH 6 à 96°C; (iv) élimination des peroxydes endogènes par le peroxydase block puis application de la protéine block. (v) Les étapes successifs de dépôt d'anticorps primaires suivi du Post primary block et du Novolink Polymer ont permis une incubation de 30 mn chacune suivi d'un rinçage au PBS. (vi) Le complexe antigène-anticorps a été révélé par le diaminobenzidine (DAB) chromogène (Novocastra. réf RE7105, lot 710561) sous forme de coloration marron. Deux autres lames pour chaque AC ont servi de contrôle positif et négatif. Les témoins positifs (colon normal) avec un marquage normal de l'anticorps primaire et le témoin négatif (la lame cible) sans anticorps primaire avait permis de vérifier la spécificité du marquage de l'antigène cible par l'anticorps primaire. La contre coloration des lames avait été réalisé à l'aide de l'Hémalum de Mayer et de la prise des photos au microscope optique.

RÉSULTATS

L'IHC a permis chez les 34 patients suspects d'un SL, de montrer l'immunodéficiences des gènes MMR chez cinq personnes de sexe masculin (tableau II). Leur âge moyen était de 35 ans au moment du diagnostic. Ces résultats ont permis d'estimer la prévalence du LS à 5% de l'ensemble des CCRs diagnostiqués au CHU de Brazzaville. L'absence de marquage des cellules tumorales au DAB a été notée dans trois cas avec MLH1 et dans deux cas avec MSH2 (figure 2).

Tableau II: Données des patients ayant une immunodéficiences des gènes MMR

Cas	Age (ans)	Critères de Bethesda	Tumeurs	Histologie évocatrice	Mutation (par IHC)
1	20	2CCR, apparentés du 2 ^{ème} d ^o 53 ans	13H617	ADC M, ILP	MLH1
2	41	3CCR, apparentés 1 ^{er} d ^o 62 ans / 2 ^{ème} d ^o 48 ans + cancer endomètre	12H1277	ADC peu différencié	MSH2
3	47	3CCR, apparentés 1 ^{er} d ^o 58 ans / 2 ^{ème} d ^o 34 ans + cancer estomac	12H470	ADC différencié	MLH1
4	32	4CCR, apparentés du 1 ^{er} d ^o 58 ans / 2 ^{ème} d ^o 35 ans et 68 ans + cancer ovaire	11H1403	ADC M, ILP	MSH2
5	29	2CCR, 2 apparentés du 2 ^{ème} d ^o	10H178	ADC M, ILP	MLH1

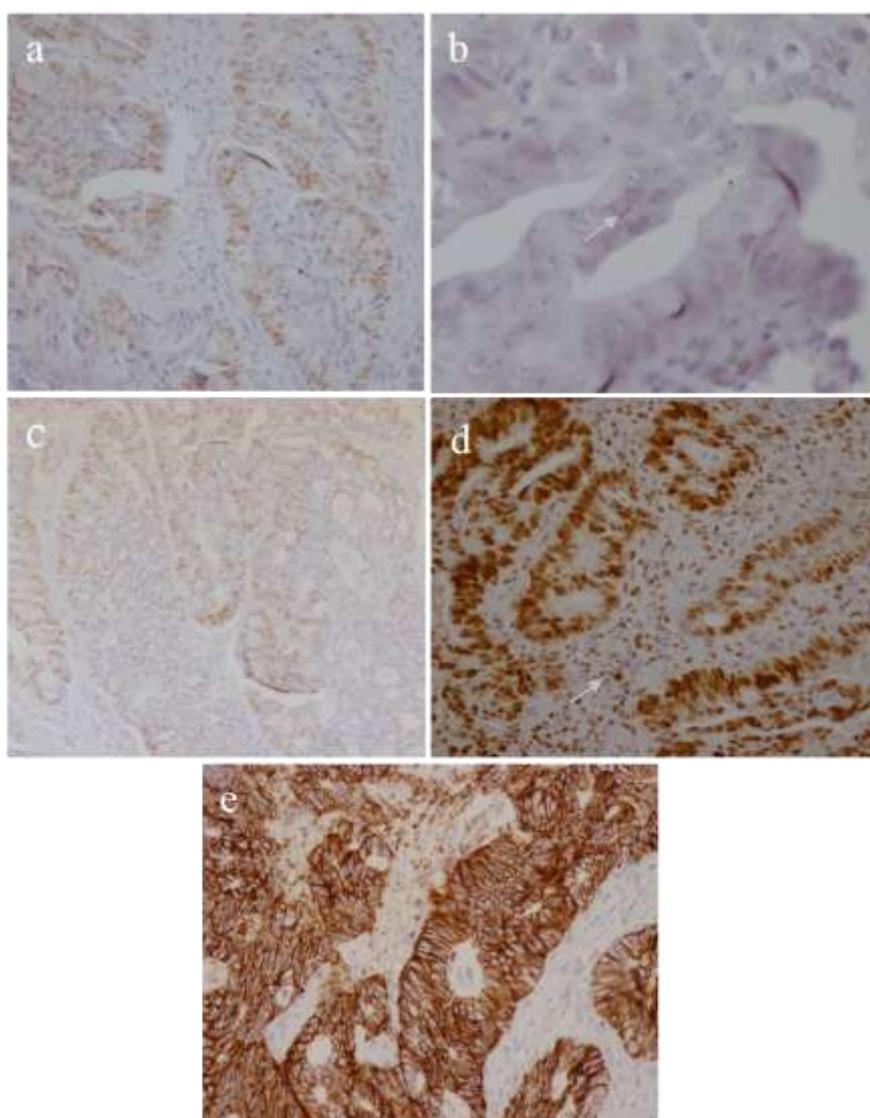


Figure 2 : IHC tumeur 11H1403 (patient 4). a) MLH1 (++) x 200: marquage nucléaire (en brun) des cellules tumorales. b) immunodéficiences de MSH2 (-) x 200: absence de marquage. c) MSH6 (+) x 200: très faible marquage nucléaire des cellules tumorales et des lymphocytes du stroma. d) PMS2 (+++) x 200: fort marquage nucléaire et cytoplasmique des cellules tumorales et des lymphocytes du stroma. e) EpCam (+++) : fort marquage cytoplasmique des cellules tumorales et des lymphocytes du stroma.

DISCUSSION

La fréquence de 5% obtenue sur le LS est proche de celle décrite dans la littérature. La fréquence du SL rapportée par les données de la littérature varie selon les pays de 2 à 10% et la tranche moyenne est de 2 à 5% [1, 6, 7]. Dans notre série, les gènes qui ont exprimé une immunodéficiences (donc une mutation) sont ceux qui sont les plus indexés dans la littérature. En effet, les mutations de MLH1 sont identifiées dans 50 % des SL et les désordres géniques de MSH2 s'observent dans 30 à 40 % des cas [7]. Par contre, les mutations de MSH6 concernent 7 à 10% des SL et ceux de PMS2 se voient dans moins de 5% des cas [6].

Habituellement, le diagnostic du cancer du côlon repose en premier lieu sur la clinique (symptomatologie), la coloscopie, le test hemocult, les radiographies (échographies, lavement baryté, scanner, IRM). L'examen anatomo-histologique dans le SL confirme le caractère malin souvent sans polypes et peut montrer des traits histologiques évocateurs: une infiltration lympho-plasmocytaire massive, le caractère mucineux ou peu différencié de la tumeur [1, 4].

Le caractère héréditaire du CCR et donc le SL, est suspecté devant une histoire familiale de CCR et de cancers extra-coliques récurrents, l'arbre généalogique avec une transmission sur le mode autosomique dominant [2] (Figure 3), les critères cliniques directifs de Bethesda/Amsterdam. Le gène muté hérité est indexé par plusieurs techniques dont l'IHC, la biologie moléculaire (PCR, le MPLA ou le southern blot) et le séquençage [4]. Les tests d'instabilité aux microsatellites participent aussi au diagnostic positif du LS.

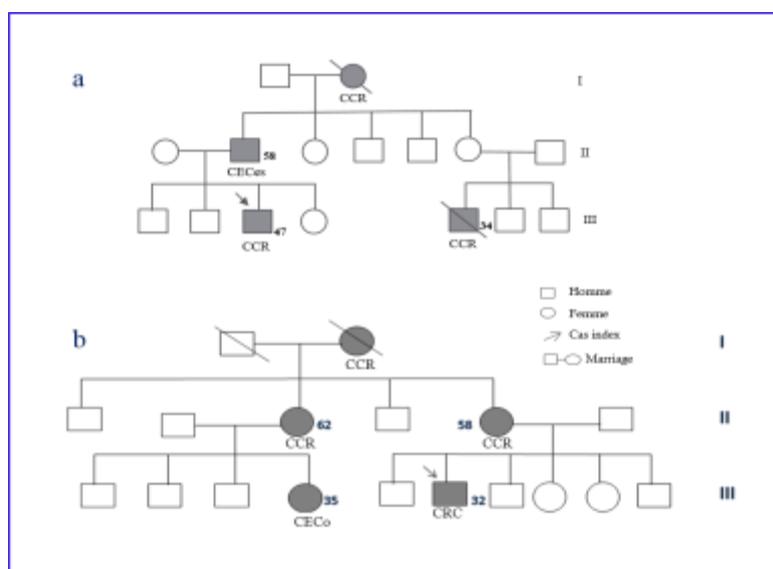


Figure 3: Les pedigrees. **a)** du patient 3 (47ans). Présence de cancer dans trois générations successives. Le cas index a un père de 58 ans porteur d'un cancer de l'estomac (es). Son cousin germain est décédé d'un CCR (à l'âge de 34 ans) ainsi que la grand-mère. **b)** Patient 4 (32 ans) On note des cancers dans trois générations successives. 4 CCR touchant la mère, 58 ans et deux apparentés au 2^{ème} degré: la tante 62 ans et la grand-mère. Un cousin de 35 ans souffre d'un CEC (cancer de l'ovaire).

Le séquençage du gène est un examen lourd. Il n'est réalisé qu'en dernière intention afin de confirmer le diagnostic mais surtout de rechercher le type de mutation survenue dans le gène déjà indexé par les autres méthodes qui sont plus accessibles. Ce type d'analyse n'est pas toujours accessible à nos patients faute de compétence, de matériel adéquat mais surtout de son prix. Il est demandé en collaboration dans des laboratoires étrangers.

C'est dire que dans la recherche du gène muté tant pour le LS que dans les autres types de cancers héréditaires, l'IHC est l'une des méthodes de choix pour les pays qui n'ont pas accès au séquençage. Elle a l'avantage d'être moins onéreuse que les autres techniques, rapide, reproductible et nécessitant peu de matériel. En outre la méthode est fiable car sa sensibilité selon diverses études varie de 79 à 95% [8]. Cette méthode déjà éprouvée trouve des applications dans presque tous les cancers comme par exemple le cancer du sein, de la peau, le choriocarcinome placentaire [9]. Elle est très démonstrative dans les autres formes de CCR héréditaires (tableau 3) dont la deuxième place est attribuée à la PAF, due le plus souvent à une mutation germinale du gène adenomatous polyposis coli (APC) [3, 10]. Ce désordre génique prédispose aussi aux cancers, surtout au CCR dans presque 100% des cas en absence de traitement chirurgical des polypes [3, 10, 11]. La PAF dont quelques cas sont diagnostiqués au CHU de Brazzaville à partir de la coloscopie et de l'examen anatomo-pathologique ne bénéficie pas toujours d'une enquête génétique. C'est pourquoi, l'une de nos perspectives est d'explorer à partir de cette méthode les autres types de CCR héréditaires dont les mutations géniques sont connues, en particulier la PAF.

Tableau III: Cancers colorectaux d'origine héréditaires. [1, 3, 4, 5, 11] (2013-GRCh38/hg38)

CCRs héréditaires	Locus	Genes	Incidence	MT	Phénotype
Syndrome de Lynch		MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, EpCAM	5-10%	AD	Sans polypes le plus souvent, CEC
Poypose adénomateuse familiale (PAF)	5q21-q22.2	APC (Adenomtous Polyposis Coli)	< 1%	AD	Polypes adénomateux >100, tumeurs desmoides, ostéomes, CEC
	1p34.1	MUTYH (MutY Homolog)		AR	PAF atténuée, polypes adénomateux <100, CEC
Syndrome de polypose juvénile (OMIM#174900)	18q21.2	SMAD4 (Mothers Against Decapentaplegic homolog 4)	1/100 000-1/160 000 n	AD	Apparition dans l'enfance, Polypes hamartomateux isolés ou multiples dans colon et rectum, prolapsus rectal, épistaxis
	10q23.2	BMPRI1 (Bone Morphogenetic Protein Receptor type 1A)			
Syndrome de Peutz- Jeghers (OMIM#175200)	19p13.3	STK11 (Serine/Thréonine Kinase)	1/200 000 n	AD	Polypes hamartomateux, hyperpigmentation muco-cutanée (face, orifices et extrémités), CEC
Syndrome de Cowden (OMIM#158350)	10q23.31	PTEN (Phosphatase and TENsin homolog)	1/200.000-1/250.000 n	AD	polypes hamartomateux, macrocéphalie, lésions cutanées
Syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba (OMIM#153480)	10q23.31	PTEN	NC	AD	Polypes hamartomateux macrocéphalie, lipomes, macrosomie, hémangiomes, lentiginose pénis ou vulve, thyroïdite d'Hashimoto

MT: mode de transmission ; CEC: cancer extra colique ; AD: autosomique dominant ; AR: autosomique récessif ; CEC: cancer extra-colique ; MMR: DNA mismatch repair gene ; NC: non connu ; n: naissances CCR: cancer colo rectal ; d°: degré ; ADC: adénocarcinome ; M: mucineux ; ILP: infiltrat lymphoplasmocytaire.

L'application de l'IHC à Brazzaville dans les cas du SL où la mutation a été indexée a permis après l'annonce de la maladie (au cas index et familles), l'entretien et l'information sur la pathologie, de calmer les esprits des familles sur l'existence d'éventuels sortilèges jetés dans toute une la famille afin de la voir disparaître. Elle a aussi permis de montrer que les cancers héréditaires sont une réalité dans notre pays.

Pour nous cliniciens, chercheurs et généticiens qui n'avons pas accès à toutes les nouvelles techniques de biologie moléculaire, cette démarche d'investigation s'impose par défaut comme une méthode de choix. Elle nous a ouvert les portes de consultations oncogénétiques dans les CCR héréditaires et la mise en place future de conseil génétique avec des tests génétiques appropriés, afin de cibler précocement les personnes à risque au sein de la famille du probant. Tout ceci, devrait permettre une prise en charge précoce des personnes porteuses de la mutation génique afin de diminuer le taux de mortalité.

CONCLUSION

La combinaison IHC, pedigree, critères cliniques est une bonne méthode pour le diagnostic positif des cancers héréditaires du colon. Ce type d'investigation s'inscrit aussi dans le cortège du plan de lutte contre le cancer à mener actuellement dans les pays en développement.

RÉFÉRENCES

- Plummer JM, Chin SN, Aronson M, et al. Lynch syndrome in a predominantly Afrocentric population: a clinicopathological and genetic study. *Can J Surg* 2012; 55: 294-300.
- Poaty H. Le cancer: une maladie génétique ? *Carcino Clin Afrique* 2016;15(2): 32-42
- Half E, Bercovich D, Rozen R. Familial adenomatous polyposis. *Orphanet Journal of rare disease* 2009; 4(22):1-23.
- Lynch HT, Lynch JF, Attard TA. Diagnosis and management of hereditary colorectal cancer syndromes: lynch syndrome as a model. *CMAJ* 2009; 181: 273-280
- Jelsig AM, Qvist N, Brusgaard K, et al. Hamartomatous polyposis syndromes: A review. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2014, 9:101
- Samar H, Nawab A, Parimal C. Molecular signaling mechanisms of apoptosis in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2012; 3: 71-79.
- Tutlewska K, Lubinski J, Kurzawski G. Germline deletions in the EpCam gene as a cause of Lynch syndrome-Literature review. *Hered Cancer Clin Pract* 2013; 11: 9.
- Jun-Yu Lu, Jian Quin S. Advances in the study of lynch syndrome in china. *World J gastroenterology* 2005; 21: 6861-6871.
- Poaty H, Coullin P, Leguern E, et al Etude cytogénomique de la môle hydatiforme et du Choriocarcinome gestationnel. *Bull du Cancer* 2012; 99(9): 827-843.
- Qi Liu, Xiaoxia Li, Sen Li, et al. Three novel mutations of APC gene in Chinese patients with familial adenomatous polyposis. *Tumor Biol* 2016; 37:11421-11427.
- Aihara H, Kumar N, Thompson CC. Diagnosis, surveillance, and treatment strategies for familial adenomatous polyposis: rationale and update. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2014; 26(3): 255-62.