

Analyse immunohistochimique des protéines de réparation de l'ADN dans les adénomes colorectaux

Immunohistochemical analysis of mismatch repair proteins in colorectal adenomas

Rammeh Soumaya, Sabbegh Znaidi Nadia, Arfaoui Amira, Ayouni Kaouther, Blel Ahlem, Farah Faten, Zidi Yosra, Najjar Taoufik, Kourda Nadia, Said Yosra, Zermani Rachida,

Service d'anatomie Pathologique - Hôpital Charles Nicolle Tunis

RÉSUMÉ

Prérequis : La déficience du système de réparation de mésappariement de L'ADN représente l'une des principales voies de cancérogénèse du cancer colorectal. Ce système est constitué principalement par 4 protéines: MLH1, MSH2, PMS2, MSH6. Le cancer colorectal se développe dans la majorité des cas sur des lésions précancéreuses : les adénomes. Peu d'études sont rapportées concernant les anomalies de ces protéines dans les adénomes.

But : Etudier par immunohistochimie l'expression des protéines MSH2, MLH1, PMS2 et MSH6 dans les adénomes colorectaux.

Méthodes : Cette étude a porté sur 102 adénomes provenant de 93 patients colligés dans notre institution pendant 6 années (2007-2012). La technique d'immunohistochimie a été réalisée par un automate au moyen des anticorps anti : MLH1, MSH2, PMS2 et MSH6. La perte de l'expression a été retenue en cas d'absence de marquage de la totalité des cellules adénomateuses en présence de témoin interne positif. L'expression a été considérée anormale en cas de marquage nucléaire faible et/ou hétérogène au niveau des cellules adénomateuses avec un marquage intense et diffus au niveau des cellules normales.

Résultats : Une perte d'expression de MSH2 et de MSH6 au niveau des cellules adénomateuses a été retrouvée dans 1 seul cas répondant à un adénome tubuleux de 3mm en dysplasie de haut grade. Un marquage anormal au niveau des cellules adénomateuses a été noté dans 23 cas (22,5%) pour MSH2 et dans 8 cas (7,8%) pour MSH6. Pour les 2 autres protéines aucun cas n'a montré de perte d'expression ni d'expression anormale. L'étude de l'anomalie d'expression de MSH2 et de MSH6 en fonction des données anatomo-cliniques : sexe, localisation, grade de dysplasie, et type histologique n'a pas montré de corrélation significative.

Conclusions : la perte d'expression des protéines de réparation de l'ADN est un évènement rare au niveau des adénomes. Toutefois les taux d'expression anormale sont dans notre étude élevés par rapport à ceux rapportés dans la littérature ; ceci pourrait traduire un taux d'instabilité microsatellitaire important chez nos patients. Des études multicentriques, à plus grande échelle associant des techniques de biologie moléculaire sont nécessaires.

Mots-clés

Cancer colorectal, Adénome, Immunohistochimie, Protéines de réparation des mésappariements

SUMMARY

Background: The deficiency of mismatch repair system is one of the main pathways in colorectal cancer. This system consists mainly of four proteins: MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2. Colorectal cancer develops in the majority of cases from precancerous lesions called adenomas. Only few studies have reported on the deficiencies of these proteins in adenomas.

Aim: In this study we used immunohistochemistry staining in colorectal adenomas to assay functional status of MLH1, MSH2, MSH6, and PMS2 proteins.

Methods: 102 adenomas from 93 patients were collected in our institution during six years (2007-2012). The immunohistochemical technique was performed with 4 antibodies: MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2. The loss of expression was retained if adenomatous cells were not stained with positive internal control. Staining was considered as abnormal if nucleus of adenomatous cells showed low nuclear staining and / or heterogeneous one, while positive internal control had normal staining.

Results: Loss of expression of MSH2 and MSH6 in adenomatous cells was found in only 1 case which was a tubular adenoma 3mm high-grade dysplasia. Abnormal staining of the adenomatous cells was noted in 23 cases (22.5%) for MSH2 and in 8 cases (7.8%) for MSH6. No cases showed loss of expression of MLH1 and PMS2. Abnormal expression of MSH2 and MSH6 was not correlated with sex of patients, the location of the adenoma, its grade of dysplasia and its histological type.

Conclusions: Loss of Mismatch repair proteins expression is a rare event in adenomas. However, the abnormal expression levels are higher in our study compared to those reported in the literature. This could reflect a higher rate of microsatellite instability in our patients. Multicenter and larger studies with molecular biology techniques are needed.

Key- words

Colorectal cancer, Adenoma, Immunohistochemistry, Mismatch Repair Proteins

Le cancer colorectal constitue un réel problème de santé publique en Tunisie comme dans le monde. Ce néoplasme est l'un des exemples les plus caractéristiques d'une carcinogenèse multi-séquentielle qui s'étale le plus souvent sur une dizaine d'années. Celle-ci débute par le développement d'une lésion précurseur appelée adénome [1]. Le cancer colorectal héréditaire non polyposique encore appelé syndrome de Lynch ou syndrome HNPCC (hereditary non polyposis colorectal cancer), est lié à une mutation germinale d'un des gènes de réparation des mésappariements de l'ADN [2-4]. Egalement environ 15% des cancers colorectaux sporadiques présentent un défaut du système de réparation de bases qui entraîne des non-réparations des erreurs de l'ADN polymérase se traduisant par un phénotype microsatellite instable (MSI). Cela est dû à une altération du système de réparation de mésappariement de l'ADN ou Mismatch Repair (MMR) [1]. Ce système MMR est constitué principalement par 4 protéines: MLH1, MSH2, PMS2, MSH6 [1, 3]. Celles-ci fonctionnent en tandem (MLH1-PMS2 et MSH2-MSH6) et, en cas de mutation inactivatrice de l'une d'elles, le binôme n'est plus efficace et « s'éteint » en immunohistochimie (IHC) [3].

L'instabilité microsatellitaire, a été largement étudiée dans le cancer colorectal ; les protéines les plus fréquemment atteintes sont MLH1 et MSH2, et plus rarement MSH6 et PMS2 [2, 5-6]. Cependant, ce phénotype a été peu étudié au niveau des adénomes [7-12]. Le but de notre travail était de rechercher ces anomalies génétiques dans les stades précoces de la carcinogenèse colorectale : les adénomes, en étudiant l'expression immunohistochimique des acteurs de la voie MSI.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Il s'agit d'une étude intéressant 102 adénomes provenant de 93 patients. Ces prélèvements ont été colligés dans notre institution sur une période de 6 ans (de 2007 à 2012). Les données clinico-pathologiques: sexe, localisation du polype, grade de dysplasie et type d'adénome ont été relevées des fiches anatomopathologiques. La technique d'IHC a été réalisée dans tous les cas par l'automate VENTANA BenchMark GX, selon la procédure indiquée par le fournisseur, au moyen des anticorps suivants : anti-MSH2 (lot:138611, LEICA NOVOCASTRA, dilution : 1/100), anti-MSH6 (lot:6007331, LEICA NOVOCASTRA, dilution : 1 /100), anti-MLH1 (lot 6002572: LEICA NOVOCASTRA, dilution : 1/50) et anti-PMS2 (lot 6006841: LEICA NOVOCASTRA, dilution : 1/50). Les lames ont été déparaffinées à une température de 87°C par un tampon EZ-PREP (Ventana Medical Systems). Un démasquage antigénique avec un tampon CC1 (Ventana Medical Systems) à 80°C a été effectué.

Pour les 4 protéines, la perte d'expression a été retenue en cas d'absence de marquage nucléaire de la totalité des cellules adénomateuses présentes sur la coupe histologique, en présence de témoin interne positif (lymphocytes, fibroblastes et cellules endothéliales). L'expression a été considérée anormale en cas de marquage nucléaire faible et/ou hétérogène au niveau des cellules adénomateuses avec un marquage intense et diffus au niveau des cellules normales (témoin interne positif).

L'expression des 4 protéines a été analysée en fonction des données anatomo-cliniques des adénomes : sexe, localisation, grade de dysplasie, et type histologique. Les données ont été analysées par le

logiciel SPSS 16. Le test Chi2 et le test exact de Fisher ont été utilisés pour l'analyse comparative. La corrélation était considérée significative si $p < 0,05$.

RÉSULTATS

Caractéristiques des échantillons

L'âge des patients était compris entre 26 et 87 ans avec une moyenne de 62 ans et une médiane de 63 ans. Le sex-ratio était de 2,9 : 69 hommes et 24 femmes. Les tailles moyenne et médiane des adénomes étaient de 7 mm. La localisation a été précisée pour 50 cas. Les adénomes étaient localisés dans 62% des cas ($n = 31$) dans le côlon gauche, dans 28% des cas ($n = 14$) dans le côlon droit et dans 10% des cas ($n = 5$) au niveau du rectum. Les adénomes étaient de type tubuleux dans 86 cas (84%), vilieux dans 3 cas (3%) et tubulo-vilieux dans 13 cas (13%). La dysplasie a été de bas grade dans 80 cas (78,4%) et de haut grade dans 22 cas (21,6%).

Analyse Immunohistochimique

Une absence totale de marquage au niveau des cellules adénomateuses a été retrouvée pour MSH2 et pour MSH6, dans 1 seul cas répondant à un adénome tubuleux de 3mm, en dysplasie de haut grade. Un marquage anormal faible et/ou hétérogène au niveau des cellules adénomateuses a été noté dans 23 cas (22,5%) correspondant à 13 adénomes tubuleux de bas grade, 4 adénomes tubuleux de haut grade, 2 adénomes tubuleux-vilieux de bas grade et 4 adénomes tubulo-vilieux de haut grade.

Pour MSH6 un marquage faible et/ou hétérogène (Figure 1) a été noté dans 8 cas (7,8%) répondant à 6 adénomes tubuleux de bas grade, un adénome tubulo-vilieux de bas grade et un adénome tubulo-vilieux de haut grade.

Figure 1: Marquage anormal: hétérogène focalement faible pour MSH2



Pour MLH1, l'absence totale d'expression de cette protéine au niveau des cellules adénomateuses n'a été retrouvée dans aucun cas. Pour cette protéine, l'interprétation de l'immunomarquage était délicate car dans la grande majorité des cas le marquage était faible et diffus aussi bien pour les cellules adénomateuses que les cellules normales : lymphocytes, fibroblastes et cellules endothéliales. Pour PMS2 tous les cas ont présenté un immunomarquage nucléaire normal diffus.

L'étude de l'expression de MSH2 et de MSH6 en fonction du sexe des patients, de la localisation de l'adénome, de son grade de dysplasie et de son type histologique n'a pas montré de corrélation statistiquement significative (Tableau 1).

DISCUSSION

Une absence totale d'expression des protéines de réparation a été observée dans un seul cas parmi les 102 adénomes étudiés et ce pour MSH2 et MSH6. Alors qu'une expression anormale (hétérogène et/ou faible) a été trouvée dans 22,5% des adénomes pour MSH2 et dans 7,8% pour MSH6. Cette anomalie d'expression n'était pas corrélée aux caractéristiques anatomo-cliniques des adénomes (sexe, localisation, grade de dysplasie, et type histologique). En comparant ces résultats à ceux de la littérature, la difficulté majeure que nous avons rencontrée est l'absence de consensus concernant l'interprétation de l'immunomarquage. Pour des auteurs un marquage est considéré anormal uniquement en cas d'absence totale de marquage nucléaire au niveau des cellules adénomateuses [8, 9] ; pour d'autres, le marquage est considéré anormal en cas de négativité et aussi en cas de marquage faible et/ou hétérogène [10, 11]. Nous avons adopté la deuxième méthode d'interprétation. Les taux trouvés de l'expression anormale de MSH2 et de MSH6 sont plus élevés que ceux rapportés par Molaei et al [10] qui ont décrit des taux respectivement de 4,5% et 3%. Ceci traduirait un taux d'instabilité microsatellitaire élevé chez nos patients. Mais nos résultats doivent être confirmés par des études multicentriques, à plus grande échelle associant des techniques de biologie moléculaire.

Par ailleurs, les caractéristiques de notre série étaient semblables à celles de la majorité des séries rapportées dans la littérature [9-12] où une prédominance de la localisation colique gauche, puis droite et rectale a été notée. Les adénomes de type tubuleux étaient les plus fréquents (84%). La majorité des adénomes (78,4%) étaient de bas grade. De plus, comme dans les études de Balbinotti et al [11] et de Molaei et al [10], il n'a pas été noté de corrélation significative entre l'expression des quatre protéines et le sexe, le grade de dysplasie et le type des adénomes. Concernant la localisation des polypes adénomateux, Molaei et al [10] ont trouvé que l'expression anormale des protéines MLH1, MSH2, MSH6, et PMS2 était plus fréquemment

observée dans les adénomes du côlon droit que ceux du côlon gauche et du rectum.

Dans ce travail, l'identification de l'instabilité était recherchée par l'étude de l'expression des gènes de réparation de mésappariement de l'ADN moyennant l'IHC. Cette technique a été adoptée du fait de son accessibilité et de son caractère peu coûteux. De plus elle permet d'évaluer le taux du produit fonctionnellement actif : la protéine, sa localisation intracellulaire, tout en étudiant l'aspect morphologique des cellules observées [13]. Toutefois cette technique présente des limites qui doivent être prises en considération pour son interprétation. Ces limites sont liées au fait que toutes les mutations ne modifient pas l'épitope reconnu par l'anticorps, et également à l'hétérogénéité des pratiques de fixation des tissus et des procédures techniques qui varient selon les laboratoires. En effet l'IHC n'est fiable que si au préalable toutes les étapes de la technique, depuis la fixation des tissus jusqu'à la révélation du complexe Antigène-Anticorps, ont été contrôlées [14]. Il est admis que la fixation par le formaldéhyde entraîne une perte variable et réversible de l'immunoréactivité par le masquage ou l'endommagement de certains sites de liaison des anticorps d'où la difficulté de l'obtention des résultats reproductibles dans toutes les conditions de fixation, notamment avec certains anticorps, comme ceux dirigés contre MLH1 ; en effet il a été démontré que l'IHC présente une faible sensibilité dans la détection des mutations de MLH1 [15]. De plus, cette technique présente des résultats quantitatifs indéterminés, et ne permet pas l'identification de la nature de la mutation.

CONCLUSION

La détection des anomalies de réparation de l'ADN dans les adénomes constitue un argument en faveur du syndrome HNPCC. Elle aurait donc un intérêt dans le diagnostic précoce de ce syndrome avant le stade de cancer. Les taux d'expression anormale retrouvés dans notre série sont élevés par rapport à ceux rapportés dans la littérature ; ceci traduirait un taux d'instabilité microsatellitaire important chez nos patients reflétant probablement un profil héréditaire élevé. Des études multicentriques, à plus grande échelle associant des techniques de biologie moléculaire sont nécessaires.

Tableau 1. Expression de MSH2 et MSH6 en fonction des caractéristiques anatomo-cliniques des adénomes.

NP : non précisé

Variable	Nombre	Expression de MSH2		Expression de MSH6		
		Normale	Anormale	Normale	Anormale	
Sexe	Homme	69	52	17	67	6
	Femme	24	18	6	22	2
	Valeur de p		1		1	
Localisation de l'adénome	colon droit	14	13	1	13	1
	colon gauche	31	21	10	30	1
	Rectum	5	4	1	5	0
	NP	52				
	Valeur de p		0,18		0,73	
Grade de dysplasie	Bas grade	80	66	14	73	7
	Haut grade	22	13	9	21	1
	Valeur de p		0,41		1	
Type des adénomes	Tubuleux	86	69	17	79	7
	Tubulo-villeux	13	7	6	12	1
	Villeux	3	3	0	3	0
	Valeur de p		0,06		0,87	

Références

1. Piard F, Martin L, Chapusot C et al. Les voies de la carcinogénèse colorectale : intérêt et application pour le pathologiste. *Ann Pathol* 2002;22 : 277-88.
2. Paraf F. Comment et quand rechercher une instabilité des microsatellites dans les cancers colorectaux en 2008? *Ann Pathol* 2007;27:433-8.
3. Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O et al. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol* 2002, 20:1043-8.
4. Iyer R, Pluciennik A, Burdett V, Modrich P. DNA mismatch repair: Functions and mechanisms. *Chem Rev* 2006;106:302-23.
5. Lynch HT, Lynch JF: Hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Seminars in Surgical Oncology* 18: 305-313, 2000.
6. Marcus V, Madlensky L, Gryfe R. Immunohistochemistry for hMLH1 and hMSH2: A practical test for DNA mismatch repair-deficient tumors. *Am J Surg Pathol* 1999;23:1248-55.
7. Chaves P, Cruz C, Lage P. Immunohistochemical detection of mismatch repair gene proteins as a useful tool for the identification of colorectal carcinoma with the mutator phenotype. *J Pathol* 2000;191:355-60.
8. Walsh MD, Buchanan DD, Pearson SA et al. Immunohistochemical testing of conventional adenomas for loss of expression of mismatch repair proteins in Lynch syndrome mutation carriers: a case series from the Australasian site of the colon cancer family registry. *Mod Pathol*. 2012;25:722-30.
9. Pino MS, Mino-Kenudson M, Wildmore BM et al. Deficient DNA mismatch repair is common in Lynch syndrome-associated colorectal adenomas. *J Mol Diagn*. 2009;11:238-47.
10. Molaei M, Yadollahzadeh M, Almasi S et al. Sporadic colorectal polyps and mismatch repair proteins. *Indian J Pathol Microbiol*. 2011;54:725-9.
11. Balbinotti RA, Ribeiro U JR, Sakai P, et al. hMLH1, hMSH2 and cyclooxygenase-2 (cox-2) in sporadic colorectal polyps. *Anticancer Res*. 2007;27:4465-71.
12. Petko Z, Ghiassi M, Shuber A et al. Aberrantly methylated CDKN2A, MGMT, and MLH1 in colon polyps and in fecal DNA from patients with colorectal polyps. *Clin Cancer Res* 2005;11:1203-9
13. Puisieux A. Analyse génotypique et immunohistochimique dans les cancers humains: confrontation ou complémentaire? *Ann Pathol*. 2002 ; 22 :93-5.
14. Grassi J, Verney C, Walker F, et al. Les contrôles nécessaires en immunohistochimie : de la recherche au diagnostic. *Ann Pathol* 2007;27 :16-26.
15. Taniere P, Joly MO. Pathologie moléculaire du cancer du côlon : vers la mise en place de stratégies diagnostiques intégrées. *Ann Pathol* 2002 ; 22 : 253-341.