UNIVERSITÉ TOULOUSE III – PAUL SABATIER FACULTÉS DE MÉDECINE

ANNÉE 2021

2021 TOU3 1557

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

MÉDECINE SPÉCIALISÉE CLINIQUE

Présentée et soutenue publiquement

par

Anna VIGIER

Le 20 Mai 2021

EVALUATION DES PERFORMANCES DU MARQUEUR HSP110 T17 ET DE LA TECHNIQUE NGS DANS LA DETECTION DE L'INSTABILITE MICROSATELLITAIRE

Directeur de thèse : Pr Janick SELVES

JURY

Monsieur le Professeur Pierre BROUSSET Madame le Professeur Rosine GUIMBAUD Madame le Professeur Janick SELVES Madame le Docteur Marie DANJOUX Madame le Docteur Solène EVRARD Monsieur Fréderic ESCUDIE



Président Assesseur Assesseur Assesseur Suppléant Membre invité



TABLEAU du PERSONNEL HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

des Facultés de Médecine de l'Université Toulouse III - Paul Sabatier

au 1er septembre 2020

Professeurs Honoraires

Doyen Honoraire Doyen Honoraire Doyen Honoraire Doyen Honoraire Doyen Honoraire Doyen Honoraire Professeur Honoraire associé Professeur Honoraire Professeur Honoraire

M. CHAP Hugues M. GUIRAUD-CHAUMEIL Bernard M. LAZORTHES Yves M. PUEL Pierre M, ROUGE Daniel M. VINEL Jean-Plem M. ABBAL Michel M. ADER Jean-Louis M. ADOUE Daniel M. ARBUS Louis M. ARLET Jacques M. ARLET Philippe M. ARLET-SUAU Elisabeth M ARNE lean Louis M. BARRET André M. BARTHE Philippe M. BAYARD Francis M. BOCCALON Henri M. BONAFÉ Jean-Louis M. BONEU Bernard M. BOUNHOURE Jean-Paul M. BOUTAULT Franck M. BUGAT Roland CAHUZAC Jean-Philippe M. CARATERO Claude M. CARLES Pierre CARRIERE Jean-Paul M. M. CARTON Michel M. CATHALA Bernard M. CHABANON Gérard CHAMONTIN Bernard M. M. CHAVOIN Jean-Pierre M. **CLANET Michel** M. CONTE Jean COSTAGLIOLA Michel COTONAT Jean M. M. M. DABERNAT Henr M. DAHAN Marcel M. DALOUS Antoine M. DALY-SCHVEITZER Nicolas M, DAVID Jean-Frédéric M, DELSOL Georges Mme DELISLE Marie-Bernadette Mme DIDIER Jacqueline M. DUCOS Jean M. DUFFAUT Michel M. DUPRE M. DURAND Dominique M. M. DUTAU Guy M. ESCANDE Michel M. ESCHAPASSE Henri M. ESCOURROU Jean M. ESOUERRE J.P. FABIÉ Michel M. FABRE Jean M FOURNIAL Gérard M FOURNIE Bernard FOURTANIER Gilles

Professeur Honoraire Professour Honoraire Professeur Honoraire

M, FRAYSSE Bernard M. FREXINOS Jacques Mine GENESTAL Michèle M GERAUD Gilles M. GHISOLFI Jacques M. GLOCK Yves M. GOUZI Jean-Louis M. HOFF Jean M. JOFFRE Francis M. LACOMME Yves M. LAGARRIGUE Jacques M. LANG Thierry Mme LARENG Marie-Blanche M. LAURENT Guy M. LAZORTHES Franck M. LEOPHONTE Paul MAGNAVAL Jean-François M MANELEE Claude M. MANSAT Michel M. MASSIP Patrice Mme MARTY Nicole M MAZIERES Bemard MONROZIES Xavier M. MOSCOVICI Jacques M. MURAT M. OLIVES Jean-Pierre M. PASCAL Jean-Pierre M. PESSEY Jean-Jacques PLANTE Pleme M PONTONNIER Georges M. POURRAT Jacques M. PRADERE Bernard M. PRIS Jacques Mme PUEL Jacqueline M. PUJOL Michel M. QUERLEU Denis M. RAILHAC Jean-Jacque M. REGIS Henri M. REGNIER Claude M. REME Jean-Michel M. ROCHE Henri M. ROCHICCIOLI Pierre M. ROLLAND Michel M. ROQUE-LATRILLE Christian M. RUMEAU Jean-Louis M. SALVADOR Michel M. SALVAYRE Robert M. SARRAMON Jean-Pierre M. SIMON Jacous M. SUC Jean-Michel M. THOUVENOT Jean-Paul TKACZUK Jean M. TREMOULET Michel VALDIGUIE Pierre M. VAYSSE Philippe VIRENQUE Christian M. VOIGT Jean-Jacques

Professeurs Émérites

Professeur ADER Jean-Louis Professeur ALBAREDE Jean-Louis Professeur ARBUS Louis Professeur ARBUS Louis Professeur ARLET-SUAU Elisabeth Professeur BOCCALON Henni Professeur CARATERO Claude Professeur CHAP Hugues Professeur CHAP Hugues Professeur CONTÉ Jean Professeur CONTÉ Jean Professeur CONTÉ Jean Professeur CASTAGLIOLA Michel Professeur DABERNAT Henri Professeur DELISLE Marie-Bernadette Professeur JOFRE Francis Professeur LAGARRIGUE Jacques Professeur LANCG Thierry Professeur LANCG Thierry Professeur LADENG Louis Professeur LAURENT Guy Professeur MAQNAVAL Jean-François Professeur MASIAVAL Jean-François Professeur MASIAVAL Jean-François Professeur MASIAVAL Jean-François Professeur MASIAVAL Jean-François Professeur MAZIERES Bernard Professeur MAZIERES Bernard Professeur RIVERE Daniel Professeur RIVERE Daniel Professeur ROQUES-LATRILLE Christian Professeur SALVAYRE Robert Professeur SARRAMON Jean-Pierre Professeur SIMON Jacques

FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-PURPAN

37 allées Jules Guesde - 31000 TOULOUSE P.U. - P.H.

Classe Exceptionnelle et 1^{ére} classe

M. ADOUE Daniel (C.E) M. AMAR Jacques (C.E.) M. ATTAL Michel (C.E) M. AVET-LOISEAU Hervé (C.E.) Mme BEYNE-RAUZY Odile M. BIRMES Philippe M. BLANCHER Antoing M. BONNEVIALLE Paul (C.E) M. BOSSAVY Jean-Pierre (C.E) M. BRASSAT David M BROUCHET Laurent M. BROUSSET Pierre (C.E) M. BUREAU Christophe M. CALVAS Patrick (C.E) M. CARRERE Nicolas M. CARRIE Didier (C.E) M. CHAIX Yves Mme CHARPENTIER Sandrine M. CHAUVEAU Dominique M. CHOLLET François (C.E) M. DAHAN Marcel (C.E) M DE BOISSEZON Xavier M. DEGUINE Olivier (C.E) M. DUCOMMUN Bernard M. FERRIERES Jean (C.E) M. FOURCADE Olivier M. FOURNIÉ Pierre M. GAME Xavier M GEERAERTS Thomas M. IZOPET Jacques (C.E) Mme LAMANT Laurence (C.E) M. LANG Thierry (C.E) M, LANGIN Dominique (C.E) M. LAUWERS Frédéric M. LAUQUE Dominique (C.E) M. LIBLAU Roland (C.E) M. MALAVAUD Bernard M. MANSAT Pierre M. MARCHOU Bruno (C.E) M. MAZIERES Julian M. MOLINIER Laurent M. MONTASTRUC Jean-Louis (C.E) Mme MOYAL Elisabeth Mme NOURHASHEMI Fatemeh (C.E) M. OSWALD Eric (C.E) M. PARANT Olivier M. PARIENTE Jérémie M. PARINAUD Jean (C.E) M. PAUL Carle M. PAYOUX Pierre M. PAYRASTRE Bernard (C.E) M. PERON Jean-Marie M. PERRET Bertrand (C.E) M. RASCOL Olivier (C.E) M. RECHER Christian (C.E) M. RISCHMANN Pascal (C.E) M. RONCALLI Jérôme M. SALES DE GAUZY Jérôme (C.E) M. SALLES Jean-Pierre (C.E) M. SANS Nicolas Mme SELVES Janick M. SERRE Guy (C.E) M. TELMON Norbert (C.E.) M. VINEL Jean-Pierre (C.E)

Médecine Interne, Gériatrie Thérapeutique Hématologie Hématologie, transfusion Médecine Interne Psychiatrie Immunologie (option Biologique) Chirurgie Orthopédique et Traumatologie. Chirurdie Vasculaire Neurologie Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire Anatomie pathologique Hépato-Gastro-Entéro Génélique Chinurgie Générale Cardiologie Pédiatrie Médecine d'urgence Néphrologie Neurologie Chirurgie Thoracique et Cardiaque Médecine Physique et Réadapt Fonct. Oto-rhino-laryngologie Cancérologie Epidémiologie, Santé Publique Anesthésiologie Ophtalmologie Urologie Anesthésiologie et réanimation Bactériologie-Virologie Anatomie Pathologique Biostatistiques et informatique Médicale Nutrition Chirurgie maxillo-faciale el stomatologie Médecine d'urgence Immunologie Urologie Chirurgie Orthopédique Maladies Infectieuses Pneumologie Epidémiologie, Santé Publique Pharmacologie Cancérologie Gériatrie Bactériologie-Virologie Gynécologie Obstétrique Neurologie Biol. Du Dévelop. et de la Reprod. Dermatologie Biophysique Hématologie Hépato-Gastro-Entérologie Biochimie Pharmacologie Hématologie Urologia Cardiologie Chirurgie Infantile Pédiatrie Radiologie Anatomie et cytologie pathologiques Biologie Cellulaire Médecine Légale

Hépato-Gastro-Entérologie

Mme BONGARD Vanina M. BONNEVIALLE Nicolas Mme CASPER Charlotte M COGNARD Christophe M. CAVAIGNAC Etienne M. LAIREZ Olivier M. LAROCHE Michel M. LEOBON Bertrand M. LOPEZ Raphael M. MARTIN-BLONDEL Guillaume M MARX Mathieu M. MAS Emmanuel M. OLIVOT Jean-Marc M PAGES Jean-Christophe Mme PASQUET Marléne M. PORTIER Guillaume Mme RUYSSEN-WITRAND Adeline Mme SAVAGNER Frédérique M. SIZUN Jacques M. SOL Jean-Christophe Mme TREMOLLIERES Florence Mme VAYSSE Charlotte Mme VEZZOSI Delphine

Doyen : Didier CARRIE

Chirurgie orthopédique et traumatologique

Chirurgie orthopédique et traumatologie

Maladies infectieuses, maladies tropicales

Biophysique et médecine nucléaire

Chirurgie Thoracique et Cardiaque

Biologie Cellulaire et Cytologie

Biochimie et biologie moléculaire

Biologie du développement

Epidémiologie

Neuroradiologie

Rhumatologie

Oto-rhino-laryngologie

Chirurgie Digestive

Rhumatologie

Neurochirurgie

Cancerologie

Endocrinologie

Anatomie

Pédiatrie

Neurologia

Pédiatrie

Pédiatrie

Pédiatria

P.U. - P.H.

2^{éme} classe

P.U. Médecíne générale M MESTHÉ Pierre

M. OUSTRIC Stephane (C.E)

Professeur Associé Médecine générale M. ABITTEBOUL Yves Mmé IRI-DELAHAYE Moloko M. POUTRAIN Jean-Christophe

Professeur Associé en Bactériologie - Virologie ; Hygiène Hospitalière Mme MALAVAUD Sandra

FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-RANGUEIL

133, route de Narbonne - 31062 TOULOUSE Cedex P.U. - P.H.

Classe Exceptionnelle et 1^{ère} classe

M. ARBUS Christophe M. ACAR Philippe M ACCADBI FO Franck M. ALRIC Laurent (C.E) Mme ANDRIEU Sandrine M. ARNAL Jean-François Mme BERRY Isabelle (C.E.) M. BONNEVILLE Fabrice M. BUJAN Louis (C. E) Mme BURA-RIVIERE Alessandra M BUSCAIL LOUIS (C.E.) M. CANTAGREL Alain (C.E) M. CARON Philippe (C.E) M. CHAUFOUR Xavier M. CHAYNES Patrick M. CHIRON Philippe (C.E) M. CONSTANTIN Amaud M. COURBON Frédéric Mme COURTADE SAIDI Monique M. DAMBRIN Camille M. DELABESSE Eric M. DELOBEL Pierre M. DELORD Jean-Pierre M. DIDIER Alain (C.E) Mme DULY-BOUHANICK Beatrice (C.E) M. ELBAZ Mever M. GALINIER Michel (C.E.) M. GLOCK Yves (C.E) Mme GOMEZ-BROUCHET Anne-Muriel M. GOURDY Pierre M. GRAND Alain (C.E) M. GROLLEAU RAOUX Jean-Louis (C E) Mme GUIMBAUD Rosine Mme HANAIRE Hélène (C.E) M. HUYGHE Eric M. KAMAR Nassim (C.E) M LARRUE Vincent M. LEVADE Thierry (C.E) M. MALECAZE François (C.E) M. MARQUE Philippe M. MAURY Jean-Philippe Mme MAZEREEUW Juliette M. MINVILLE Vincent M. OTAL Philippe M. RAYNAUD Jean-Philippe (C.E) M. RITZ Patrick (C.E) M. ROLLAND Yves (C.E) M ROUGE Daniel (C F) M. ROUSSEAU Hervé (C.E) M. ROUX Franck-Emmanuel M. SAILLER Laurent M SCHMITT Laurent (C E) M. SENARD Jean-Michel (C.E) M. SERRANO Elie (C.E) M. SOULAT Jean-Marc M. SOULIE Michel (C.E) M. SUC Bertrand Mme TAUBER Marie-Thérèse (C.E) Mme URO-COSTE Emmanuelle M. VAYSSIERE Christophe M. VELLAS Bruno (C.E)

Psychiatrie Pédiatrie Chirurgie Infantile Médecine Interne Epidémiologie Physiologie Biophysique Radiologie Urologie-Andrologie Médecine Vasculaire Hépato-Gastro-Entérologie Rhumatologie Endocrinologie Chirurgie Vasculaire Anatomie Chirurgie Orthopédique et Traumatologie Rhumatologie Biophysique Histologie Embryologie Chirurgie Thoracique el Cardiovasculaire Hématologie Maladies Infectieuses Cancérologie Pneumologie Thérapeutique Cardiologie Cardiologie Chirurgie Cardio-Vasculaire Anatomie Pathologique Endocrinologie Epidémiologie. Eco. de la Santé et Prév. Chirurgie plastique Cancérologie Endocrinologie Urologie Néphrologie Neurologia Biochimie Ophtalmologia Médecine Physique et Réadaptation Cardiologie Dermatologie Anesthésiologie Réanimation Radiologie Psychiatrie Infantile Nutrition Gériatrie Médecine Légale Radiologie Neurochirurgie Médecine Interne Psychiatrie Pharmacologie Oto-rhino-laryngologie Médecine du Travail Urologie Chirurgie Digestive Pédiatrie Anatomie Pathologique Gynecologie Obstétrique

Génatrie

M. ABBO Olivier M. AUSSEIL Jérôme M RERRY Antoine M. BOUNES Vincent Mme BOURNET Barbara M. CHAPUT Benoil Mme DALENC Florence M. DE BONNECAZE Guillaume M. DECRAMER Stéphane Mme FARUCH-BILFELD Marie M FAGUER Stanislas M. FRANCHITTO Nicolas Mme GARDETTE Virginie M. GARRIDO-STOWHAS Ignacio M. GATIMEL Nicolas M. GUILLEMINAULT Laurent Mme LAPRIE Anne M. LAURENT Camille M. LE CAIGNEC Cédric M. MARCHEIX Bertrand M. MEYER Nicolas M. MUSCARI Fabrice M. PUGNET Gregory M. REINA Nicolas M. RENAUDINEAU Yves M. SILVA SIFONTES Stein M. SOLER Vincent Mme SOMMET Agnès Mme SOTO-MARTIN Maria-Eugènia M. TACK Ivan M. VERGEZ Sébastien M. YSEBAERT Loic

Doyen : Elie SERRANO P.U. - P.H. 2^{ème} classe

Chirurgie infantile Biochimie et biologie moléculaire Parasitologie Médécine d'urgence Gastro-entérologie Chirurgie plastique et des brûlés Cancérologie. Anatomie Pédiatrie Radiologie et Imagerie Médicale Nénhrologie Addictologie Epidémiologie Chirurgie Plastique Médecine de la reproduction Pneumologie Radiothérapie Anatomie Pathologique Génétique Chirurgie thoracique et cardiovasculaire Dermalologie Chirurgie Digestive Médecine interne, Gériatrie Chirurgie orthopédique et traumatologique Immunologie Réanimation Ophtalmologie Pharmacologie Gériatrie et biologie du vieillissement Physiologie Oto-rhino-laryngologie Hématologie

P.U. Médecine générale Mme ROUGE-BUGAT Marie-Eve

Professeur Associé de Médecine

M. BOYER Pierre

M. STILLMUNKES André

FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-PURPAN 37, allées Jules Guesde – 31000 Toulouse

FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE- RANGUEIL 133, route de Narbonne - 31062 TOULOUSE cedex

Bactériologie Virologie Hygiéne

M.C.U. - P.H

M.C.U. - P.H. M APOIL Pol Andre Mme ARNAUD Catherine Mme AUSSEIL-TRUDEL Stéphanie Mme BELLIERE-FABRE Julie Mme BERTOLI Sarah M. BIETH Eric Mme CASPAR BAUGUIL Sylvie Mme CASSAGNE Myriam Mme CASSAING Sophie Mme CHANTALAT Elodie M CONGY Nicolas Mme COURBON Christine M. CUROT Jonathan Mme DAMASE Christine Mme de GLISEZENSKY Isabelle M. DUBOIS Damien Mme FILLAUX Judith M. GANTET Pierre Mme GENNERO Isabelle Mme GENOUX Annelise M. HAMDI Safouane Mme HITZEL Anne M IRIART Xavier Mme JONCA Nalhalie M. KIRZIN Sylvain Mme LAPEYRE-MESTRE Marvse M LHERMUSIER Thibault M. LHOMME Sebastien Mme MASSIP Clémence Mme MONTASTIER-SIMMERMAN Emilie Mme MOREAU Marion Mme NOGUEIRA M.L. Mme PERROT Aurore M. PILLARD Fabien Mme PUISSANT Bénédicte Mme RAYMOND Stephanie Mme SABOURDY Frédérique Mme SAUNE Karine M. TAFANI Jean-André M. TREINER Emmanuel M. VIDAL Eabien Mme VIJA Lavinia

Immunologie Epidémiologie Biochimie et Biologie Moléculaire Néphrologie Hématologie, transfusion Génétique Nutrition Onhtalmologie Parasitologie Anatomie Immunologie Pharmacologie Neurologie Pharmacologie Physiologie Bactériologie Virologie Hygiène Parasitologie Biophysique Biochimie Biochimie el biologie moléculaire Biochimie Biophysique Parasitologie et mycologie Biologie cellulaire Chirurgie générale Pharmacologie Cardiologie Bactériologie-virologie Bactériologie-virologie Nutrition Physiologie **Biologie Cellulaire** Hématologie ; Transfusion Physiologie Immunologie Bactériologie Virologie Hygiéne Biochimie Bactériologie Virologie Biophysique Immunologie Gynécologie obstétrique Biophysique et médecine nucléaire

Mme ABRAVANEL-LEGRAND Florence Mme BASSET Céline Mme BREHIN Camille Mme CAMARE Caroline M CAMBUS Jean-Pierre Mme CANTERO Anne-Valérie Mme CARFAGNA Luana Mme CASSOL Emmanuelle Mme CAUSSE Elizabeth M. CHASSAING Nicolas M. CLAVEL Cyril Mme COLOMBAT Magali Mme CORRE Jill M. DEDOUIT Fabrice M. DEGBOE Yannick M. DELPLA Pierre-André M. DESPAS Fabien M. EDOUARD Thomas Mme ESQUIROL Yolande Mme EVRARD Solène Mme FLOCH Pauline Mme GALINIER Anne Mme GALLINI Adeline M. GASQ David M. GATIMEL Nicolas Mme GRARE Marion M GUERBY Paul M. GUIBERT Nicolas Mme GUILBEAU-FRUGIER Céline Mme GUYONNET Sophie M, HERIN Fabrice Mme INGUENEAU Cécile M. LEANDRI Roger M. LEPAGE Benoit Mme MAUPAS SCHWALM Françoise M. MIEUSSET Roger M. MOULIS Guillaume Mme NASR Nathalie Mme QUELVEN Isabelle M. RIMAILHO Jacques M. RONGIERES Michel Mme SIEGFRIED Aurore Mme VALLET-GAREL Marion M. VERGEZ Francois

Cytologie et histologie Pédiatrie Biochimie et biologie moléculaire Hématologie Biochimie Pédiatrie Biophysique Biochimie Génétique **Biologie Cellulaire** Anatomie el cylologie pathologiques Hématologie Médecine Légale Rhumatologie Médecine Légale Pharmacologie Pédlatrie Médecine du travail Histologie, embryalogie el cytologie Bactériologie-Virologie; Hygiène Hospit. Nutrition Epidémiologie Physiologie Médecine de la reproduction Bactériologie Virologie Hygiéne Gynécologie-Obstétrique Pneumologie : Addictologie Anatomie Pathologique Nutrition Médecine et santé au travail Biochimie Biologie du dével. et de la reproduction Biostatistiques et Informatique médicale Biochimie Biologie du dèvel, et de la reproduction Médecine interne Neurologie Biophysique et Médecine Nucléaire Anatomie et Chirurgie Générale Anatomie - Chirurgie orthopedique Anatomie et Cytologie Pathologiques Physiologie Hématologie Psychiatrie d'Adultes ; Addictologie

M.C.U. Médecine générale M. BISMUTH Michel M. ESCOURBOU Emile

M.C.U. Médecine générale

M. BRILLAC Thierry Mme DUPOUY Julie

Maitres de Conférences Associés de Médecine Générale

M YRONDI Antoine

Dr CHICOULAA Bruno Dr FREYENS Anne Dr PUECH Marielle Dr BIREBENT Jordan Dr BOURGEOIS Odile Dr LATROUS Leila Dr. BOUSSIER Nathalie

REMERCIEMENTS

Au Président du jury,

Monsieur le Professeur Pierre BROUSSET,

Vous me faites l'honneur de présider ce jury de thèse et je vous en suis très reconnaissante. Merci pour tout l'enseignement que j'ai pu trouver à vos côtés, je suis toujours impressionnée par l'étendue de votre savoir, qui est loin de se limiter au domaine de la pathologie. Je vous remercie pour m'avoir accordé votre confiance pour les années à venir, c'est un réel plaisir et honneur de travailler dans votre service. Soyez assuré du profond respect que je vous porte.

À ma directrice de thèse,

Madame le Professeur Janick SELVES,

Je vous remercie pour votre encadrement et votre soutien tout au long de la réalisation de ce travail. Ce n'était pas une mince affaire mais on s'en est sorties ! Merci pour tout ce que vous m'avez enseigné année après année. C'est un réel plaisir de travailler à vos côtés, que ce soit en anapath, en biologie moléculaire ou pour la gestion des internes. Soyez assurée de l'admiration et du profond respect que je vous porte.

Aux membres du jury,

Madame le Professeur Rosine GUIMBAUD,

En tant que référence en matière d'oncologie digestive, vous me faites l'honneur de juger ce travail et je vous en remercie. J'ai eu l'honneur d'assister à plusieurs RCP moléculaires et de mesurer l'ampleur de votre expérience et de vos connaissances. Veuillez trouver l'expression de mon admiration et de mon plus profond respect.

Madame le Docteur Marie DANJOUX DE VOLONTAT,

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail. Ce fut un vrai plaisir de travailler à vos côtés ces dernières années, vous m'avez beaucoup appris. Vous êtes pour moi un exemple de rigueur et de professionnalisme. Veuillez trouver l'expression de mon profond respect et de mes sincères remerciements.

Madame le Docteur Solène EVRARD,

Je te remercie d'avoir accepté de participer à ce jury. Après le DIU de biologie moléculaire, te voilà de nouveau présente pour juger mon travail, j'espère qu'il sera à la hauteur. Je tenais à te remercier de m'avoir accueillie chaleureusement dans le monde de la biologie moléculaire, pour ta bonne humeur et pour ta bienveillance. C'est toujours un plaisir de travailler avec toi. Je tenais à te souhaiter un très bon retour parmi nous ! Sois assurée de l'admiration et du respect je te porte.

Monsieur Frederic ESCUDIE,

Il était important pour moi que tu fasses partie de ce jury et je te remercie d'avoir accepté. Je tenais à te remercier pour ta gentillesse et ton soutien tout au long de ce projet : malgré tout le travail que ça a représenté pour toi, tu t'es toujours montré patient et présent pour répondre à mes questions (parfois redondantes !). J'ai beaucoup appris à tes côtés et j'espère avoir l'occasion de travailler de nouveau avec toi ces prochaines années. Sois assuré du respect et de l'estime que je te porte.

Aux personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail,

Les techniciennes de biologie moléculaire (Emmanuelle, Mélanie, Christelle, Nathalie, Aurore, Ludivine, Julie, Charlène...), merci pour votre patience et le temps précieux que vous avez dédié à l'analyse de mes échantillons.

Clémentine, merci pour ton expertise de statisticienne et d'avoir répondu à mes appels au secours !

REMERCIEMENTS PERSONNELS

<u>A ma famille</u>, qui compte plus que tout au monde pour moi.

A mes petits parents, merci d'avoir toujours été là pour moi, de m'épauler dans les moments plus difficiles et de toujours répondre présents quand j'ai besoin de vous. Je ne serais pas là où je suis sans votre soutien sans faille et j'espère pouvoir vous rendre la pareille à l'avenir. Merci à toi ma petite Maman, à la fois sensible, généreuse, forte et bosseuse et à toi Papou, râleur au grand cœur. Je sais de qui je tiens ce tempérament de feu ! Vous m'avez forgée à votre image et j'en suis fière. Vous pourrez toujours compter sur moi. Je vous aime.

A Lulu, ou comme je préfère t'appeler, Frérot : tu es le petit frère sur le papier mais par moment j'ai plutôt l'impression d'être la petite sœur ! Merci de me supporter depuis le début du début, depuis l'époque où je te déguisais comme une poupée jusqu'à bien des années plus tard... J'aimerais que tu sois plus près de moi mais la distance ne nous empêchera jamais de discuter des heures par visio. Je n'attends qu'une chose, c'est de sauter dans un avion et venir te voir à Lyon. Je suis fière de toi, de ton parcours et de l'homme que tu es devenu. Je t'aime.

A toi ma petite Emma, l'extension de la famille Vigier ♥ Je suis ravie que mon frère soit tombé sur une perle comme toi, intelligente, douce et déterminée. J'aurais aimé qu'on reste voisines plus longtemps mais je suis contente pour vous et votre petite vie lyonnaise/creusotine qui prend forme ! Merci de nous initier à plein de jeux de société, de mon côté je continue de m'entraîner : peut-être qu'un jour (qui sait ?), je réussirais à te battre au « 6 qui prend » ?!

A ma famille au sens large, des contrées périgourdines. Merci à vous les taties Annie, Francette, Nadine et les tontons qui vont de pair ⁽ⁱ⁾ toujours là pour m'accueillir à bras ouverts quand je rentre au pays, merci beaucoup ! Merci à vous les cousins et cousines, avec qui je me marre toujours autant aux repas de famille. Et merci à ma Mamie, mon idole, ma wonder woman **v** Si je peux être comme toi à 85 ans, j'ai tout gagné.

Une pensée particulière pour Papy Charles, qui n'est malheureusement plus des nôtres. J'aurais aimé que tu puisses m'accompagner jusqu'au bout, j'espère te rendre fier aujourd'hui en soutenant ma thèse. Je sais que tu seras là, dans un coin, avec ton caméscope. C'est grâce à toi si aujourd'hui j'apporte autant d'importance à immortaliser les souvenirs. •

Enfin, une pensée pour Papy Pierre et Mamie Didi. Vous m'avez transmis l'amour de la campagne et de la vie simple et je vous en remercie. Je chéris tous les souvenirs (lointains maintenant) que j'ai avec vous, merci d'avoir fait de Pomerède mon havre de paix. ♥

<u>A mes meilleures copines</u>, les choupinours (oui j'ai osé !), les chatons et autres noms farfelus... On s'est rencontrées il y a 10 ans pour ne plus jamais se quitter. Chaque jour je mesure la chance de vous avoir dans ma vie.

Obligée de commencer par toi **Estelle**, mon petit chaton des Landes, ma coloc de choc : 5 ans de vie commune, c'est officiel on forme un vieux couple là ☺ Merci de me supporter au quotidien, moi et mes questions existentielles, mes changements de tenues inopinés, les rouleaux de PQ vides qui traînent... Se brosser les dents n'a jamais été aussi fun qu'avec toi ! Tu sais déjà tout le bien que je pense de toi... Je t'admire pour ta force, ton courage, ta générosité et ta bienveillance, toujours présentes malgré tout ce que la vie te fait traverser. Merci pour tout ton soutien dans les moments difficiles, tu sais que tu pourras toujours compter sur moi en retour. ♥

A toi ma petite **Yon**, chaton de la Réunion ! La majeure partie de mes souvenirs de l'externat sont reliés à tes chansons paillardes ou à tes accès de kleptomanie ! (ahah) Un sacré petit bout de femme, si tu savais comme je suis fan de toi et de ton appétit pour la vie © Il me suffit de penser à toi pour retrouver le sourire instantanément. Avec ton cœur immense, tu n'aurais pas pu choisir un meilleur métier. Tu me manques petit cardiologue ! Profite bien de la Réunion mais reviens nous vite *****

Ma belle Alice, le chaton des Caraïbes (ou d'Angoulême, tu choisis !) … Si tu savais le nombre de fois où j'ai répété fièrement « Eh ouais c'est ma copine ! » quand quelqu'un me parlait de toi… T'es tellement stylée, c'est hardcore ;) Tu es l'aventurière du groupe, celle qui ne recule devant rien, qui aime sans compter et qui profite de la vie au maximum. Tu es aussi celle qui écoute et qui conseille, avec qui on peut refaire le monde pendant des heures. Merci de nous inspirer au quotidien pour devenir la meilleure version de nous-même. Reviens vite, je t'attends de pied ferme pour la prochaine fête de la châtaigne ♥

Elodie, petit chat... En 10 ans on a eu l'occasion de partager pas mal de moments et chacun d'entre eux m'a permis d'apprécier l'étendue de ta personnalité de dingue. Tu es un diamant à l'état brut, précieux avec de multiples facettes. Ta joie de vivre, ton humour tout en finesse et ta douceur, la résilience dont tu fais preuve et ton intelligence font de toi une femme inspirante, que j'admire

toujours un peu plus chaque année [©] Trinquons à ce bout de chemin parcouru ensemble et à celui qui nous attend encore *****

A mes copains Bordelais sans qui les années d'externat n'auraient pas eu la même saveur...

A toi **Marie**, notre arcachonnaise. On s'est suivies de Bordeaux jusqu'à Toulouse, avec de bons moments comme des plus compliqués, mais ça ne nous empêche pas de toujours autant se marrer quand on se voit. Je suis heureuse que tu aies trouvé ta moitié, au sens propre comme au sens figuré (Marie... Alice... tu l'as ?). Rdv au mariage l'année prochaine ! *****

Merci à vous, **Maxime** et **Hugo**, partenaires de galas médecine et de férias ! Toujours fidèles au poste pour nous garder des places au Blarney les soirs de match de rugby, j'espère vivement qu'on aura un jour l'occasion de remettre ça !

Je ne t'oublie pas **Estelle G**., première rencontre en P2 le premier jour du stage infirmier ! Je nous vois encore, fraîchement sorties de la P1 et complètement flippées à l'idée d'aller parler aux patients toutes seules... On a fait du chemin depuis ⓒ Merci pour toutes ces soirées passées ensemble à discuter de nos vies en mangeant des sushis ou en buvant des bières au House of Parliament. J'espère te revoir bientôt et qui sait, rencontrer ton futur petit bout de chou ♥

Aux rencontres toulousaines, qui ont égayé mon arrivée dans la ville rose :

Mélissa, dire qu'il a fallu émigrer à Toulouse pour qu'on se rencontre. On partage la même passion pour le dessin et la photo et qu'est-ce que tu es talentueuse ! Au moment où j'écris ces remerciements, tu t'apprêtes à soutenir ta thèse. Vivement que tout ça soit fini et qu'on se retrouve pour profiter de la liberté !

Et **Marion** et **Laeti**, mes perpignanaises préférées. J'attends la fin du Covid avec impatience pour qu'on reprenne nos sorties restos et balades en forêts !

<u>Aux Tarbais</u>, qui ont fait de ce semestre en périphérie l'une de mes plus belles expériences de vie. Mention spéciale à Alice (ma muse), Clara (ou Carla, notre docteur des bébés), Marine (titi au grand cœur), Iohanna (notre maman à tous), Pierrot (le seul et l'unique), Lou(lou) et Baptiste (Daddy cool) ... Mes coups de cœurs 2020 ♥ Je n'aurais pas pu demander de meilleurs partenaires de Koh Lanta et de soirées karaoké ! Merci à Emilie, Côme, Tess, Toto (Céline for ever), Auranne, Elodie, Anne, Ryad (mentor du ping-pong) et à tous les autres que j'oublie. Hâte de tous vous revoir ♥

<u>A mes amis de la première heure</u>, ceux qui me suivent depuis l'époque lointaine du collège/lycée...

Ma petite **Clémentine**, toujours présente après tant d'années (1, 2, 3, ... 14 ans ?!) ! Merci d'être là, dans les bons comme dans les mauvais moments, tu m'as prouvé à plusieurs reprises ces dernières années que malgré la distance je pouvais compter sur toi. Je chéris tous les souvenirs que nous avons ensemble et j'ai hâte d'en créer de nouveau ces prochaines années. **•**

Je pense aussi à vous les copains, **Titi**, **Lulu**, **Gato**, **Jules**... Merci d'avoir été là pour me sortir la tête de mes bouquins de médecine, vous étiez (et êtes toujours) ma bouffée d'air frais ! Nos soirées pessacaises me manquent... vivement la fin du Covid pour qu'on reprenne nos bonnes vieilles habitudes ©

Ma petite Margot, je sais que tu t'éclates à Montréal mais avais-tu vraiment besoin de t'exiler aussi loin ?! Je compte toujours sur toi pour refaire ma culture cinématographique... Tu me manques beaucoup. •

<u>A mes cointernes</u>, merci à vous les copains pour ces 10 semestres à vos côtés ! On aura vécu des péripéties mais je garde un très bon souvenir de mon internat et ça, c'est grâce à vous **v**

Merci à toi, ma belle **Anne-Cécile**, super co-interne, super copine, tu coches toutes les cases ! Si tu savais toute l'affection que je te porte ♥ Tu es une vraie PÉ-PITE. J'ai hâte que tu reviennes parmi nous, nos pauses corgis/recettes Deliciously Ella/Instagram me manquent !

Merci à toi ma petite Lisa, copine de week-ends toulousains ou tarbais ! Chaque moment en ta compagnie est un plaisir, tu pourras toujours compter sur moi pour refaire le monde autour d'un bon thé et de cookies © J'aimerais qu'un jour tu réaliseras quelle personne formidable tu es.

Juju, mon petit rayon de soleil de l'anapath ♦ On arrive à la fin du chemin ça y est... Merci d'avoir illuminé mes journées, j'aurais aimé que tu restes plus longtemps avec nous mais ta vie perpignanaise t'attend ! Tu vas me manquer. Je viendrais avec plaisir te rendre visite à toi et à ta petite famille ♥ Merci à toi Sébastien (Sébichou pour les intimes), le seul et l'unique, l'indescriptible... Je t'adore ! ♥ Tu vas incroyablement me manquer, sur qui vais-je pouvoir compter pour checker mes nouvelles fringues une fois que tu seras parti ? Merci pour tout.

Quentin, co-interne puis chef ! Merci pour ce super semestre à Tarbes. Toujours présent pour me suivre dans mes délires de fin de journée quand la fatigue se fait sentir ou pour m'accompagner sur le dancefloor (avec nos chorégraphies à la Justin Timberlake !) ... Un petit Bonjour ?

A mon perpignanais préféré **Guigui**, heureuse d'avoir été ta co-interne toutes ces années, depuis l'époque du T-shirt à fleurs (les vrais savent... RIP) ! Il n'y a que toi qui arrive à me faire mourir de rire et à me donner envie de m'arracher les cheveux en même temps ahah ! Merci d'avoir rendu l'anapath encore plus fun [©]

Big up à la team du bureau du fond, avec **Pauline**, tout en humour et douceur : j'ai beaucoup apprécié les moments qu'on a partagé ; **Margot**, sportive au caractère bien trempé et 3^e membre du trio ; **Marine**, toujours chaleureuse et pétillante, un plaisir au quotidien ! Et enfin **Jessie**, parfait mélange d'une super Nana et d'une princesse Disney ! On se soutient entre catmoms ♥

Milles mercis aux copains du grand bureau, en commençant par toi **Vincent**, qui ne manque jamais de m'embarquer dans ses délires et ses questions existentielles farfelues (et de me fait mourir de rire par la même occasion) ; **Pierre**, notre expat' byzantin (un jour promis on la fera cette vidéo Tiktok !) ; **Ronan** et **Axelle**, les deux supers pioupious de l'anapath **v** et puis **Gabi**, qui nous a quitté pour le soleil du Sud ! J'espère que ta vie nîmoise se passe bien.

Je n'oublie pas Mathou, qui a peut-être quitté le service mais certainement pas nos cœurs !

Un grand merci à vous les « vieilles », qui nous ont montré le chemin... Claire (la bonne humeur incarnée), Alix (notre exemple à tous) et Cécile (bulldozer de l'anapath, inégalée à ce jour), j'ai adoré mes semestres à vos côtés ! Charlotte, une fille en or : hâte de pouvoir travailler avec toi ces prochaines années ! •

Dédicace aux internes d'autres horizons que j'ai eu le plaisir de côtoyer le temps d'un semestre, avec une pensée particulière pour la team des byzantins Antho Jack et Charlotte (que de bons souvenirs de soirées d'été avec vous !) et pour Oli (et son rire si communicatif). J'espère avoir un jour l'occasion de vous revoir. • Enfin, merci aux internes d'autres spécialités, venus découvrir le monde de l'anapath, qu'ils soient radiologues (mention spéciale à toi, Maxence), oncologues, dermato, ophtalmo... J'espère que vous avez apprécié vos semestres en notre compagnie, ce fut un plaisir de vous rencontrer ! ③

<u>Aux assistant(e)s</u> qui se sont succédé années après années et qui nous ont frayé le chemin de l'anapath : Romain, Maxime et Thibault, Gwendo, Laure, Oriane et Julie ; avec une mention spéciale à Sarah et Aurore, qui continuent de nous transmettre leur savoir jour après jour. Merci pour votre disponibilité et votre gentillesse.

À tous les médecins des services d'anatomopathologie (de l'IUCT et du CH de Tarbes) auprès desquels j'ai tant appris. Je ne m'aventurerai pas à tous vous citer au risque d'en oublier, mais merci pour l'enseignement que j'ai pu trouver auprès de chacun d'entre vous. Merci de m'avoir transmis la passion de l'anapath. C'est un honneur de travailler à vos côtés, j'espère être à la hauteur ces prochaines années.

À toute l'équipe d'anatomopathologie de l'IUCT : les techniciens, les ingés, les ARC, les cadres, les secrétaires sans qui on ne ferait rien. Merci pour votre gentillesse et votre bonne humeur. Quelques mots en particulier pour nos binômes de macro et de gardes : Virginie, Anaïs, Sophie, Chantal, Jess, Marine, Marjo, Marion, Toto, Coco et ceux que j'oublie... J'ai beaucoup apprécié tous les moments privilégiés que l'on a partagé ces dernières années !

À toute l'équipe de biologie moléculaire : Solène, Fred, David et les techniciennes. C'est grâce à vous que je sais tout ce que je sais aujourd'hui, vous êtes de vrais puits de science ! Je tenais à vous remercier pour le temps que vous m'avez accordé malgré vos journées déjà bien chargées, sachez que j'ai beaucoup apprécié de travailler à vos côtés pendant mon semestre en BM.

<u>A l'équipe du réseau d'Onco-Occitanie</u>, merci de m'avoir accueillie et de m'avoir initiée au vaste domaine qu'est la santé publique. Un grand merci à Charlotte et Julie, vous avez égayé mes journées lors de mon passage éclair au réseau. EVALUATION DES PERFORMANCES DU MARQUEUR HSP110 T17 ET DE LA TECHNIQUE NGS DANS LA DETECTION DE L'INSTABILITE MICROSATELLITAIRE

TABLE DES MATIERES

I.	GENERALITES	1
A re	. Bases de la biologie moléculaire : la réplication et les mécanismes de fidélité de la éplication	1
В	Le système Mismatch Repair	3
	 Mecanisme d'action Microsatellite et instabilité microsatellitaire 	
С	. Modalités du diagnostic d'instabilité microsatellitaire	6
	1. Analyse immunohistochimique des protéines du système MMR (MMR-IHC)	6
	2. Analyse en biologie moleculaire	9 9
	i. Aspects techniques	9
	ii. Panel de microsatellites	
	 b. Technologie Idylla[™] c. Séquencage haut débit (NGS) 	12 13
	i. Aspects techniques	13
	ii. Application du NGS à l'instabilité microsatellitaire	18
D	Etiologies d'une instabilité microsatellitaire	21
	1. Hyperméthylation du promoteur du gène <i>MLH1</i>	
	2. Le syndrome de Lynch	21 21
	b. Epidémiologie	
	c. Diagnostic du syndrome de Lynch	
	3. Le syndrome CMMRD	
	 Doubles initiations somatiques des genes initiat Etiologies secondaires d'instabilité microsatellitaire 	24 24
E	. Indications de recherche du statut d'instabilité microsatellitaire	
	1. Intérêt diagnostique : dépistage du syndrome de Lynch	25
	2. Intérêt pronostique et réponse à la chimiothérapie	25
	5. Interet therapeutique : indication de l'immunotherapie	20
F	Le microsatellite HSP110 11/	27 27
	 Relations entre HSP et cancer	
	3. La protéine HSP110	
	4. HSP110 T17 marqueur de l'instabilité microsatellitaire	29 20
	b. Etat des lieux de la littérature	29 29
П.	OBJECTIFS	30
III	MATERIELS ET METHODES	31
111 1	Domulation d'étudo	••••• J
A	Poqueil de deuxées elisiones et an étament de la in	۲ د ۱ د
В	. Kecueii ae aonnees ciiniques et anatomopathologiques	
C	 Determination du statut d'instabilité microsatellitaire en techniques de référence Analyse immunohistochimique 	32 גר
	 Analyse minutoinstochnique. Analyse moléculaire en PCR (Pentaplex-PCR) 	

b. Protocole de la PCR	
c. Analyse des résultats	
D. PCR HSP110 T17	
1. Méthode décrite par <i>Buhard et al</i> (2016)	
a. Etude d'HT17 sur ADN germinal	
b. Etude d'HT17 sur ADN tumoral	
2. Implémentation de la PCR HSP110 T17 dans notre laboratoire	
3. Application sur les deux cohortes de l'étude	
a. Analyse de la cohorte contrôle	
b. Analyse de la cohorte d'intérêt	
E. Recherche de l'instabilité microsatellitaire en NGS	
1. Qualification d'un échantillon pour une analyse NGS	
2. Technique NGS utilisée dans le laboratoire	
3. Analyse de l'instabilité microsatellitaire en NGS	
a. Logiciel MIAmS : concept général	
b. Application à notre travail	
i. Adaptation de l'apprentissage à la population étudiée	
11. Creation d'un fichier annoté « référence »	
111. Cycles d'apprentissage et d'acquisitions des données	
1V. Exploitation des données	
v. Analyses statistiques	
IV. RESULTATS	
1 Course fuiction of an externa division of do by second stick d'étade	40
A. Caractéristiques anatomocliniques de la population d'étude	49
 <i>A.</i> Caractéristiques anatomocliniques de la population d'étude <i>B.</i> Caractéristiques tumorales et moléculaires 	49 51
 A. Caractéristiques anatomocliniques de la population d'étude B. Caractéristiques tumorales et moléculaires 1. Données des échantillons tumoraux 	
 A. Caractéristiques anatomocliniques de la population d'étude B. Caractéristiques tumorales et moléculaires 1. Données des échantillons tumoraux 2. Statut MMR des tumeurs 	
 A. Caractéristiques anatomocliniques de la population d'étude	
 A. Caractéristiques anatomocliniques de la population d'étude	
 A. Caractéristiques anatomocliniques de la population d'étude	
 A. Caractéristiques anatomocliniques de la population d'étude	
 A. Caractéristiques anatomocliniques de la population d'étude	
 A. Caractéristiques anatomocliniques de la population d'étude	
 A. Caractéristiques anatomocliniques de la population d'étude	
 A. Caractéristiques anatomocliniques de la population d'étude	
 A. Caractéristiques anatomocliniques de la population d'étude	
 A. Caractéristiques anatomocliniques de la population d'étude	
 A. Caractéristiques anatomocliniques de la population d'étude	
 A. Caractéristiques anatomocliniques de la population d'étude	
 A. Caractéristiques anatomocliniques de la population d'étude	
 A. Caractéristiques anatomocliniques de la population d'étude	
 A. Caractéristiques anatomocliniques de la population d'étude	
 A. Caractéristiques anatomocliniques de la population d'étude	
 A. Caractéristiques anatomocliniques de la population d'étude	

V. I	DISCUSSION	. 70
А.	Apport du marqueur HT17 en PCR pour la détection d'une MSI	70
B. mic	<i>Méthodologie de validation d'une technique NGS pour la détection de l'instabilité rosatellitaire</i>	71
C. de n	Diagnostic d'une MSI en NGS : impact du seuil d'instabilité et de la composition du par microsatellites	nel 73
D.	Diagnostic de MSI en fonction du type tumoral	75
Е.	Limites de l'étude	77
F.	Perspectives	78
VI. (CONCLUSION	. 79
VII.	ANNEXES	. 80
VIII	BIBLIOGRAPHIE	. 82

ABREVIATIONS

5-F U	5-fluorouracile	QMVR	Quasimonomorphic variant range
ADN	Acide désoxyribonucléique	RER	Replication error
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché	RH	Recombinaison homologue
ARN	Acide ribonucléique	SAM	Sequence alignment map
BAM	Binary alignment map	SL	Syndrome de Lynch
BER	Réparation par Excision de Base	SNV	Single nucleotide variant
CCR	Cancer colorectal	TVES	Tumeur des voies excrétrices Supérieures
CDB	Cassure double-brin	UV	Rayonnement ultra-violet
CE	Cancer de l'endomètre	VCF	Variant calling format
CIMP	Cpg Island Methylator Phenotype	WE	Whole exome
dMMR	Statut MMR déficient	WG	Whole genome
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate	WT	Wild-type
FFPE	Fixé en formol et inclus en paraffine		
Gb	Gigabase		
HNPCC	CC Human non polyposis colorectal cancer		
HRM	High resolution melt		
HSP	Heat shock protein		
INCa	Institut National du Cancer		
JENH	I Recombinaison par Jonction Non-Homologue des Extrémités		
Kb	Kilobase		
MLH1	MutL homolog 1		
MMR	Mismatch repair		
MSH2	MutS homolog 2		
MSH6	MutS homolog 6		
MSI	Instabilité microsatellitaire		
MSI-H	MSI-high		
MSI-L	MSI-low		
MSS	Stabilité microsatellitaire		
NCI	National cancer Institute		
NER	Réparation par Excision de Nucléotio	des	
NGS	Next Generation sequencing		
Pb	Paire de bases		
PCR	Polymerase Chain Reaction		
pMMR	Statut MMR proficient		
PMS2	Postmeiotic segregation increased 2		
Pol-D	ADN polymérase δ		
Pol-E	ADN Polymérase ε		

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma de la réplication de la molécule d'ADN1
Figure 2 : Schéma des activités endonucléasique et exonucléasique de l'ADN polymérase2
Figure 3 : Mécanismes de réparation de l'ADN
Figure 4 : Représentation schématique du fonctionnement du système de réparation MMR (adaptée
de Jiricny et al, 2013 & Li et al, 2016)
Figure 5 : Illustrations d'examens immunohistochimiques des protéines MMR
Figure 6 : Profils en PCR multiplex avec utilisation du panel Pentaplex10
Figure 7 : Workflow d'une technique NGS © 2017 Illumina®, Inc14
Figure 8 : Méthodes d'enrichissement des librairies © 2017 Illumina®, Inc15
Figure 9 : Exemple de photo prise lors d'un cycle de séquençage © 2017 Illumina®, Inc16
Figure 10 : Pipeline bio-informatique © 2017 Illumina®, Inc
Figure 11 : Exemple d'un fichier VCF annoté (http://samtools.github.io/hts-specs/VCFv4.2.pdf)17
Figure 12 : Indicateurs de qualité d'un run NGS18
Figure 13 : Techniques moléculaires de détection de l'instabilité microsatellitaire20
Figure 14 : Rôles des protéines de choc thermique (de Kevin Berthenet, « La protéine HSP110 :
rôle dans le développement tumoral et sur l'immunogénicité du cancer colorectal. » 2015)27
Figure 15 : Profil d'HT17 et des autres microsatellites en population générale (Buhard et al, 2016).
Figure 16 : Algorithme d'interprétation du profil HT17 (adapté de <i>Buhard et al</i> (2016))37
Figure 17 : Interface de visualisation des données de l'instabilité microsatellitaire en NGS41
Figure 18 : Représentation schématique des apprentissages réalisés pour ce travail
Figure 19 : Cycles d'apprentissage et d'acquisition des données via MIAmS45
Figure 20 : Schéma explicatif du traitement des données de l'analyse NGS
Figure 21 : Composition de la cohorte d'intérêt
Figure 22 : Profils phénotypiques d'HT17 dans notre laboratoire
Figure 23 : Exemples de profils altérés d'HT17 en PCR
Figure 24 : Concordance du statut d'instabilité microsatellitaire des marqueurs en NGS et en
Pentaplex-PCR
Figure 25 : Concordance du statut de chaque microsatellite en NGS et du statut global de
l'échantillon en Pentaplex-PCR (toutes tumeurs confondues)64

TABLES DES TABLEAUX

Tableau 1 : Critères diagnostiques de syndrome de Lynch. 23
Tableau 2 : Statuts de référence des microsatellites utilisés pour l'apprentissage de MIAmS sur le
statut du marqueur (statut de la PCR ou de l'analyse manuelle du NGS)44
Tableau 3 : Caractéristiques anatomocliniques de la population d'étude. 49
Tableau 4 : Données concernant les patients ayant reçu une immunothérapie
Tableau 5 : Détails des prélèvements anatomopathologiques des échantillons tumoraux. 51
Tableau 6 : Détails du profil MMR des échantillons tumoraux en immunohistochimie
Tableau 7 : Détails du profil MMR des échantillons tumoraux en biologie moléculaire
Tableau 8 : Statut MMR des échantillons de la cohorte d'intérêt. 54
Tableau 9 : Description des profils de méthylation du promoteur de MLH1 et du statut mutationnel
de BRAF des échantillons de la cohorte d'intérêt, déclinés selon le type tumoral et le profil
immunohistochimique
Tableau 10 : Répartition des patients en consultation d'oncogénétique. 57
Tableau 11 : Détails des 50 patients vus en consultation d'oncogénétique
Tableau 12 : Résultats de l'analyse d'HT17 en PCR60
Tableau 13 : Statuts d'instabilité microsatellitaire en PCR HT17 et en Pentaplex-PCR. 61
Tableau 14 : Performances globales de la PCR HSP110 T17. 61
Tableau 15 : Déclinaison des performances de la PCR HT17 selon le type tumoral. 62
Tableau 16 : Sensibilité des microsatellites en NGS selon le type tumoral et selon le type
d'apprentissage65
Tableau 17 : Sensibilité des panels de microsatellites en NGS selon le seuil d'instabilité et le type
d'apprentissage réalisé dans la population toutes tumeurs confondues66
Tableau 18 : Mesure de l'impact du type d'apprentissage sur la sensibilité de l'analyse d'instabilité
microsatellitaire en technique NGS, déclinée selon le panel utilisé (Pentaplex-NGS ou Hexaplex-
NGS) et le seuil d'instabilité utilisé67
Tableau 19 : Sensibilité des panels de microsatellites en NGS selon le seuil d'instabilité, le type
tumoral et le type d'apprentissage réalisé68
Tableau 20 : Comparaison des performances des panels de microsatellites pour chaque type
d'apprentissage et pour chaque seuil d'instabilité69

I. <u>GENERALITES</u>

A. Bases de la biologie moléculaire : la réplication et les mécanismes de fidélité de la réplication

La **réplication** correspond au processus de duplication de l'ADN, qui se déroule pendant la phase S du cycle cellulaire.

Il s'agit d'un processus de synthèse d'un brin d'ADN complémentaire au brin matrice via l'intervention d'enzymes spécifiques, **les polymérases**. Elle s'appuie sur un complexe protéique, le réplisome, constitué notamment d'une ADN primase (ARN polymérase), de deux ADN polymérases réplicatives et d'une hélicase. Le rôle de cette dernière est de séparer les deux brins d'ADN pour permettre l'accès de l'ADN polymérase à l'ADN. <u>FIGURE 1</u>



La réplication démarre par la phase d'initiation avec la synthèse par l'ADN primase d'une amorce (courte séquence d'ARN complémentaire au brin matrice ou fragments d'Okasaki). Il s'en suit la phase d'élongation, au cours de laquelle l'ADN polymérase va incorporer des désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP ou nucléotide) au néo-brin, dans un sens 5'-3' : cela définit l'activité endonucléasique 5'-3' de l'ADN polymérase. <u>FIGURE 2</u>

Il existe plusieurs ADN polymérases chez les eucaryotes : la **polymérase delta** (Pol δ ou Pol-D) et la **polymérase epsilon** (Pol ε ou Pol-E), qui sont les deux ADN polymérases principales de la réplication et la polymérase alpha (Pol α), qui synthétise l'amorce en début de réplication. Il existe également la polymérase béta (Pol β), qui intervient dans la réparation de l'ADN par excision de base et la polymérase gamma (Pol γ), qui est spécifiquement dédiée à la réplication de l'ADN mitochondrial. Les ADN polymérases se différencient selon leur processivité (capacité à polymériser l'ADN sans se dissocier du brin matrice), leur fidélité (capacité à copier l'ADN sans induire d'erreurs) et selon qu'elle présente ou non une capacité de relecture et de correction (activité exonucléasique 3'-5'). En effet, il est possible qu'au cours de la réplication l'ADN polymérase réalise des erreurs, en incorporant au niveau du nouveau brin d'ADN une ou plusieurs bases non complémentaires : ces erreurs sont responsables de **mésappariements**. Les polymérases Pol-D et Pol-E possèdent une activité de relecture et sont donc capables de détecter ces erreurs d'incorporation et de les corriger grâce à leur activité exonucléasique 3'-5' : elles vont exciser la base mal appariée pour réinsérer la base correcte et poursuivre la réplication. <u>FIGURE 2</u>



Cette capacité de relecture et de correction des polymérases D et E permet de diminuer la fréquence des erreurs de mésappariements de $1/10^5$ à $1/10^7$. (1) Les erreurs qui échappent à la correction des ADN polymérases nécessitent l'intervention de mécanismes de réparation spécifiques, comme le **système Mismatch Repair (MMR)**, que nous détaillerons par la suite.

En plus des erreurs de mésappariements, l'ADN peut présenter des altérations par phénomènes de désamination, d'hydroxylation, d'alkylation ou de méthylation ou encore par la cassure de l'un ou de ses deux brins. Ces dégradations sont la conséquence de facteurs environnementaux physiques (rayons ultraviolets (UV) et rayonnements ionisants) ou chimiques (radicaux libres de l'oxygène et agents alkylants) et sont réparées via des mécanismes de réparation spécifiques : les altérations de l'ADN simple brin font intervenir la réparation par excision de base (BER) ou par excision de nucléotides (NER), tandis que les cassures double-brins sont réparées par recombinaison homologue (RH) ou par jonction d'extrémités non homologues (JENH). <u>FIGURE 3</u>



B. Le système Mismatch Repair

1. Mécanisme d'action

Le **système mismatch repair** (MMR) est un mécanisme de reconnaissance et de réparation des erreurs d'insertions, de délétions et des mésappariements de l'ADN. C'est un mécanisme de réparation hautement conservé entre les eucaryotes et les procaryotes, qui fut initialement décrit chez *Escherichia Coli* avant d'être reconstitué *in vitro*. (2) Il est basé chez la bactérie sur les protéines « Mut », qui s'associent sous forme de complexes protéiques. Ces différents complexes protéiques interviennent de manière séquentielle, après identification du brin endommagé (qui se distingue du brin d'ADN matrice par son caractère hypométhylé).

Le mécanisme de réparation se déroule selon les étapes suivantes :

- * <u>La reconnaissance du mésappariement</u> : l'identification de la séquence incorrecte s'appuie sur un homodimère « MutS₂ », qui recrute les deux homodimères « MutL₂ » et « MutH₂ » pour former le complexe MutS/MutL/MutH.
- * <u>L'excision du mésappariement</u> : après translocation à l'ADN, le complexe protéique repère le site de méthylation le plus proche du mésappariement, codé par la séquence nucléotidique d(GATC). Le brin d'ADN est coupé en regard de ce site par la protéine « MutH », permet-

tant l'accès à l'ADN d'une ADN exonucléase et d'une hélicase, « MutU », qui vont exciser le fragment d'ADN contenant le mésappariement.

 <u>Néosynthèse d'ADN</u> : le trou d'excision est comblé par l'ADN polymérase avant d'être raccordé au reste de l'ADN par une ligase. <u>FIGURE 4</u>



Le système MMR est davantage décrit chez les procaryotes que chez les eucaryotes, mais il est admis que son mode d'action est identique chez l'ensemble des espèces mammifères et qu'il reste semblable à celui de la bactérie. Chez l'eucaryote, l'identification du brin à réparer ne se base pas sur la reconnaissance de sites méthylés mais sur d'autres mécanismes, que nous ne décrirons pas ici. La reconnaissance du mésappariement repose sur l'action d'homologues de MutS, « **MutSa** » (hétérodimère MSH2/MSH6) en cas d'insertion/délétion (indel) de petite taille et « **MutSβ** » (hétérodimère MSH2/MSH3) en cas d'indel de grande taille. L'excision du fragment d'ADN repose sur l'action de **MutL**α (hétérodimère MLH1/PMS2) et la néosynthèse de l'ADN sur l'action de la polymérase delta (Pol-D). <u>FIGURE 4</u>

Il n'a pas été identifié à l'heure actuelle chez l'eucaryote d'homologue de MutH.

2. Microsatellite et instabilité microsatellitaire

Une anomalie du fonctionnement du système MMR entraîne un défaut de réparation des mésappariements et engendre une accumulation de mutations au niveau de l'ADN. Lorsqu'elles touchent des gènes clés du contrôle du cycle cellulaire ou de l'apoptose, ces mutations peuvent aboutir à une activation de la cancérogénèse.

Les **microsatellites**, appelés *simple sequences* ou *short tandem repeats*, sont des séquences simples et courtes composées d'un motif nucléotidique « x » répété n fois. La longueur du motif varie de 1 à 6 bases, répétées en tandem (ex : ATATATATAT). Un microsatellite est mononucléotidique lorsque le motif est constitué d'une base, di-nucléotidique s'il est composé de deux bases etc. Le nombre de répétitions varie d'un individu à l'autre et au cours des générations : on parle de polymorphisme de taille. Ces séquences sont retrouvées partout dans le génome, en régions codantes mais surtout en régions non codantes et représentent environ 1,6 % du génome humain.

Lors de la réplication de l'ADN, l'ADN polymérase peut ajouter ou à l'inverse, oublier des nucléotides : c'est **l'effet « glissement »**. En raison de leurs séquences répétées, les régions microsatellitaires sont particulièrement sujettes aux erreurs de glissement pendant la réplication, ce qui forme de courtes boucles. En cas de déficience du système MMR, ces erreurs ne sont pas corrigées et sont transmises aux cellules des générations suivantes.

Les conséquences sur le fonctionnement sont limitées lorsque ces erreurs touchent un microsatellite situé en région non codante. Cependant certains microsatellites sont localisés dans des séquences codantes du génome et seront transcrits sous la forme d'ARN messager (ARNm) : une modification de la séquence ARNm a pour conséquence la modification de la protéine traduite et s'accompagne très souvent d'une inactivation fonctionnelle de la protéine en question, conférant un avantage sélectif à la cellule tumorale MMR-déficiente.

La présence de mutations au sein des séquences microsatellitaires définit <u>l'instabilité microsatellitaire</u> et constitue un marqueur de l'inactivation du système MMR. Il s'agit d'un mécanisme d'oncogenèse impliqué dans plusieurs cancers mais décrit initialement dans les années 1990 dans le cancer colorectal (CCR). **(3)** Dans le CCR, il se distingue clairement du mécanisme d'instabilité chromosomique, défini par des altérations sur de nombreux oncogènes, gènes suppresseurs de tumeurs et par d'importants remaniements génétiques. Cette altération génomique a d'abord été appelée RER (Replication Error) ou MIN (Microsatellite Instability) pour être par la suite renommée MSI (Microsatellite Instability) lors du consensus international de Bethesda en 1997. **(4)**

Différents termes sont appliqués pour définir le caractère fonctionnel ou non du système MMR dans une tumeur : tumeur RER positive ou négative (pour *Replication ERror*, terme qui n'est plus à utiliser), tumeur MSI ou MSS (pour *microsatellite instability* et *microsatellite stability*) et encore tumeur dMMR ou pMMR (pour *deficient MMR tumor* et *proficient MMR tumor*). Par ailleurs, il existe deux façons de rechercher une déficience MMR dans une tumeur : par la recherche d'une perte d'expression de protéines MMR en immunohistochimie (IHC) et par la recherche d'une instabilité microsatellitaire dans l'ADN tumoral en biologie moléculaire. Il n'existe à l'heure actuelle pas de consensus quant à la terminologie à appliquer concernant le statut MMR d'une tumeur.

Dans le reste du manuscrit, et en accord avec les futures recommandations françaises ¹ nous utiliserons la terminologie suivante :

- Les termes MSS et MSI pour décrire les résultats d'un test de biologie moléculaire
- Les termes pMMR-IHC et dMMR-IHC pour les résultats de l'immunohistochimie (IHC) des protéines MMR
- Les termes pMMR et dMMR pour parler du statut du système MMR d'une tumeur en général

C. Modalités du diagnostic d'instabilité microsatellitaire

La recherche d'une déficience du système MMR dans une tumeur peut s'effectuer par deux techniques utilisées en routine : l'étude de l'expression des protéines MMR en immunohistochimie et la recherche d'une instabilité microsatellitaire dans l'ADN tumoral en biologie moléculaire.

1. Analyse immunohistochimique des protéines du système MMR (MMR-IHC)

L'étude immunohistochimique des protéines du système MMR consiste à évaluer l'expression dans les cellules tumorales des 4 protéines principales MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2. En plus d'être facile d'utilisation, cette technique a donc comme principal avantage d'orienter directement vers le gène touché en identifiant la (ou les) protéine(s) défaillante(s).

Ces protéines sont exprimées à l'état normal dans le noyau de nombreuses cellules de l'organisme, comme les entérocytes au tiers inférieur des cryptes intestinales, les lymphocytes des centres germinatifs ou les cellules endothéliales du stroma tumoral : leur marquage sert ainsi de témoin interne

¹ « Recommandations pour la recherche du statut MMR tumoral », INCa, en cours de publication

positif à la technique. L'inactivation des deux allèles d'un gène MMR est responsable de la perte d'expression de la protéine concernée dans la cellule et se traduit par une perte du marquage de la protéine en IHC : cette perte concerne généralement l'ensemble des cellules tumorales.

Les protéines MMR agissent en hétérodimères fonctionnels, MSH6 avec MSH2 et PMS2 avec MLH1 avec comme partenaires obligatoires MSH2 et MLH1 et comme partenaires secondaires MSH6 et PMS2. Ces derniers peuvent être remplacés par des partenaires optionnels, comme MSH3 (à la place de MSH6) et MLH3 ou PMS1 (à la place de PMS2). En conséquence, la mutation des gènes *MLH1* ou *MSH2* entraîne une dégradation protéolytique de la protéine mutée mais également celle de son partenaire secondaire (PMS2 ou MSH6 respectivement) : cela se traduit par une perte d'expression concomitante des deux protéines de l'hétérodimère. **(5,6)**

Cette perte d'expression « en couple » est le profil le plus fréquent des tumeurs dMMR. En revanche, une mutation des gènes *PMS2* ou *MSH6* n'entraine pas obligatoirement de dégradation de leur partenaire primaire, car ces protéines mutées peuvent être substituées par un partenaire optionnel (MSH3, PMS1 ou MLH3, ce qui assure alors la stabilité de MLH1 ou MSH2. Il en résulte une perte isolée d'une seule protéine de l'hétérodimère : MSH6 ou PMS2.

Le profil d'expression en immunohistochimie permet le plus souvent de distinguer deux classes de tumeurs correspondant aux deux phénotypes MMR : <u>FIGURE 5</u>

- * Le phénotype pMMR-IHC qui correspond à une expression normale des 4 protéines MMR ;
- * <u>Le phénotype dMMR-IHC</u> qui correspond à une expression anormale des protéines MMR et qui peut se traduire par :
 - o Une perte d'expression conjointe des protéines MLH1 et PMS2
 - o Une perte d'expression conjointe des protéines MSH2 et MSH6
 - o Une perte d'expression isolée de la protéine MSH6
 - o Une perte d'expression isolée de la protéine PMS2
 - Une perte d'expression complexe (beaucoup plus rare)

Par ailleurs, l'expression des protéines MMR peut être parfois équivoque (douteuse ou indéterminée) ou non analysable (pour des problèmes pré-analytiques sur l'échantillon ou pour des problèmes techniques).

L'immunohistochimie a l'avantage de pouvoir être réalisée sur des prélèvements fixés et inclus en paraffine, le fixateur recommandé étant le formol à 10%. C'est une technique peu coûteuse et accessible en routine dans un laboratoire d'anatomopathologie. Elle a, de plus, l'avantage de pouvoir être réalisée sur des échantillons de petite taille ou pauvre en cellules tumorales.



Figure 5 : Illustrations d'examens immunohistochimiques des protéines MMR. En A : un CCR au profil d'expression normal des protéines MMR (pMMR-IHC) En B : un CCR au profil dMMR-IHC par perte conjointe de l'expression de MLH1 et PMS2. En C : un CCR au profil d-MMR-IHC par perte conjointe de l'expression de MSH2 et MSH6. En D : un CCR au profil dMMR-IHC par perte isolée de l'expression de MSH6.

2. Analyse en biologie moléculaire

a. Le test MSI-PCR

i. Aspects techniques

L'instabilité microsatellitaire se caractérise au niveau moléculaire par une modification de la taille des microsatellites, qui se traduit par l'apparition de nouveaux allèles dans l'ADN tumoral par rapport à l'ADN germinal : cela définit un **phénotype tumoral instable** (MSI).

On recherche l'instabilité microsatellitaire en biologie moléculaire par analyse de fragments après amplification en PCR de séquences microsatellitaires avec trois grandes étapes :

- 1. <u>Extraction de l'ADN tumoral</u> à partir de cellules tumorales présentes sur un tissu fixé en formol et inclus en paraffine (FFPE).
- 2. <u>Amplification de l'ADN tumoral en PCR multiplex</u> (*Polymerase Chain Reaction*) : après dénaturation des deux brins d'ADN, les régions microsatellitaires d'intérêt sont amplifiées de manière ciblée via l'utilisation d'une ADN polymérase et d'amorces spécifiques, dont une est marquée par un fluorochrome. Le milieu de la réaction renferme un couple d'amorce spécifique par région ciblée (ce qui définit le multiplexage), des nucléotides et du magnésium pour catalyser la réaction.
- 3. <u>Analyse de fragment après migration en électrophorèse capillaire</u>: les produits d'amplification sont injectés dans des capillaires dont les parois sont enduites d'un gel polymère. Sous l'effet d'un courant électrique, les fragments vont migrer du pôle (+) vers le pôle (-), sur une distance plus ou moins grande qui sera proportionnelle à la taille de leur séquence (exprimée en pb). Le signal fluorescent émis par le fluorochrome au cours de la migration est détecté par un système informatique, qui va le convertir en signal numérique.

Enfin, les résultats de l'analyse sont matérialisés sous la forme d'électrophorégrammes (un pour chaque microsatellite), représentant en abscisse la longueur en paire de bases (pb) et en ordonnée l'intensité du signal en unité internationale (UI). <u>FIGURE 6</u>

Le profil attendu d'une séquence microsatellitaire normale est un « profil en hérisson » avec un pic principal (à la longueur attendue de la séquence de l'amplicon du microsatellite) encadré de pics symétriques situés à +1 ou à -1 pb : ces pics sont liés au glissement de la polymérase pendant la PCR et sont appelés pics « échos ». A l'inverse, la présence d'une instabilité microsatellitaire aboutit à des allèles de tailles différentes de l'allèle normal et se traduit lors de l'analyse par un profil modifié avec un à plusieurs pics supplémentaires, se détachant clairement du pic principal. Les er-



reurs correspondant en grande majorité à des délétions, les séquences erronées sont souvent plus courtes que la séquence de référence, avec des pics décalés vers la gauche.

Figure 6 : Profils en PCR multiplex avec utilisation du panel Pentaplex. <u>En haut</u>, un profil tumoral MSS caractérisé par la présence d'un pic principal pour chaque microsatellite qui correspond à l'allèle normal (encadré <u>noir</u>) encadré de part et d'autre par plusieurs pics symétriques (pics « échos » liés au glissement de la polymérase lors de l'amplification). <u>En bas</u>, un profil MSI caractérisé par la survenue de pics surnuméraires en plus du pic principal, qui correspondent à des allèles aberrants (encadré <u>rouge</u>) de taille inférieure à celle de l'allèle normal.

ii. Panel de microsatellites

De nombreux microsatellites différents (répétitions mono-, di-, ou tri-nucléotidiques) ont été initialement testés dans le CCR, pour définir les microsatellites les plus sensibles et spécifiques d'une déficience MMR et le nombre de microsatellites qu'il est nécessaire d'analyser pour définir une instabilité microsatellitaire. (7) En 1997, le National Cancer Institute (NCI) a proposé à l'issue de la conférence de Bethesda un panel de 5 marqueurs incluant deux marqueurs mononucléotidiques (BAT25 et BAT26) et trois marqueurs dinucléotidiques (D5S346, D2S123 et D17S250), désigné comme **panel Bethesda ou NCI**. (4) La tumeur était considérée comme MSI-High (MSI-H) lorsqu'elle présentait au minimum 2 marqueurs instables comparativement à l'ADN normal et MSI-Low (MSI-L) ou MSS en cas d'instabilité touchant respectivement un seul ou aucun des 5 marqueurs. Après avoir constaté que les tumeurs colorectales MSI-L et MSS ne présentaient pas de différence significative sur le plan clinique, seules les tumeurs MSI-H ont été considérées comme MSI par la suite.

Ces critères ont été révisés en 2002 suite à la mise en évidence d'imperfections liées à l'utilisation de marqueurs dinucléotidiques (8) : en effet, ces marqueurs étant hautement polymorphes, leur utilisation nécessite une analyse comparative avec l'ADN normal correspondant, qui n'est pas toujours disponible. De plus, il s'avère que certaines tumeurs MSI par mutation du gène *MSH6* ne présentent pas ou peu d'altération des marqueurs dinucléotidiques. (9)

En réponse à cette problématique, un nouveau panel a vu le jour en 2002, constitué de 5 marqueurs parmi les 6 marqueurs mononucléotidiques quasi-monomorphes suivants (BAT-25, BAT-26, NR21, NR-22, NR24 et NR27) et donc désigné sous le nom de **panel « Pentaplex »**. La version commercialisée sous le nom de **Promega**® et très largement employée est constituée de BAT-25, BAT-26, NR21, NR24 et NR27. Le panel Pentaplex a montré de meilleures performances en termes de sensibilité et de spécificité comparativement au panel Bethesda. **(10)** Cette meilleure sensibilité s'explique par l'utilisation de marqueurs exclusivement mononucléotidiques. En effet, plus le motif répété au sein du microsatellite est court (motif de 1 nt versus 2 ou 3), plus le risque d'erreur de la polymérase lors de la réplication est grand et l'instabilité du microsatellite est évidente. L'autre avantage de ce panel réside dans le caractère quasimonomorphique des 5 marqueurs utilisés : cela signifie que leur taille est hautement conservée dans la population humaine et donc que le nombre de variants dans cette population est limité. On dit aussi que leur QMVR (*quasimonomorphic varia-tion range*) est étroit. Cette caractéristique permet ainsi de s'affranchir de la comparaison à l'ADN non tumoral.

Attention, cette affirmation ne s'applique que pour certains groupes de population, puisque certaines ethnies comme les Pigmés Biaka ou le peuple San présentent des taux élevés de polymorphismes au niveau de certains de ces microsatellites. (8,10–12)

Initialement, pour le panel Pentaplex, un seuil de 3 marqueurs instables a été établi pour déclarer une tumeur comme MSI. Il est néanmoins apparu par la suite que ce seuil, trop haut, risquait d'omettre certaines tumeurs avec un faible degré d'instabilité, comme les tumeurs endométriales : le seuil d'instabilité microsatellitaire a donc été abaissé dans un second temps à 2 marqueurs instables sur les 5 analysés dans le panel Pentaplex.

Il faut cependant garder à l'esprit qu'en présence de polymorphismes au niveau de ces microsatellites, l'interprétation du statut de la tumeur risque d'être erronée (11) : le seuil de 2 marqueurs instables est donc recommandé <u>à condition de disposer de tissu sain pour analyse comparative</u> (afin d'écarter la présence d'éventuels polymorphismes).

La capacité de détection de l'instabilité microsatellitaire est étroitement liée à la proportion de cellules tumorales présentes dans l'échantillon à analyser. Les rares études réalisées sur le sujet suggèrent qu'un minimum de 20% de cellules tumorales (voire 30% pour les cancers de l'endomètre) est nécessaire afin de considérer un test MSI-PCR comme interprétable. **(13–16)** Il serait de plus préférable d'utiliser des méthodes basées sur l'amplification de fragments de petite taille, afin de permettre l'analyse d'ADN de moins bonne qualité et de limiter le nombre de résultats non contributifs. **(17)**

La limite principale de ce panel est que ses performances varient drastiquement d'un type tumoral à un autre. En effet, hormis dans le cancer colorectal où il affiche d'excellentes performances, il se caractérise par une sensibilité moindre dans le cancer de l'endomètre (CE) (18) et dans les cancers des voies excrétrices supérieures (TVES). (19) Les données avec le panel Pentaplex sur les autres types tumoraux (grêle, voies biliaires, prostate...) sont très limitées, voire absentes.

b. <u>Technologie IdyllaTM</u>

A l'ère où le diagnostic d'instabilité microsatellitaire devient chaque jour plus central dans la prise en charge du patient, la technologie Idylla[™] (Biocartis®, Mechelen, Belgique) s'adresse aux laboratoires d'anatomopathologie (entre autres) ne disposant pas de plateforme de biologie moléculaire en leur donnant accès à une analyse simple et rapide du statut d'instabilité microsatellitaire en routine. Le test MSI Idylla[™] est un test *in vitro* entièrement automatisé, basé sur l'analyse d'un panel de 7 marqueurs monomorphes (ACVR2A, BTBD7, DIDO1, MRE11, RYR3, SEC31A et SULF2), différents des marqueurs habituellement utilisés pour le diagnostic de MSI. Le test dure 2h30 et intègre l'extraction de l'ADN à partir de coupes de tissu FPPE (également réalisable à partir d'ADN déjà extrait). **(20)** Il s'appuie sur l'amplification des cibles par PCR suivie d'une analyse de courbes de fusion en HRM (*High Resolution Melt*), aboutissant au calcul d'un score MSI. Ce score est individuel pour chaque marqueur et exprime la probabilité que le profil de l'échantillon en HRM soit wild-type (WT) ou muté. Au terme de l'analyse, le statut de l'échantillon est classé comme MSI-H ou MSS selon le nombre de marqueurs mutés. Le test est considéré comme valide si au moins 5 des 7 marqueurs sont analysables : dans le cas contraire, le statut de l'échantillon est rendu comme invalide.

Cette technique présente plusieurs avantages : un gain de temps dans le rendu du résultat, un temps technique minimal (2 min) et la non-nécessité d'une comparaison avec l'ADN non tumoral. La quantité d'ADN nécessaire pour le test Idylla[™] est plus importante que pour la PCR Pentaplex (50 mm² de surface tumorale versus 1 ng d'ADN) et semble donc moins adaptée aux prélèvements de petite taille. **(21,22)**

La plupart des études rapportent un taux de concordance entre le test Idylla[™] et la Pentaplex-PCR (système Promega®) autour de 98%, avec une sensibilité et une spécificité pouvant atteindre 100% selon les études. Cependant, ces études s'intéressent uniquement aux tumeurs colorectales. **(21–24)** En 2020, *Pécriaux et al.* ont évalué les performances du test Idylla[™] sur une série de tumeurs colorectales et non colorectales, avec une spécificité de 100% quel que soit le type de tumeur. La sensibilité du test variait de 75% (intestin grêle), 89% (endomètre) jusqu'à 100% dans les tumeurs du duodénum, pancréas, estomac, de l'ovaire et du tractus urinaire. **(25)**

c. <u>Séquençage haut débit (NGS)</u>

i. Aspects techniques

La mise au point de la méthode enzymatique Sanger en 1977 constitue l'avènement du séquençage de l'ADN. Sa méthode, basée sur l'utilisation de nucléotides terminateurs de chaîne, représente la première méthode de séquençage de l'ADN fiable et reproductible. **(26)** Cette technique est surpassée 10 ans plus tard par l'arrivée sur le marché des premiers séquenceurs automatisés basés sur l'électrophorèse capillaire. A l'époque ces instruments de « première génération » étaient considérés comme à haut débit en permettant un séquençage d'environ 80 kilobases (kb) par analyse. Ce n'est qu'en 1995 qu'est apparu le **séquençage « nouvelle génération » ou NGS** (*next-generation*

sequencing) avec une nouvelle approche : celle d'un séquençage clonal, « parallèle et massif » qui permet d'augmenter le débit du séquençage jusqu'à 1 gigabase (Gb) de données par analyse.

Il existe plusieurs technologies de NGS, dont deux principales, la technologie Ion Torrent[™] (Thermo Fisher Scientific), qui se base sur la détection d'ions hydrogènes libérés lors de la polymérisation de l'ADN ; et la technologie Illumina®, basée sur le **séquençage par synthèse** (SPS), qui constitue la méthode utilisée dans notre laboratoire. Son principe s'apparente au séquençage par électrophorèse capillaire, avec une ADN polymérase qui catalyse l'incorporation de dNTP dans un brin matrice d'ADN au cours des cycles séquentiels de la synthèse d'ADN. Ces dNTP sont marqués d'un fluorochrome (avec une couleur par type de nucléotides (nt)), ce qui permet à la fin de chaque cycle d'identifier le nucléotide incorporé par révélation de la fluorescence.

La nouveauté du NGS est qu'au lieu de séquencer un unique fragment d'ADN, ce processus de séquençage s'applique à des millions de fragments en même temps (d'où le terme de séquençage « parallèle et massif »).

On parle de séquençage « whole genome » (WG) lorsqu'il s'intéresse à l'intégralité du génome et de séquençage « whole exome » (WE) lorsqu'il ne cible que les séquences codantes (exons). En pratique de routine, on ne séquence qu'une liste définie de gènes (panel de gènes) : c'est le séquençage ciblé.



Le workflow d'une analyse en NGS comprend plusieurs étapes (illustrations² issues du site d'Illumina®) : <u>FIGURE 7</u>

<u>1^{ère} étape - La préparation des librairies</u> : la librairie constitue l'ensemble des fragments d'ADN que l'on veut séquencer. Il est nécessaire d'enrichir cette librairie en sélectionnant uniquement les fragments d'ADN désirés, par le biais d'une des deux méthodes suivantes :

- * Enrichissement par amplification (technique Amplicon) : l'ADN est fragmenté de façon aléatoire avant d'être rattaché en 5' et en 3' à des adaptateurs (indexes). Ces courtes séquences nucléotidiques ont une fonction d'identification et permettent de combiner l'analyse de plusieurs échantillons d'ADN au cours d'une même technique (multiplexage) et de contrôle d'identité tout au long de l'analyse. Ils font également fonction « d'amorce » et permettent à l'ADN polymérase d'amplifier les régions d'intérêts de façon ciblée. Après amplification, les fragments sont ensuite purifiés sur gel.
- * Enrichissement par Capture : après la fragmentation de l'ADN et la ligation des adapteurs, les fragments d'intérêt sont sélectionnés. Pour cela ils sont hybridés à des séquences complémentaires disposées sur une plaque ou en milieu liquide : les fragments d'ADN non sélectionnés ne s'hybrident pas et sont éliminés par lavage. <u>FIGURE 8</u>



² www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html

 2^{eme} étape - génération de cluster par amplification : la librairie est déposée sur une puce (flow cell), qui présente à sa surface des oligonucléotides (ou oligos) complémentaires aux adaptateurs et sur lesquels vont venir s'hybrider les fragments d'ADN. Chaque fragment est ensuite amplifié de façon clonale par amplification « en pont » : le fragment et ses copies identiques forment alors un cluster.

<u>3^{ème} étape - Séquençage par synthèse</u> : chaque fragment d'ADN du cluster va servir de brin matrice pour la synthèse d'un brin complémentaire par l'ADN polymérase. Ce dernier va se former de dNTP couplés à un fluorochrome avec une fonction « terminateur de chaîne » : un seul nucléotide peut être incorporé à la fois. Au terme de l'incorporation du nucléotide, une source lumineuse va exciter le fluorochrome, entraînant la libération d'un signal fluorescent ainsi que sa désintégration. Un nouveau cycle peut alors commencer avec incorporation du nucléotide suivant. Au début de chaque cycle, les quatre dNTP sont présents en quantité égale afin que la concurrence naturelle minimise le biais d'incorporation et le risque d'erreur.

A la fin de chaque cycle, le signal fluorescent est capturé sur une photographie. FIGURE 9



Figure 9 : Exemple de photo prise lors d'un cycle de séquençage © 2017 Illumina®, Inc.

Le séquenceur convertit ce signal de couleur en un signal informatique de nucléotide (A, T, C ou G) avec *in fine* l'obtention d'une séquence appelée « read » : la longueur du read est définie par défaut par le nombre de cycle de séquençage. Pour un fragment d'ADN sur la puce, deux reads seront générés : un read *sens* et un read *anti-sens*. Les informations sont collectées par le séquenceur au fur et à mesure du run.

 $4^{\text{ème}}$ étape - Analyse des données : pour rendre ces données analysables, elles vont être traitées par une série de logiciels formant un pipeline bio-informatique. <u>FIGURE 10</u>


Une étape préliminaire de *base calling* a lieu au sein du séquenceur juste après l'acquisition du signal et aboutit à la génération d'un fichier «.bcl » qui liste les séquences des reads avec un score de qualité. Le pipeline commence ensuite avec une étape de *démultiplexage* et de *trimming* qui consiste à réattribuer chaque read à chaque échantillon et à supprimer les séquences des adaptateurs : on obtient un fichier texte FASTQ qui détaille la séquence de chaque read avec un identifiant unique et un score de qualité.

Chaque read est ensuite aligné sur une séquence du génome de référence pendant la phase *d'alignement*. Ils sont ensuite triés (les reads *sens* sont séparés des reads *anti-sens*) et les duplicats (multiples versions d'un même read) sont supprimés, avec obtention d'un fichier SAM/BAM (pour *sequence/binary alignment map*). La comparaison des séquences du patient au génome de référence permet d'identifier et de lister les variants dans un fichier VCF. <u>FIGURE 11</u>

##FORM	AT= <id=< th=""><th>HQ,Number=2</th><th>2, Type</th><th>e=Intege</th><th>r,Des</th><th>criptio</th><th>n="Haplotype Quality"></th><th></th><th></th><th></th><th></th></id=<>	HQ,Number=2	2, Type	e=Intege	r,Des	criptio	n="Haplotype Quality">				
#CHROM	POS	ID	REF	ALT	QUAL	FILTER	INFO	FORMAT	Sample1	Sample2	Sample3
2	4370	rs6057	G	Α	29		NS=2;DP=13;AF=0.5;DB;H2	GT:GQ:DP:HQ	0 0:48:1:52,51	1 0:48:8:51,51	1/1:43:5:.
2	7330		T	A	3	q10	NS=5;DP=12;AF=0.017	GT:GQ:DP:HQ	0 0:46:3:58,50	0 1:3:5:65,3	0/0:41:3
2	110696	rs6055	Α	G,T	67	PASS	NS=2;DP=10;AF=0.333,0.667;AA=T;DB	GT:GQ:DP:HQ	1 2:21:6:23,27	2 1:2:0:18,2	2/2:35:4
2	130237		Т		47		NS=2;DP=16;AA=T	GT:GQ:DP:HQ	0 0:54:7:56,60	0 0:48:4:56,51	0/0:61:2
2	134567	microsat1	GTCT	G,GTACT	50	PASS	NS=2;DP=9;AA=G	GT:GQ:DP	0/1:35:4	0/2:17:2	1/1:40:3
hr1	457962	269		G	C						
chr1	457975	505		С	G						
chr1	457985	555		Т	C						

Figure 11 : Exemple d'un fichier VCF annoté (http://samtools.github.io/hts-specs/VCFv4.2.pdf)

Les variants recueillis pendant la phase de *variant calling* (insertions/délétions, *single nucleotide variant* (SNV) ou autres) sont à interpréter selon plusieurs paramètres essentiels :

- * <u>Le contrôle qualité (QC)</u> : proportion de séquences alignées dans les régions d'intérêts du génome que l'on a voulu séquencer (% de séquence *on target* et *off target*) ;
- * La profondeur de lecture : nombre de fois qu'un nucléotide est lu à une position donnée ;
- * <u>La couverture de lecture</u> : pourcentage de la région ciblée réellement séquencée à une profondeur donnée. <u>FIGURE 12</u>



La phase *d'annotation* consiste à fournir pour chaque variant des informations provenant de bases de données, comme le nom du gène, sa localisation, la fréquence du variant dans la population générale (bases de données GenomAD, ESP, COSMIC, ExAC...), sa pathogénicité connue (ClinVar) ou supposée (Polyphen, SIFT) etc... afin de faciliter son interprétation.

Les variants sont ensuite filtrés afin de ne garder que les variants d'intérêts.

L'étape finale est réalisée par un professionnel de biologie moléculaire (biologiste ou médecin), qui va classer les variants selon leur signification et rédiger un compte-rendu final. Selon les recommandations de l'Association Nationale des Praticiens de Génétique Moléculaire (ANPGM), *le compte-rendu de biologie moléculaire* doit renfermer certaines informations telles que la liste des gènes séquencés, la version du génome et la technique utilisée (capture, amplicon), le pipeline bio-informatique et les indicateurs de qualité du run (couverture, profondeur). (27)

Les variants sont listés et classés selon leur effet pathogène (pathogène, potentiellement pathogène, probablement pathogène ou de signification inconnue) et selon leur impact clinique (variant d'impact clinique connu, variant à discuter en RCP moléculaire ou variant de valeur prédictive inconnue).

ii. Application du NGS à l'instabilité microsatellitaire

Le NGS présente plusieurs avantages pour la recherche d'une instabilité microsatellitaire : il permet une analyse simultanée de multiples séquences microsatellitaires ou d'homopolymères (potentiellement plus informatifs que les cinq ou six microsatellites consensus de la Pentaplex), tout en permettant de réaliser simultanément l'analyse d'autres gènes d'intérêt dans les tumeurs (ex : *KRAS*, *BRAF*, ...). L'analyse MSI nécessite cependant un pipeline d'analyse dédié différent des pipelines d'analyse bio-informatique classiquement utilisés pour la détection d'altérations de type SNV et indel. Différents outils dédiés à l'évaluation du statut d'instabilité microsatellitaire (appelées « classifieurs ») ont été développés ces dernières années et peuvent être intégrés aux pipelines NGS déjà existants.

Le statut des séquences microsatellitaires dans une tumeur peut être évalué en analysant la répartition des reads selon leur longueur dans les régions microsatellitaires. Cette technique est utilisée par des classifieurs tels que mSINGS (28), MSIsensor (29,30), MANTIS (31) et d'autres (32,33). Le principe s'apparente à celui d'une analyse de fragments : une tumeur de statut MSS présente pour chaque microsatellite un ou deux allèles, ce qui se traduit en analyse NGS à des reads d'une ou deux longueurs différentes. A l'inverse, les microsatellites d'une tumeur de phénotype MSI présenteront des allèles aberrants : cela se traduira par des reads de longueur variée, préférentiellement plus petite que celle de l'allèle normal du microsatellite.

On distingue d'un côté les classifieurs comme MANTIS, qui nécessitent une analyse comparative de l'ADN tumoral avec de l'ADN normal pour classer le statut de l'échantillon, et d'un autre côté les classifieurs comme mSINGS et MSISensor (dernière version) qui utilisent le concept de « machine learning ». Ils fonctionnent en deux temps, avec une première phase « d'apprentissage » pendant laquelle leur est soumis une sélection d'échantillons au statut d'instabilité microsatellitaire connu. Ces données leur permettent de s'étalonner et servent dans un deuxième temps de base de données pour l'interprétation des échantillons en routine. Le classifieur attribue un statut MSS ou MSI à l'échantillon, qui est pondéré par un score de fiabilité obtenu après analyse statistique et exprimé en pourcentage.

La sensibilité et spécificité des classifieurs fluctuent selon le nombre de microsatellites analysés et selon leur type. De plus, les performances du classifieur sont intimement liées à la cohorte sur laquelle il a été développé et varieront donc selon le type de tumeur ciblée. **(31,32)** A ce jour, la méthode MSISensor fait référence outre-Atlantique puisqu'il s'agit de la méthode utilisée pour identifier une MSI dans le test FoundationOne®, test agréé depuis 2015 par la Food and Drug Administration (FDA) comme test de référence pour la prescription d'une immunothérapie d'une tumeur (quelle que soit la tumeur). **(34)**

Dans l'ensemble, ces logiciels présentent cependant plusieurs inconvénients : pas de gestion des données, pas de récupération des erreurs et pas d'interface d'analyse des résultats. Pour l'ensemble de ces raisons, l'équipe bio-informatique de notre laboratoire a développé en 2018 un outil informatique appelé « MIAmS », consacré spécifiquement à l'analyse de l'instabilité microsatellitaire en NGS par approche amplicon, sans comparaison avec l'ADN normal, basé sur une méthode de « machine learning ». Il fournit un score de prédiction du statut MSI de l'échantillon par le biais de l'utilisation de deux classifieurs différents, mSINGS et RandomForrest, ce qui permet de réduire significativement le taux de mauvaises prédictions. MIAmS propose en plus une interface d'analyse facile à utiliser. **(35)**

Les différentes techniques moléculaires de détection de l'instabilité microsatellitaire sont résumées en <u>FIGURE 13</u>.



Figure 13 : Techniques moléculaires de détection de l'instabilité microsatellitaire.

La figure (A) représente l'analyse en PCR Pentaplex avec une analyse de fragments.

La figure (B) représente l'analyse en HRM utilisée au sein de la technologie Idylla (Biocartis). La figure (C) représente l'analyse en NGS.

D. Etiologies d'une instabilité microsatellitaire

L'inactivation d'un des gènes du système MMR peut être d'origine acquise ou constitutionnelle.

1. Hyperméthylation du promoteur du gène MLH1

Dans les cancers colorectaux de phénotype dMMR, la première cause de perte de fonction du système MMR est sporadique et s'explique par une inactivation du gène *MLH1* par hyperméthylation de son promoteur. Cet événement épigénétique s'inscrit généralement dans un contexte génétique plus large d'hyperméthylation de l'ADN, dit phénotype hyperméthylateur ou CIMP (CpG Island Methylator Phenotype). (**36**) Les îlots CpG sont des régions riches en dinucléotides cytosine/guanine, qui se situent préférentiellement dans les zones régulatrices du génome, en particulier au niveau des promoteurs des gènes. Lorsque les cytosines de ces îlots sont méthylées en méthylcytosine, la transcription du gène concerné est inhibée.

Le phénotype tumoral CIMP est lié à la sénescence et est responsable d'environ 10-15% des cancers colorectaux et environ 30% des cancers de l'endomètre. **(37)** Dans les CCR, l'hyperméthylation du promoteur de *MLH1* est associé dans 40% des cas à une mutation somatique du gène *BRAF*. **(36)**

En résumé, devant un CCR ou un CE avec une instabilité microsatellitaire et une perte d'expression de MLH1 (et PMS2) en immunohistochimie, il faut rechercher une hyperméthylation du promoteur de *MLH1* avant d'évoquer une possible perte d'origine constitutionnelle liée au syndrome de Lynch.

2. Le syndrome de Lynch

a. Définition et caractéristiques génétiques

Le syndrome de Lynch (SL), anciennement nommé HNPCC (Human Non Polyposis Colorectal Cancer), est une affection héréditaire de transmission autosomique dominante à pénétrance incomplète. Les patients atteints de cette maladie sont porteurs d'une mutation germinale mono-allélique d'un des gènes MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* et *PMS1*) ou du gène *EPCAM* (situé en amont du promoteur de *MSH2* et responsable d'une inactivation épigénétique secondaire de *MSH2*). Une seconde mutation de l'allèle sauvage, par inactivation épigénétique/altération somatique/perte d'hétérozygotie au cours de la vie du patient aboutit à l'inactivation du gène MMR, et donc à l'initiation d'un processus de carcinogenèse par la voie dite de l'instabilité microsatellitaire MSI (modèle « two hits » de Knudson). (38)

Plusieurs centaines de mutations germinales des gènes MMR sont observées dans le SL, avec une prédominance de mutations faux-sens ou non-sens. Elles touchent dans la majorité des cas le gène *MLH1* (45% des mutations héréditaires retrouvées). Les gènes *MSH2*, *MSH6* et *PMS2* sont mutés dans respectivement 33%, 18% et 7% des cas. (39) L'ensemble de ces mutations est répertorié dans une base de données régulièrement mise à jour par le groupe InSIGHT (*International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumors*). (39)

b. Epidémiologie

Le syndrome de Lynch est responsable de 2-3% des cancers colorectaux et prédispose à un risque accru de développer des cancers extra-coliques, notamment des cancers de l'endomètre (5% liées au SL), des cancers des voies excrétrices urinaires supérieures et de l'intestin grêle (tumeurs du spectre étroit) et, à moindre degré, de l'ovaire, de l'estomac, des voies biliaires, des tumeurs sébacées cutanées et du pancréas (tumeurs du spectre large). **(40)**

Au-delà de 70 ans, le risque d'un individu atteint de SL d'être atteint d'un cancer du côlon est de 80%, 20-60% pour l'endomètre, 11-19% pour l'estomac et 9-11% pour l'ovaire (tous gènes MMR et sexes confondus). **(41)**

L'expression de ce syndrome est variable et est corrélée au gène MMR touché par la mutation germinale. En effet, les individus porteurs d'une mutation du gène *MLH1* ou *MSH2* présentent les risques de cancer les plus élevés et un spectre clinique du syndrome plus large. Il a également été rapporté que les patients porteurs d'une altération du gène *MSH2* seraient prédisposés de façon accrue aux cancers extra-coliques et extra-endométriaux. (42–44)

Il existe d'autres formes phénotypiques du SL comme le syndrome de Muir-Torre, décrit en 1981, associé à la survenue de tumeurs sébacés et d'autres tumeurs cutanées et le syndrome de Turcot associé à la survenue de glioblastomes. Le syndrome de Muir-Torre est principalement lié à des mutations de *MSH2* (40).

c. Diagnostic du syndrome de Lynch

Le diagnostic de SL repose sur l'identification d'une mutation constitutionnelle d'un gène MMR. Des critères cliniques, les critères d'Amsterdam II, ont été écrits en 1999 (45) afin d'identifier les patients suspects d'être atteints d'un SL, avec une bonne spécificité mais avec une sensibilité faible. En 2004, les critères de Bethesda ont été rédigés, plus sensibles, en prenant en compte à la fois l'histoire personnelle et familiale du patient et les caractéristiques cliniques et pathologiques caractéristiques des cancers associés au SL. (8) TABLEAU 1

Critères d'Amsterdam (tous les critères suivants)

- Cancer colorectal (Amsterdam1) ou du spectre étroit (Amsterdam 2) chez 3 apparentés au 1^{er} degré
- Sur 2 générations
- Un cas au moins avant 50 ans.

Critères de Bethesda (un critère parmi les suivants)

- Cancer colorectal avant 50 ans.
- 2 tumeurs du spectre large HNPCC synchrones ou métachrones chez un même patient quel que soit l'âge.
- Cancer colorectal avec histologie évocatrice, diagnostiqué avant 60 ans.
- 2 cancers du spectre large HNPCC chez 2 apparentés au 1° dont l'un à moins de 50 ans.
- 3 cancers du spectre large chez 3 apparentés au 1° ou 2° quel que soit l'âge.

<u>Tableau 1</u> : Critères diagnostiques de syndrome de Lynch.

L'ensemble de ces critères permettent d'identifier les patients qui ont une forte probabilité d'avoir une tumeur dMMR et pour lesquels une recherche du statut microsatellitaire est recommandée.

Si les tests somatiques réalisés confirment le phénotype tumoral dMMR, la suspicion de SL est confirmée et le patient est adressé en consultation d'oncogénétique. Après information du patient et recueil de son consentement, une analyse génétique est initiée à la recherche d'une mutation pathogène constitutionnelle afin de poser un diagnostic définitif de syndrome de Lynch. L'analyse génétique comporte la recherche des mutations « classiques » des 4 gènes MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* et *PMS2*), qui est complétée si besoin par la recherche de mutations plus complexes de type grandes délétions.

Les conclusions de l'analyse oncogénétique sont délivrées au patient lors d'une consultation d'oncogénétique dédiée, avec des explications sur l'implication du diagnostic et sur sa prise en charge à l'avenir (surveillance, traitement...). Le diagnostic d'un SL chez un cas index permet en moyenne de mettre en évidence la mutation chez 3 apparentés. **(46)**

3. Le syndrome CMMRD

Le syndrome CMMRD (*Constitutional Mismatch Repair Deficiency*) est un syndrome héréditaire prédisposant les enfants, adolescents et jeunes adultes aux cancers. Il est dû à une mutation bi allélique, homozygote ou hétérozygote composite des gènes MMR (soit *PMS2* ou *MSH6* et plus rarement *MLH1* ou *MSH2*). Les patients porteurs de ce syndrome développent des adénomes multiples et précoces du tube digestif et des cancers, des hémopathies et des tumeurs cérébrales. Ils peuvent également présenter des manifestations de la neurofibromatose de type 1 tels que des taches café au lait ou des neurofibromes.

4. Doubles mutations somatiques des gènes MMR

Des études ont montré qu'entre 2,5% et 3,9% des CCR présentent une déficience du système MMR d'origine inexpliquée. (47) Jusqu'à récemment, on pensait que ces patients étaient atteints d'un syndrome de Lynch causé par une mutation germinale non détectée, avec la création en 2013 du terme de syndrome « Lynch-like » (LLS).

Il a été rapporté depuis qu'une partie de ces tumeurs s'explique par une **double-mutation somatique** du système MMR. Le caractère bi allélique de la mutation n'est pas toujours prouvé mais fortement suspecté compte tenu du phénotype tumoral MSI-H et de la perte d'expression de la protéine en IHC. En 2013, une étude rapporte que 16,7% des CCR de phénotype MSI sont expliqués par des doubles mutations somatiques du système MMR. Dans 27,8% des cas, seulement une mutation somatique est mise en évidence, avec une perte d'hétérozygotie (LOH, *loss of heterozygosity*) comme probable second hit. **(48)** D'autres études plus récentes confirment que les LLS sont en grande partie expliqués par des doubles-mutations somatiques du système MMR **(49–51)** qui touchent en priorité les gènes *MLH1* et *MSH2*. **(52)** Les patients concernés présentent un cancer plus tardivement que les patients porteurs d'un syndrome de Lynch mais plus précocement que dans la population générale. La prévalence de tumeur synchrone ou métachrone dans ce groupe de patients est moins élevée que chez les patients porteurs d'un syndrome de Lynch. **(47)**

5. Etiologies secondaires d'instabilité microsatellitaire

Enfin, certains syndromes génétiques peuvent mimer un syndrome de Lynch et expliquer un phénotype tumoral MSI sans mutation germinale ni somatique des gènes MMR. Dans cette configuration, la déficience du système MMR est secondaire à l'atteinte d'autres gènes de la réparation de l'ADN. En effet, dans la polypose adénomateuse associée à *MUTYH* (MAP), le gène *MUTYH* (pour *Mut Y homolog*), qui code pour l'ADN glycosylase impliquée dans le mécanisme de réparation BER, est inactivé par le biais d'une mutation germinale bi allélique de transmission autosomique récessive. Cette inactivation est à l'origine de mutations somatiques secondaires (par transversions G>T) dans les gènes MMR, qui sont responsables du phénotype tumoral MSI. **(53–58)**

Des études rapportent également la survenue de tumeurs MSI chez les patients porteurs de mutations au niveau des ADN polymérases *POLE* ou *POLD1*. Ces mutations peuvent être d'origine somatique ou germinale et touchent le domaine exonucléasique des polymérases, ce qui compromet leurs capacités de relecture et de correction des erreurs de réplication, résultant en l'accumulation de multiples mutations spontanées. **(59,60)** Les patients avec mutation germinale d'un de ces gènes sont prédisposés aux adénomes colorectaux, aux CCR de survenue précoce et aux cancers de l'endomètre : c'est la polypose associée aux polymérases correctrices ou PPAP (*Proofreading Polymerase Associated Polyposis*). Dans ce contexte, l'atteinte des gènes MMR est secondaire au phénotype hypermutateur conféré par l'inactivation du domaine exonucléasique des polymérases. **(61)**

E. Indications de recherche du statut d'instabilité microsatellitaire

1. Intérêt diagnostique : dépistage du syndrome de Lynch

Comme mentionné précédemment, la suspicion clinique de syndrome de Lynch constitue une première indication de recherche du statut d'instabilité microsatellitaire : en effet, l'identification des syndromes de Lynch permet d'améliorer nettement le pronostic des patients et des apparentés. En effet les mesures intensives de dépistage et/ou de prévention proposées aux sujets atteints diminuent significativement la mortalité liée à ces cancers. Ces mesures reposent sur des coloscopies régulières à l'indigo-carmin, une surveillance gynécologique chez les femmes, une surveillance cytologique et échographique urinaire, voire des chirurgies prophylactiques.

En France jusqu'à présent, au-delà des contextes personnels et familiaux très évocateurs d'un SL (critères d'Amsterdam ou de Bethesda), la recherche du statut MMR tumoral était préconisée chez les patients de moins de 60 ans atteints d'un CCR, chez les patientes présentant un cancer de l'endomètre diagnostiqué avant 60 ans (l'examen pouvant se discuter entre 50 et 60 ans) et, au-delà de ces âges, chez les patients avec antécédents personnels ou familiaux (au premier degré) de CCR ou de cancer(s) du spectre du SL. **(62)** Cependant, compte-tenu de l'intérêt pronostique et thérapeutique du statut MMR dans certains cancers (*cf. chapitre suivant*) et de la fréquence de ces cancers dans le SL, il est maintenant recommandé de réaliser un dépistage « universel » (quel que soit l'âge et le contexte personnel ou familial) pour tous les patients porteurs d'un CCR, d'un cancer de l'endomètre, de l'intestin grêle, de l'estomac, des TVES et des tumeurs sébacées³.

Ces tests somatiques peuvent, en outre, être prescrits à des personnes avec un cancer du spectre du syndrome de Lynch autre que ceux cités ci-dessus, sur justification d'un contexte personnel et/ou familial évocateur d'un syndrome de Lynch.

2. Intérêt pronostique et réponse à la chimiothérapie

Plusieurs études ont montré que les CCR localisés (stade II et III) de phénotype dMMR ont un meilleur pronostic que les CCR pMMR. Par ailleurs, la littérature rapporte également une notion de ré-

³ « Recommandations pour la recherche du statut MMR tumoral », INCa, en cours de publication

sistance aux chimiothérapies à base de 5-fluoro-uracile (5-FU) en cas de tumeur colique de phénotype dMMR. Pour les cancers de stade II, la chimiothérapie adjuvante est indiquée uniquement pour les tumeurs avec haut risque de récidive : tumeur peu différenciée, présence d'emboles vasculaires ou d'engainements périnerveux, stade T4, < 12 ganglions analysés ou présence d'une occlusion /perforation. Compte tenu du bon pronostic des tumeurs dMMR, la réalisation d'une chimiothérapie adjuvante au stade II, et ses modalités de réalisation (5-FU seul, 5-FU associé à l'oxaliplatine ou pas de chimiothérapie) doit être discutée en fonction du statut microsatellitaire de la tumeur. À noter que les données relatives à la chimiosensibilité des CCR de phénotype dMMR ne concernent que les traitements par 5-FU seul et ne sont pas extrapolables aux associations du 5-FU avec d'autres agents cytotoxiques comme l'oxaliplatine. **(64–66)**

De même, dans les cancers œsogastriques non métastatiques, compte-tenu du bon pronostic des cancers dMMR, la recherche du statut MMR tumoral est recommandé pour déterminer la réalisation ou non et les modalités de la chimiothérapie adjuvante. **(63)**

3. Intérêt thérapeutique : indication de l'immunothérapie

Comme mentionné plus haut, la déficience du système MMR est responsable d'une charge mutationnelle élevée et par conséquent, de la formation de nombreux néo-antigènes susceptibles d'être reconnus par le système immunitaire du patient. Les cellules cancéreuses qui expriment PD-L1 à leur surface, ligand de PD-1, échappent à la détection des cellules immunitaires et à leur élimination. Le blocage de l'interaction entre PD-1 et PD-L1 permet de lever cette inhibition du système immunitaire et relance l'attaque contre les cellules cancéreuses. **(64)** Des études rapportent une corrélation entre le statut MSI-H de la tumeur et une expression majorée de PD-1/PD-L1, de même qu'il a été montré une corrélation avec une charge mutation élevée. **(65)**

Ces raisons expliquent que l'utilisation du pembrolizumab et du nivolumab chez les patients atteints de cancers MSI-H ait prouvé son efficacité. L'observation de réponses notables et durables chez ces patients a démontré leur utilité et a validé l'utilisation du statut MSI-H en tant que biomarqueur prédictif de la réponse à l'immunothérapie par inhibiteurs du système PD-1/PD-L1. (66–68) Par conséquent, la FDA a approuvé en 2017 l'indication d'une immunothérapie par pembrolizumab dans le traitement des cancers pédiatriques et de l'adulte métastatique avec un profil MSI-H, indépendamment du type de cancer et sans évaluation de PDL1 nécessaire. (69) . Il a également été rapporté une réponse majorée des patients atteints de cancers MSI-H à d'autres inhibiteurs de checkpoints immuns comme le durvalumab (anti PD-L1) et l'ipilimumab (anti-CTLA-4). (70–72) L'AMM pour la prescription de pembrolizumab pour les CCR métastatiques en 1^{er} ligne a été obtenue en Europe en Décembre 2020. Ce traitement n'est cependant toujours pas remboursé en France à ce jour.

L'ensemble de ces résultats font du statut MSI un troisième biomarqueur prédictif de la réponse aux inhibiteurs des checkpoints immuns, avec l'expression de PD-L1 et la charge mutationnelle. (73–79) La réponse à ces traitements peut être durable : il est donc devenu indispensable d'identifier un maximum de patients potentiellement répondeurs à ces thérapeutiques.

F. Le microsatellite HSP110 T17

1. Les protéines de choc thermique (HSP)

Le maintien de l'homéostasie cellulaire est essentiel pour le bon fonctionnement des cellules, qui sont continuellement soumises à différentes agressions menaçant leur intégrité. L'état de stress des cellules peut être provoqué par différents facteurs environnementaux (choc thermique, stress oxydatif, UV), par des agents chimiques (métaux lourds, alcool, agents oxydants, chimiothérapies anticancéreuses) ou par certaines conditions pathologiques (fièvre, état inflammatoire). Cet état de stress entraîne un phénomène de « réponse au choc thermique », caractérisé par une modification de l'expression de certains gènes et par l'expression de protéines de thermorésistance appelées « protéines de choc thermique » ou *heat shock proteins* (HSP).

Les HSP sont des protéines très conservées entre le procaryote et l'eucaryote et représentent 3% des protéines cellulaires. Leur expression est fortement induite en condition de stress, où elles jouent un rôle de chaperons moléculaires : par exemple, elles participent au maintien ou au rétablissement de la conformation de protéines dénaturées par des facteurs de stress. En cas d'échec, ces protéines



dénaturées sont redirigées vers le système ubiquitine/protéasome afin d'être dégradées. Les HSP peuvent également bloquer les voies de signalisation apoptotique et favoriser un signal de survie cellulaire. <u>FIGURE 14</u>

Ces protéines sont réparties en 6 familles en fonction de leur poids moléculaire : on retrouve les familles HSP110, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 et HSP27.

2. Relations entre HSP et cancer

On retrouve une surexpression des HSP dans de nombreux cancers, dont le cancer colorectal : cette surexpression est généralement associée à un mauvais pronostic pour le patient. **(80)** En effet, les HSP contribuent à la croissance tumorale en stabilisant les protéines et en promouvant l'angiogenèse. Elles sont également impliquées dans la formation de métastases puisqu'elles favorisent l'activation de métalloprotéinases, protéines protéolytiques responsables de la dégradation et du remodelage de la matrice extracellulaire et du caractère invasif de la tumeur. Enfin, les HSP sécrétées par les cellules tumorales ont un rôle immunosuppresseur en inhibant l'activation des lymphocytes T.

3. La protéine HSP110

La protéine HSP110 appartient à la famille des HSP de très haut poids moléculaire.

Elle est surexprimée dans de nombreux cancers comme le mélanome ou le cancer colorectal, où elle est associée à un mauvais pronostic. **(81,82)** Elle contribue à la résistance aux chimiothérapies anticancéreuses par ses propriétés anti-agrégations et anti-apoptotiques. Il a été montré que les cancers colorectaux de phénotype MSI exprimant faiblement HSP110 présentent une meilleure réponse à la chimiothérapie. **(83,84)**

L'équipe de recherche du Pr Alex Duval a mis en évidence au niveau d'HSP110 une mutation récurrente dans les tumeurs colorectales de phénotype MSI, localisée au niveau d'une séquence répétée T17 dans l'intron 8. Cette mutation se présente sous la forme d'une délétion de 1 à 7 pb et est responsable de la création d'un site d'épissage alternatif et d'un saut de l'exon 9 : il en résulte la production d'une protéine HSP110 tronquée nommée HSP110 Δ E9. La présence de cette mutation dans les tumeurs MSI semble associée à un meilleur pronostic et à une sensibilité accrue au 5-FU. (83,85) L'étude de *Kim et al.* publiée en 2014 retrouvait des données similaires. (84)

4. HSP110 T17 marqueur de l'instabilité microsatellitaire

a. Présentation et intérêt

En 2016, l'équipe d'Alex Duval a publié l'utilisation de la mutation du microsatellite intronique T17 en tant que marqueur du phénotype MSI. **(86)** En effet, le microsatellite T17 (appelé HT17) apparaît comme remarquablement monomorphe avec seulement deux allèles (T16 et T17) retrouvés dans la population générale. Ils le décrivent également comme plus sensible et plus spécifique dans le diagnostic d'instabilité microsatellitaire que les panels de microsatellites utilisés jusque-là (PCR Pentaplex). Pour finir, son caractère monomorphique le rend simple à lire et simplifierait l'étude de l'instabilité microsatellitaire en pratique de routine.

b. Etat des lieux de la littérature

L'étude de *Buhard et al* met en évidence une supériorité du microsatellite HT17 vis-à-vis du panel Pentaplex dans la détection de l'instabilité microsatellitaire, avec une meilleure sensibilité (98,4% vs 95,1%) pour une spécificité équivalente (99,7%). Ces résultats ont été confirmés par d'autres études **(83,85,87,88)** et offrent une nouvelle approche, plus simple, de l'étude d'instabilité microsatellitaire en biologie moléculaire. Il semblerait de plus que l'instabilité du microsatellite HT17 ait une valeur prédictive de la réponse à la chimiothérapie **(83,85)**, rendant son analyse d'autant plus intéressante pour le patient.

Ces études présentent néanmoins une limite non négligeable en ne s'intéressant qu'aux tumeurs colorectales. Or la recherche d'instabilité microsatellitaire est aussi indiquée pour d'autres types de tumeurs appartenant au spectre du SL. Lorsqu'elle est recherchée, on s'aperçoit que le profil MSI s'exprime différemment selon le type de tumeur et à des fréquences différentes. (33) Par exemple, plusieurs études rapportent que l'instabilité microsatellitaire dans les tumeurs endométriales touche des locus différents du cancer colorectal et se traduit par des délétions plus courtes, de 1 à 2 nt, plus difficiles à mettre en évidence en techniques classiques de biologie moléculaire. (18,89) Il apparaît donc nécessaire de s'intéresser à des cohortes de tumeurs plus variées avant de valider de nouvelles techniques ou de nouveaux panels.

A ce jour, seule une étude s'est intéressée au comportement du microsatellite HT17 dans des tumeurs non colorectales. Cette étude coréenne, publiée en 2017, a étudié la prévalence de l'instabilité du microsatellite HT17 dans une cohorte de cancers gastriques MSI-H : elle ne retrouve une instabilité d'HT17 que dans 46,9% des tumeurs gastriques analysées. Ces tumeurs présentaient un phénotype dMMR-IHC en immunohistochimie. **(90)**

Aucune étude à l'heure actuelle ne s'est intéressée au comportement d'HT17 dans le cancer de l'endomètre.

II. <u>OBJECTIFS</u>

Actuellement dans notre laboratoire de l'IUCT-Oncopole, le diagnostic de déficience MMR repose sur l'étude immunohistochimique des 4 protéines MMR et sur la biologie moléculaire avec la PCR Pentaplex. Cependant le diagnostic de MSI avec la Pentaplex-PCR peut être difficile dans certains cas, notamment pour certains types tumoraux. Nous avons donc voulu tester les performances du marqueur HT17 afin d'évaluer dans quelle mesure l'utilisation de celui-ci pourrait simplifier et/ou améliorer le diagnostic moléculaire d'instabilité microsatellitaire en pratique de routine.

D'autre part, selon les recommandations actuelles de prise en charge des patients, il est également recommandé de rechercher d'autres marqueurs moléculaires à visée thérapeutique pour les CCR métastatiques (mutations *RAS*, *BRAF*) et pour les cancers de l'endomètre au diagnostic (mutations *POLE* et *POLD1*). La recherche de ces mutations est maintenant réalisée dans notre laboratoire par technique NGS avec un panel ciblé de gènes, alors que la recherche de MSI est effectuée par Pentaplex-PCR : cela rajoute donc un temps technique et un coût non négligeables pour la plateforme de biologie moléculaire du laboratoire.

C'est donc dans le but de combiner la recherche de l'instabilité microsatellitaire au séquençage d'un panel ciblé de gènes que nous avons voulu transposer l'étude des microsatellites du panel Pentaplex (et par la même occasion, d'HT17) en technique NGS.

Les objectifs primaires de ce travail étaient donc :

- D'évaluer la performance du marqueur HT17 dans le diagnostic d'instabilité microsatellitaire vis-à-vis du panel référence de 5 marqueurs (Pentaplex) en technique standard (PCR) dans une cohorte de tumeurs de phénotype MSI d'origine variée
- D'évaluer la conformité de la technique NGS avec la technique standard (Pentaplex-PCR) dans une cohorte de tumeurs de phénotype MSI d'origine variée

Ce travail comportait également plusieurs objectifs secondaires :

- 1. Evaluer la faisabilité et l'applicabilité de l'analyse du marqueur HT17 en technique PCR en routine au sein du laboratoire
- 2. Evaluer la sensibilité des marqueurs microsatellitaires analysés (dont HT17) dans le diagnostic d'instabilité microsatellitaire en technique NGS
- 3. Evaluer les performances des différents panels employés (panel Pentaplex et panel Hexaplex) en technique NGS en fonction du type tumoral

III. MATERIELS ET METHODES

A. Population d'étude

Nous avons réalisé ce travail à partir d'une cohorte rétrospective de 138 ADNs tumoraux provenant de tumeurs variées classées MSI (MSI-H ou MSI-L) en biologie moléculaire entre 2016 et 2017 (cohorte d'intérêt), dans le cadre du diagnostic de routine de MSI de notre laboratoire (plateforme de génétique des tumeurs de Midi-Pyrénées).

Une seconde cohorte « contrôle » composée de 54 ADNs non tumoraux extraits à partir de muqueuse colique ou utérine saines, a été constituée au moment de l'étude dans le but d'étudier le profil basal du marqueur HSP110 T17 en PCR.

B. Recueil de données cliniques et anatomopathologiques

Les données cliniques ont été recueillies de façon rétrospective à partir du dossier médical informatisé du CHU de Toulouse (Orbis), et de l'IUCT-Oncopole (DPI) et des données médicales du dossier communiquant de cancérologie (DCC) géré par le Réseau Régional de Cancérologie d'Occitanie (Onco-Occitanie).

Les données anatomopathologiques et de biologie moléculaire ont été recueillies à partir des comptes rendus informatisés anatomopathologiques et d'analyse moléculaire du logiciel Diamic. Pour les cas extérieurs transmis pour analyse moléculaire à l'IUCT-Oncopole (mais provenant de laboratoires hors-CHU/IUCT) dans le cadre de la plateforme de génétique des tumeurs de Midi-Pyrénées, les données des courriers et des comptes rendus anatomopathologiques transmis avec le matériel ont été également exploitées.

Les données recueillies s'articulaient autour de 5 catégories :

- * Données cliniques :
 - Générales : date de naissance, sexe, date du diagnostic et âge au diagnostic ;
 - **Stade tumoral** : stade pT, stade pN, stade M avec le type de métastase (synchrone ou métachrone), stade TNM au diagnostic ;
 - Traitements : administration d'une chimiothérapie néoadjuvante, administration d'une immunothérapie par inhibiteurs de checkpoints immuns (si oui : durée du traitement et réponse au traitement);
 - <u>Données anatomopathologiques</u> : type de prélèvement (pièce opératoire, biopsie), site du prélèvement (cancer primitif ou métastase) et type tumoral ;

- * <u>Statut MMR</u> :
 - Immunohistochimie (MMR-IHC) : expression des protéines MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2 (maintien, perte, équivoque, non interprétable); statut MMR-IHC (pMMR-IHC, dMMR-IHC, non interprétable, non fait)
 - Biologie moléculaire (Pentaplex-PCR) : statut des microsatellites BAT25, BAT26, NR21, NR22 et NR24 (MSS ou MSI, polymorphisme), statut Pentaplex-PCR (MSS, MSI-L, MSI-H, non interprétable)
- <u>Autres données moléculaires somatiques</u>: recherche d'hyperméthylation du promoteur de *MLH1* (si oui, absence ou présence), statut mutationnel *BRAF* (non recherché, muté, non muté);
- * <u>Données oncogénétiques</u> : réalisation d'une consultation d'oncogénétique, analyse constitutionnelle des gènes MMR, gène MMR muté et diagnostic final (cancer sporadique, syndrome de Lynch, syndrome Lynch-like).

C. Détermination du statut d'instabilité microsatellitaire en techniques de référence

1. Analyse immunohistochimique

L'évaluation du statut MMR par l'étude en immunohistochimie (MMR-IHC) a été réalisée au moment du diagnostic sur des coupes de tissu FFPE issues du bloc sélectionné par le pathologiste ou du bloc transmis par le laboratoire d'anatomopathologie extérieur avec les anticorps suivants : l'anticorps anti-MLH1 (clone ES05 Agilent), anti-PMS2 (clone EP51 Agilent), anti-MSH2 (clone FE11 Agilent) ou anti-MSH6 (clone EP49 Agilent), sur un automate d'immunohistochimie (automate Dako Omnis, Agilent Technologies®).

Depuis février 2008, l'étude immunohistochimique comprend de façon systématique les quatre protéines du système MMR. Le laboratoire répond chaque année au contrôle qualité de ces immunomarquages (AFAQAP) depuis leur mise en place.

Les cellules normales (cellules du stroma, cellules inflammatoires, cellules endothéliales etc.) servent de témoins internes de la technique IHC.

Pour chaque protéine, le marquage pouvait être le suivant :

* <u>Marquage normal</u> : marquage nucléaire intense et diffus des 4 protéines MMR dans les cellules tumorales.

- * <u>Perte d'expression</u> : perte d'expression complète et diffuse dans la tumeur avec un maintien d'expression dans les cellules normales.
- * <u>Marquage non interprétable</u> : absence de marquage des cellules tumorales et des cellules du stroma.
- * <u>Marquage équivoque</u> (indéterminé ou douteux)

Le statut global de l'échantillon était classé pMMR-IHC en cas de maintien d'expression des 4 protéines MMR et dMMR-IHC en cas de perte d'expression d'une ou plusieurs protéines MMR ou non évaluable en IHC.

2. Analyse moléculaire en PCR (Pentaplex-PCR)

L'évaluation du statut MMR en biologie moléculaire par Pentaplex-PCR est une analyse moléculaire réalisée en routine dont l'ensemble des étapes (extraction d'ADN, amplification PCR et interprétation des résultats) se déroule au sein de notre laboratoire. Elle a été réalisée au moment de l'évaluation du statut MMR dans la filière sanitaire pour les 138 échantillons tumoraux de la cohorte d'intérêt alors que les 54 échantillons non tumoraux de la cohorte de contrôle ont été sélectionnés et analysés pour cette étude.

a. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN est réalisée à partir de tissu tumoral FFPE après sélection d'une zone la plus riche en cellules tumorales viables par le pathologiste en cerclant sur la lame HE la zone d'intérêt (« macrodissection ») afin de maximiser la concentration de l'échantillon d'ADN en ADN tumoral. Il est admis qu'un seuil minimal de 20% de cellularité tumorale est nécessaire pour réaliser une recherche de MSI avec la technique Pentaplex-PCR.

Les blocs ayant servis à l'extraction des 54 échantillons d'ADNs non tumoraux ont été sélectionnés au moment de l'étude : il s'agissait de blocs FFPE de muqueuse colique ou utérine saine, issus de pièces opératoires traitées dans notre laboratoire.

De manière générale, l'extraction d'ADN est réalisée à partir d'un kit d'extraction MaxWell® PROMEGA en utilisant une technique d'extraction sur bille magnétique, permettant d'obtenir un échantillon d'ADN en suspension en milieu liquide. La concentration en ADN de l'échantillon est ensuite mesurée en ng/ μ L avec un fluoromètre Qubit (Thermo Fisher) avant d'être ramené à une concentration standard de 25 ng/ μ L.

b. Protocole de la PCR

Il s'agit d'un protocole « maison » développé et utilisé en routine au sein de notre laboratoire. La première étape consiste à réunir dans un même tube les éléments principaux nécessaires à la réalisation d'une PCR multiplex, que sont l'ADN du patient, le mix d'amorces (avec les 5 couples d'amorces *forward* et *reverse*), l'ADN polymérase (Taq GOLD) et les dinucléotides. Les séquences des amorces sont détaillées en ANNEXE 1.

Chaque ADN est amplifié en duplicat sur une plaque PCR en présence d'un témoin positif (T-MSI) et d'un témoin négatif (NTC), dans un thermocycleur Verity (Applied Biosystem®).

Au terme de la PCR, les produits d'amplification sont déposés dans le séquenceur capillaire Beckman CEQ Genetic Analysis System 8800 (Beckman-Coulter®) pour migration en électrophorèse capillaire. Les signaux obtenus sont enfin étudiés en analyse de fragments à l'aide du logiciel GenomeLab[™] GeXP Genetic Analysis System version 10.2 (Beckman-Coulter ®).

c. Analyse des résultats

A l'issue de l'électrophorèse capillaire, les signaux de fluorescence sont captés et matérialisés sous la forme d'un électrophorégramme.

Pour chaque échantillon, le pathologiste a analysé individuellement 5 électrophorégrammes (un par microsatellite) afin d'établir le statut PCR de l'échantillon selon les indications suivantes :

- * Statut MSS si aucun marqueur instable sur les 5 marqueurs analysés
- <u>Statut MSI-L</u> si 1 marqueur instable sur les 5 analysés, après avoir éliminé un potentiel polymorphisme en comparant l'ADN tumoral à l'ADN normal du patient
- * <u>Statut MSI-H</u> à partir de 2 marqueurs instables

En cas d'interprétation difficile du statut Pentaplex-PCR ou en cas de statut MSI-L, une analyse comparative avec de l'ADN issu de tissu normal a été réalisée (à condition d'avoir accès à du tissu non tumoral pour ce patient). Chaque échantillon a été analysé en duplicat.

Au terme de l'analyse, les résultats ont été transcrits dans un compte-rendu de biologie moléculaire et transmis au prescripteur.

D. PCR HSP110 T17

Pour mettre au point le protocole de la PCR HSP110 T17 (HT17) et l'algorithme d'interprétation du profil du marqueur, nous nous sommes basés sur la méthode décrite dans l'article publié en 2016 par *Buhard et al.* (86)

1. Méthode décrite par Buhard et al (2016)

L'étude en question avait pour objectif d'évaluer si l'analyse du microsatellite T17 permettait d'améliorer et de simplifier le diagnostic de phénotype MSI dans le cancer du côlon.

a. Etude d'HT17 sur ADN germinal

La première partie de leur étude consistait à déterminer le profil basal du marqueur HT17 en population générale. Pour cela ils ont réalisé une analyse préliminaire de 1037 échantillons d'ADN germinal issus du panel du Human Genome Diversity Project (HGDP) et du Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (CEPH).



Les trois diagrammes du bas représentent, pour chaque microsatellite : B) l'amplitude de l'effet glissement de la polymérase ; C) le QMVR et D) la distance en pb entre le QMVR et les variants alléliques situés en dehors de ce QMVR.

La gamme allélique d'HT17 (QMVR) établie sur ces 1037 échantillons était très étroite, avec seulement trois allèles différents : T16 (27,8%), T17 (72,1%) et T18 (0,1%), dont les tailles respectives étaient de 145, 146 et 147 pb. Ces trois allèles s'articulaient autour de trois profils canoniques :

- * Le profil homozygote T17/T17 (57,6%),
- * Le profil hétérozygote T16/T17 (29,4%)
- * Le profil homozygote T16/T16 (13%)

La <u>FIGURE 15</u> et l'<u>ANNEXE 2</u> comparent le QMVR des marqueurs du panel Pentaplex et d'HT17. Au final, le QMVR d'HT17 était beaucoup plus étroit que ceux des microsatellites du panel Pentaplex et contrairement à eux, HT17 ne présentait aucun allèle en dehors de son QMVR.

Le profil d'HT17 en PCR était très net, avec un ou deux pics principaux en regard de T16 et/ou T17 et deux pics échos situés à -1 pb (T15) et -2 pb (T14).

Il était nécessaire de pouvoir distinguer ces pics échos de véritables allèles aberrants, plus courts de -1 ou -2 pb. Pour cela, ils ont quantifié la hauteur de ces pics échos dans la population générale en mesurant des ratios de hauteur de pics entre les allèles T14 et T16 (ratio R1) et entre les allèles T15 et T16 (ratio R2) sur les 1037 échantillons d'ADN germinal. Ils ont ensuite déterminé la hauteur « normale » maximale de ces pics échos à partir de la valeur maximale de ces ratios (R1 : **0,15** et R2 : **0,5**) afin de s'en servir comme seuil décisionnel dans la population tumorale et différencier les pics échos (R1 et R2 \leq seuils) des allèles aberrants (R1 et/ou R2 > seuils).

b. Etude d'HT17 sur ADN tumoral

Ils ont ensuite étudié le comportement de HT17 en PCR sur une cohorte de 685 ADNs extraits de tumeurs colorectales. Le statut d'instabilité microsatellitaire en Pentaplex-PCR avait été établi anté-rieurement au moment du diagnostic.

Pour l'interprétation du statut d'HT17, ils se sont basés sur une analyse en deux phases avec une première interprétation visuelle de la répartition des allèles en analyse de fragments et dans un second temps le calcul des ratios de hauteur de pics R1 et R2. Les échantillons étaient alors classés de la façon suivante :

1. Analyse du profil visuel de l'échantillon :

Profil visuel altéré (avec l'apparition d'allèles aberrants) : classé **MSI** Profil visuel non modifié : calcul des ratios R1 et R2

\downarrow

2. Calcul des ratios de hauteur de pics R1 et R2 :

Ratios R1 et R2 inférieurs aux seuils respectifs de 0,15 et 0,5 : classé MSS Ratios R1 et/ou R2 supérieur(s) aux seuils respectifs de 0,15 et 0,5 : classé MSI-R

L'algorithme d'interprétation est résumé par la FIGURE 16.



MSI : instabilité microsatellitaire définie sur la visualisation du profil ; MSI-R = instabilité microsatellitaire définie sur le calcul des ratios ; MSS = stabilité microsatellitaire (profil visuel non altéré et ratios R1 et R2 inférieurs aux seuils).

2. Implémentation de la PCR HSP110 T17 dans notre laboratoire

Les séquences des amorces HT17 utilisées par *Buhard* et son équipe n'étaient pas décrites et le séquenceur capillaire utilisé n'était pas le même que celui de notre laboratoire. Pour ces raisons, nous avons dû mettre au point dans notre laboratoire un protocole de PCR « maison » spécifiquement dédié à l'analyse d'HT17 (PCR simplex), nécessitant : i) le design d'un couple d'amorces spécifiques ; ii) la détermination des paramètres d'hybridation en PCR adaptés à ce couple d'amorces ; iii) l'utilisation d'une polymérase avec activité de relecture afin de limiter les artefacts de glissement et l'apparition de pics surnuméraires (pics échos) potentiellement confondables avec des allèles aberrants ; iiii) l'optimisation du signal de fluorescence (détectable mais non saturé) afin de pouvoir déterminer de façon fiable les ratios R1 et R2.

Les amorces *forward* et *reverse* ont été manuellement conçues à partir d'un logiciel en prenant la version hg19 comme version référence du génome humain.

Pour définir les paramètres d'hybridation de la PCR, nous avons réalisé plusieurs tests en série à partir d'un échantillon témoin, en faisant varier la température d'hybridation (entre 55°C et 75°C puis entre 50°C et 55°C) et la durée d'hybridation (5 sec puis 15 sec).

Pour optimiser l'intensité du signal et éviter toute saturation, nous avons réalisé de la même manière des tests en série faisant varier le volume de mix, la quantité d'ADN ainsi que le nombre de cycles d'amplification.

Une fois que les conditions de PCR optimales ont été déterminées, l'ensemble des échantillons d'ADN normaux et tumoraux ont été amplifiés en PCR HT17 sur thermocycleur Veriti (Applied Biosystem®).

3. Application sur les deux cohortes de l'étude

a. Analyse de la cohorte contrôle

Comme *Buhard et al*, nous avons commencé par analyser les 54 échantillons d'ADN sains de la cohorte de contrôle afin de caractériser le profil basal d'HT17 avec les amorces et les conditions de PCR employées dans notre laboratoire. Chaque échantillon a été analysé par deux pathologistes (AV et JS) dans le but de récolter les informations suivantes :

- * Gamme allélique d'HT17 : nombre d'allèles normaux, identification de T16 et T17
- * Type de profil retrouvé : homozygote, hétérozygote.

Le but de cette analyse était également de se familiariser avec l'allure visuelle du profil basal d'HT17 et de déterminer la valeur maximale des ratios R1 et R2 qui serviront de seuils pour l'analyse des échantillons de la cohorte d'intérêt.

b. Analyse de la cohorte d'intérêt

La deuxième étape était d'analyser le profil des échantillons d'ADN tumoraux de la cohorte d'intérêt. Chaque échantillon a été analysé par deux pathologistes en suivant la méthode d'interprétation décrite par *Buhard et al*, avec une première interprétation visuelle du profil visant à séparer les échantillons au profil altéré univoque (classés MSI) des échantillons au profil peu modifié nécessitant une deuxième phase de mesures des ratios R1 et R2. Les échantillons avec une valeur de R1 et/ou R2 au-delà du seuil déterminé sur la cohorte contrôle étaient classés MSI-R et ceux avec des valeurs R1 et R2 sous ce seuil étaient classés MSS.

E. Recherche de l'instabilité microsatellitaire en NGS

1. Qualification d'un échantillon pour une analyse NGS

L'analyse NGS sur tissu FFPE a été implémentée dans notre laboratoire en 2015. Elle est depuis utilisée en routine à visée théranostique ou pronostique.

Une analyse NGS nécessite une quantité minimale de 20 ng d'ADN par échantillon et un ADN de bonne qualité. Pour évaluer la qualité de l'ADN et la quantité présente dans un échantillon donné, et déterminer si celles-ci sont suffisantes pour l'analyse NGS, l'ingénieur de notre laboratoire (David Grand) a développé une technique de PCR quantitative (ou qPCR) basée sur la technologie SYBR[™] (Applied Biosystems[™]). Cette technique permet de quantifier en temps réel un signal de fluorescence au fil des cycles d'amplification dans le but de déterminer, pour chaque échantillon d'ADN, le nombre de cycle de PCR nécessaire pour atteindre un seuil prédéfini de fluorescence (appelé Ct pour « threshold cycle »). La séquence amplifiée au cours de cette PCR est une séquence de 149 pb (appelée ici FTH1), située au niveau d'un « gène de ménage » (gène présent de façon ubiquitaire chez les individus et non soumis au polymorphisme). Un Ct élevé témoigne d'un ADN fragmenté et donc d'une qualité moindre.

Les résultats de la qPCR permettent ainsi de déterminer, en fonction du Ct mesuré et de la concentration initiale de l'échantillon d'ADN (en ng/ μ L), les paramètres de dilution permettant d'obtenir une quantité de 20 ng d'ADN dans un volume total de 23 μ L nécessaire au séquençage NGS.

Si nous disposions d'assez d'ADN dans l'échantillon pour l'analyse NGS, alors l'échantillon était qualifié pour le NGS. Dans le cas contraire, celui-ci était écarté de l'analyse.

2. Technique NGS utilisée dans le laboratoire

Au moment où nous avons débuté ce travail, la technique NGS employée en routine dans le laboratoire était celle du séquençage par synthèse développée par Illumina® sur un séquenceur MiSeq DX Illumina®. Il s'agissait d'un séquençage par technique amplicon, à partir de kits de préparation des librairies Truseq Custom Amplicon commercialisées par Illumina, à partir d'un panel customisé pour les besoins de notre laboratoire. Ce panel était constitué de 35 gènes d'intérêt théranostiques recommandés par l'INCa (**panel INCa-V2**), auxquels nous avons rajouté 7 cibles microsatellitaires : BAT25, BAT26, NR21, NR24, NR22, NR27 et HT17. <u>ANNEXE 3</u>

Nous avons fait ce choix dans le but de nous permettre d'analyser en une même analyse NGS, à la fois les marqueurs théranostiques classiques (mutations *KRAS*, *NRAS* et *BRAF*) et l'instabilité microsatellitaire.

Pour notre travail nous avons utilisé une flow cell MiSeq V3, qui nous a permis de séquencer jusqu'à 21 échantillons par run NGS.

L'analyse des mutations (SNV) avec le panel INCa-V2 nécessite l'utilisation d'un pipeline d'analyse spécifique, qui comporte les logiciels suivants :

- * Acquisition des données de séquençage : MiSeq Control software version v2.5.0.5
- * Démultiplexage et base calling : MiSeq Reporter version 2.6.2
- * Annotation et variant calling : Amplicon DS v.1.1.13.0 et ADIVaR v1.3.0

Les cibles ont été analysées via la version hg19 du génome de référence, avec un seuil de détection des variants de 3% de fréquence allélique pour une profondeur minimale de 300 reads. Nous avons mis au point un pipeline d'analyse spécifique pour la recherche d'instabilité microsatel-

litaire, que nous allons détailler juste après.

3. Analyse de l'instabilité microsatellitaire en NGS

En plus du pipeline d'analyse NGS pour l'analyse des variants du panel INCa-V2, l'ingénieur bioinformatique de notre laboratoire (Frédéric Escudié) a développé un pipeline bio-informatique spécifique à l'analyse des séquences microsatellitaires : le logiciel MIAmS.

a. Logiciel MIAmS : concept général

La méthode employée par le logiciel MIAmS a été publiée en 2019 en vue de sa mise en place dans le laboratoire. **(35)** Le logiciel utilise le concept du « *machine learning* » (ou *apprentissage machine*) afin de prédire le statut d'instabilité microsatellitaire, par le biais de 2 phases :

- Une phase d'apprentissage (« MIAmS_learn »), dont le but est de créer, pour chaque cible microsatellitaire (ou locus), un modèle de répartition des longueurs de reads correspondant à un profil MSS et à un profil MSI. Cette étape d'apprentissage nécessite un minimum de profondeur d'analyse (variable selon le locus⁴) et s'appuie sur un fichier annoté « référence », qui liste le statut de chaque locus pour les échantillons utilisés pour l'apprentissage. Cela permet aux classifieurs que MIAmS utilise (mSINGS et RandomForrest) d'étiqueter automatiquement les données utilisées pour cette phase d'apprentissage. En effet, chacun des classifieurs va établir à partir de ces données et d'une manière qui lui est spécifique, un algorithme permettant de départager les échantillons MSS des échantillons MSI :
 - Par exemple, mSINGS s'appuie sur l'aspect général du profil de taille des répétitions pour les échantillons MSS. Le profil s'apparente à une courbe de Gausse (avec un pic central).

⁴ **Profondeur minimale non atteinte pour NR24**, ce qui explique que le marqueur ait été écarté de notre analyse et qu'il ne figure pas dans les explications qui suivent.

- RandomForrest (ou « *forêt d'arbres décisionnels* ») s'appuie sur une tout autre méthode. Comme son nom l'indique, il va élaborer à partir des données qu'on lui fournit, plusieurs arbres décisionnels permettant de classer de façon la plus fiable le statut de l'échantillon comme MSS ou MSI.
- Une phase de prédiction (« MIAmS_tag »), au cours de laquelle chaque classifieur va appliquer la méthode de classification qu'il aura élaboré lors de la phase d'apprentissage pour classer le statut de chaque microsatellite pour tous les échantillons non analysés dans l'apprentissage.

A l'issue du run NGS, les deux classifieurs fournissent chacun pour un locus donné :

- Un statut (MSS, MSI, Indéterminé)
- Un score de confiance (en %) à l'échelle du locus (RandomForrest)
- Un score de confiance (en %) à l'échelle de l'échantillon (RandomForrest et mSINGS)

Ces scores de confiance tiennent compte de la profondeur et du nombre minimal de microsatellites nécessaire à la prédiction du statut.



<u>Figure 17</u> : Interface de visualisation des données de l'instabilité microsatellitaire en NGS. © *Escudié et al, 2019*.

Au terme de l'analyse, les données sont fusionnées, stockées dans un fichier JSON (JavaScript Object Notation) et rapportées dans un fichier HTML permettant la visualisation des résultats via une interface lisible pour le pathologiste/biologiste moléculaire. <u>FIGURE 17</u>

b. Application à notre travail

i. Adaptation de l'apprentissage à la population étudiée

Afin de s'assurer que le logiciel MIAmS prédise de façon la plus fiable possible le statut de nos échantillons, il a été nécessaire de réaliser en amont un apprentissage adapté à la population ciblée. En effet, lors de la publication de la méthode MIAmS en 2019, les données avaient été obtenues après réalisation d'un apprentissage basé sur une cohorte d'échantillons de tumeurs MSI et MSS : cet apprentissage n'était donc pas adapté à notre travail, qui s'appuie uniquement sur des échantillons de tumeurs MSI et de tissu normal.

Les échantillons utilisés pour la phase d'apprentissage proviennent en général d'une cohorte prévue à cet effet, ce qui n'était pas le cas pour ce travail. Nous avons donc utilisé pour cet apprentissage les échantillons d'ADN qualifiés parmi nos deux cohortes d'échantillons d'ADN normaux et d'ADN tumoraux.

ii. Création d'un fichier annoté « référence »

Comme expliqué précédemment, le logiciel MIAmS s'appuie au cours de la phase d'apprentissage sur un fichier texte « référence » qui liste le statut de chaque locus pour l'ensemble des échantillons utilisés pour cette phase d'apprentissage. Il a donc fallu créer ce fichier référence spécifique à notre travail.

Nous avons réalisé deux apprentissages différents (<u>FIGURE 18</u>), basés chacun sur un fichier référence spécifique :

• Un apprentissage basé sur le statut « global » de l'échantillon en Pentaplex-PCR

Pour ce premier apprentissage, nous avons attribué à chaque échantillon (normal et tumoral) un statut référence qui était le statut « global » de l'échantillon avec la Pentaplex-PCR. Le statut était disponible pour 190 des 192 échantillons et était référencé comme MSS ou MSI.

Deux échantillons d'ADN de la cohorte non tumorale n'ont pas pu être analysés en NGS à cause d'un épuisement du matériel : le statut de référence a donc été noté comme indéterminé.

• Un apprentissage basé sur le statut individuel des marqueurs

Pour ce deuxième apprentissage, nous avons utilisé comme statut de référence le statut individuel des marqueurs microsatellitaires en PCR.

Pour les marqueurs microsatellitaires communs au panel NGS et au panel Pentaplex (BAT25, BAT26, NR21, NR22), nous avons attribué comme statut de référence le statut du marqueur déterminé en Pentaplex-PCR. Pour HT17, nous avons utilisé comme statut de référence le statut de l'échantillon en PCR HT17 <u>après l'étape de calculs des ratios</u> (si celle-ci avait été nécessaire). Le statut de référence était noté comme MSS, MSI ou indéterminé.



Nous avons fait face à deux problèmes lors de l'attribution des statuts de référence :

- Nous ne disposions pas de statut de référence pour le marqueur NR27 puisque celui-ci ne faisait pas parti du panel de la Pentaplex-PCR utilisé dans le laboratoire ;
- Les 54 échantillons d'ADN normaux ayant été sélectionnés spécifiquement pour la validation de la PCR HT17, ils n'avaient pas été analysés en Pentaplex-PCR : par conséquent, nous ne disposions pas pour ces échantillons de statut de référence pour BAT25, BAT26, NR21 et NR22.

Pour remédier à ce problème et fournir tout de même un statut de référence pour <u>tous</u> les microsatellites et <u>tous</u> les échantillons, deux pathologistes (AV et JS) ont visualisé et interprété manuellement les profils de l'ensemble des échantillons d'ADN (normaux et tumoraux) en NGS INCa-V2. <u>TABLEAU 2</u>

	Tumoral	Normal			Tumoral	Normal
BAT25	Pentaplex-PCR	Non fait		BAT25	Pentaplex-PCR	NGS manuel
BAT26	Pentaplex-PCR	Non fait		BAT26	Pentaplex-PCR	NGS manuel
NR21	Pentaplex-PCR	Non fait	\rightarrow	NR21	Pentaplex-PCR	NGS manuel
NR22	Pentaplex-PCR	Non fait		NR22	Pentaplex-PCR	NGS manuel
NR27	Non fait	Non fait		NR27	NGS manuel	NGS manuel
HT17	PCR HT17	PCR HT17		HT17	PCR HT17	PCR HT17

<u>**Tableau 2**</u> : Statuts de référence des microsatellites utilisés pour l'apprentissage de MIAmS sur le statut du marqueur (statut de la PCR ou de l'analyse manuelle du NGS).

Pour éviter toute influence potentielle dans l'interprétation des profils, l'analyse « manuelle » du NGS a été réalisée en aveugle des résultats des Pentaplex-PCR et PCR HT17 ainsi que du type tumoral. Cette interprétation s'est déroulée en deux étapes, avec :

- Une première étape d'analyse des échantillons d'ADN normaux, afin de caractériser la gamme allélique de chaque microsatellite (nombre d'allèles différents, longueur de ces allèles) et d'identifier la présence de polymorphismes ;
- 2. Une deuxième étape d'analyse des échantillons d'ADN tumoraux, lors de laquelle chaque locus a été classé en MSS, MSI ou indéterminé selon le profil de répartition des allèles :
 - Le statut du locus était classé MSS s'il présentait exclusivement des allèles identifiés en population non tumorale
 - En cas d'identification d'allèle(s) aberrant(s) (non retrouvés en population non tumorale), le statut du microsatellite était classé comme MSI
 - En cas de doute (profil équivoque), le statut était classé comme indéterminé.

NB : nous avons interprété le statut de <u>tous</u> les microsatellites au cours de cette deuxième étape mais avons exploité uniquement le statut de NR27.

Au final, pour ce deuxième apprentissage, le fichier texte référence faisait figurer les éléments d'informations suivants : le numéro de l'échantillon, le statut de référence des microsatellites BAT25, BAT26, NR21 et NR22 déterminé en PCR ou en NGS (pour les échantillons non tumo-raux), le statut de référence de NR27 déterminé en NGS, le statut de référence du microsatellite HT17 en PCR et le statut « global » de l'échantillon en Pentaplex-PCR.

iii. Cycles d'apprentissage et d'acquisitions des données

Comme mentionné précédemment, la phase d'apprentissage du logiciel MIAmS nécessite habituellement l'emploi d'échantillons spécifiques dédiés à cet effet, ce dont nous ne disposions pas pour notre étude en raison des coûts supplémentaires que la constitution d'une telle cohorte aurait engendré pour le laboratoire. Nous avons donc utilisé les échantillons d'ADN normaux et tumoraux déjà rassemblés pour notre étude afin de constituer **un pool global d'échantillons** : le logiciel MIAmS a ensuite sélectionné de façon aléatoire un sous-ensemble d'échantillons (60% du pool) pour constituer **une cohorte « test** ». Le reste des échantillons du pool (40%) constituait alors la **cohorte de « validation »**.

A partir de ces cohortes test et validation, le logiciel MIAmS a exécuté la phase d'apprentissage et la phase de prédiction (cf. section précédente) en parallèle au cours d'une seule et unique séquence temporelle que nous avons appelé **un** « **cycle** », avec :

- <u>La phase d'apprentissage</u> à partir des données des échantillons de la cohorte « test », référencées dans le fichier texte référence ;
- <u>La phase de prédiction</u> où les échantillons de la cohorte de « validation » sont classés par les deux classifieurs.



<u>Figure 19</u> : Cycles d'apprentissage et d'acquisition des données via MIAmS.</u>

Chaque cycle débute avec la constitution d'une **cohorte test** (rond rayé) et d'une **cohorte de validation** (rond plein) : par exemple ici, la cohorte test représente 30% des échantillons totaux et la cohorte de validation les 70% restants. A la fin de chaque cycle, les données acquises par le logiciel à partir de la cohorte de validation sont archivées dans un fichier texte global. Chaque cycle aboutit donc à la création d'un jeu de données spécifique et unique listant pour les échantillons de la cohorte de validation : le statut attendu (statut de la PCR), le statut observé en NGS et un score de confiance.

Au total le logiciel a répété cette opération 200 fois pour chaque type d'apprentissage (200 cycles par apprentissage, 400 cycles au total), en définissant de façon aléatoire au début de chaque cycle une nouvelle cohorte « test » et une nouvelle cohorte de « validation ». <u>FIGURE 19</u>

iv. Exploitation des données

Les 200 jeux de données obtenus au terme des 200 cycles ont ensuite été fusionnés dans un fichier texte global (un par apprentissage), à partir duquel nous avons mesuré plusieurs indicateurs :

La conformité de la technique NGS vis-à-vis des résultats la Pentaplex-PCR, définie par la capacité du logiciel MIAmS à prédire pour un marqueur donné, un statut en NGS identique au statut du marqueur déterminé en Pentaplex-PCR.

Pour cela nous avons comparé **dans chaque jeu de données** le statut du marqueur prédit en NGS avec son statut de référence en PCR pour un échantillon donné, afin de classer la prédiction du NGS comme « valide » (si concordance des deux statuts) ou « invalide » (si discordance des deux statuts). Nous avons ensuite calculé pour chaque marqueur la proportion de prédiction « valide » ou « invalide » sur l'ensemble des échantillons, ce qui aboutit à un « pourcentage d'exactitude » (ou « % *of accuracy* »), qui traduit la justesse de la technique NGS. Nous avons considéré que le statut du marqueur prédit par le logiciel MIAmS était conforme si le pourcentage d'exactitude médian était supérieur ou égal à 95% pour le marqueur donné.

- <u>La sensibilité des microsatellites en NGS</u>, définie comme la capacité de chaque microsatellite à prédire à lui seul le statut d'instabilité microsatellitaire de l'échantillon en NGS.
 Pour cela, nous avons répété un processus similaire à celui présenté précédemment, en comparant cette fois le statut du marqueur prédit en NGS **au statut de référence de l'échantillon déterminé en PCR**.
- <u>La sensibilité des différents panels</u> pour le diagnostic d'instabilité microsatellitaire en NGS, en comparant le panel Pentaplex-NGS (BAT25, BAT26, NR21, NR22 et NR27) et un panel nommé Hexaplex-NGS (BAT25, BAT26, NR21, NR22, NR27et HT17).
 De la même manière, nous avons comparé le statut de l'échantillon prédit en NGS par un panel donné (par ex, Pentaplex-NGS) et le statut de l'échantillon déterminé en PCR.

Les résultats finaux ont donc été exprimés en pourcentage d'exactitude (% accuracy) pour chaque marqueur et pour chaque panel en détaillant la médiane avec les 1^{ers} et 3^{èmes} quartiles et ont été modélisés sous forme de diagrammes en boîte (ou boîte à moustache). <u>FIGURE 20</u>



Les données d'exactitude ont été déclinées <u>selon le type d'apprentissage (apprentissage sur le statut</u> du marqueur en Pentaplex-PCR ou sur le statut de l'échantillon en Pentaplex-PCR) et <u>selon le type</u> <u>tumoral</u> (colorectal ou non colorectal). Par manque de puissance, les analyses pour chaque sous-type tumoral n'ont pas été réalisées.

Enfin nous avons analysé les résultats <u>selon le seuil d'instabilité</u> (2 marqueurs ou 3 marqueurs instables) : en effet, la littérature rapporte que les tumeurs non colorectales (comme les tumeurs de l'endomètre ou des voies urinaires) peuvent présenter des profils d'instabilité moins « évidents » que les tumeurs colorectales, avec seulement 2 ou 3 marqueurs instables. Nous avons donc voulu apprécier l'impact du seuil d'instabilité sur le statut final de l'échantillon lors d'une analyse en panel dans notre cohorte.

v. Analyses statistiques

Nous avons réalisé plusieurs analyses statistiques :

- Les données d'exactitude obtenues avec les panels Pentaplex-NGS et Hexaplex-NGS ont été comparées entre les tumeurs colorectales et non colorectales à l'aide du test de Fisher ;
- Les données d'exactitude obtenues toutes tumeurs confondues avec le marqueur HT17 et les panels Pentaplex-NGS et Hexaplex-NGS ont été comparées selon le type d'apprentissage réalisé à l'aide du test de Mac Nemar avec application d'une correction de continuité ;
- Les données d'exactitude obtenues dans la population des tumeurs non colorectales avec le panel Pentaplex-NGS et avec le panel Hexaplex-NGS ont été comparées à l'aide du test de Mac Nemar, avec application d'une correction de continuité.

Nous avons utilisé un seuil de significativité de 0,05 pour toutes les analyses.

IV. <u>RESULTATS</u>

A. Caractéristiques anatomocliniques de la population d'étude

Les 138 échantillons d'ADN étaient issus de 136 patients âgés de 20 à 94 ans (médiane 63 ans) avec parmi eux, deux patients atteints de tumeurs synchrones :

- La patiente B59 avec une tumeur duodénale et une tumeur colique (colon droit) ;
- Le patient B26 avec une tumeur gastrique et une tumeur rectale.

Les principales caractéristiques anatomocliniques des 136 patients et de leurs 138 tumeurs sont exposées dans le <u>TABLEAU 3</u>.

		Nombre	Total	%	
Courte	Homme	59	136	43,4%	
Sexe	Femme	77	136	56,6%	
Âge au diagnostic	Médiane	63 ans [20-94 ans]			
	Tumeur colorectale	108	138	78,3%	
Tupo tumorol	Tumeur digestive non colorectale	10	138	7,2%	
Type tumoral	Tumeur endométriale	14	138	10,1%	
	Autre	6	138	4,3%	
	Stade 0 à III	73	81	90,1%	
Stade TNM au diagnos- tic	Stade IV	8	81	9,9%	
	Information manquante	57			
	Oui	6	82	9,8%	
Traitement néoadju- vant	Non	76	82	92,8%	
	Information manquante	56			

<u>**Tableau 3**</u> : Caractéristiques anatomocliniques de la population d'étude.

La majorité des patients présentait une tumeur résécable chirurgicalement d'emblée. Seul un faible pourcentage a reçu un traitement systémique néoadjuvant (9,8% des patients), dans la limite des données disponibles.

La majorité des tumeurs étaient des tumeurs colorectales (108/138, 78,3%), endométriales (14/138, 10,1%) ou encore digestives non colorectales (10/138, 7,2%). Nous disposions également de trois tumeurs ovariennes, d'une tumeur urothéliale, d'une tumeur cutanée (adénome sébacé) et une tumeur cérébrale (glioblastome). <u>FIGURE 21</u>

	Nombre	Pourcentage
Colon	101	73,2%
Endomètre	14	10,1%
Rectum	7	5,1%
Duodénum	3	2,2%
Estomac	3	2,2%
Ovaire	3	2,2%
Appendice	2	1,4%
Cerveau	1	0,7%
Grêle	- 1	0,7%
Pancréas	1	0,7%
Peau	1	0,7%
Uretère	1	0,7%
Total général	138	100

Figure 21 : Composition de la cohorte d'intérêt.

Parmi les 136 patients, 18 ont eu une maladie métastatique, qu'elle soit synchrone (8 patients) ou métachrones (10 patients). Parmi eux, 5 patients ont bénéficié d'une immunothérapie par inhibiteurs de checkpoints immuns avec une administration de pembrolizumab.

Un sixième patient sans contexte de maladie métastatique a reçu une immunothérapie par pembrolizumab : il s'agissait d'un patient porteur d'un syndrome de Lynch présentant un cancer colorectal découvert à un stade local très avancé et dont l'évolution a été marquée par plusieurs récidives locales et locorégionales. Le pembrolizumab a été introduit au moment de la première récidive locale en complément de la chimiothérapie, dans un contexte d'intolérance au traitement anticancéreux et dans le but d'assurer au patient un traitement optimal.

			Nombre
	Durée m	19,5 [2 ; 49]	
	Type de	réponse	
Immunothérapie		Réponse complète	2
(n = 6)		Stabilisation	1
		Absence de réponse	2
		Réponse non précisée	1

Tableau 4: Données concernant les patients ayant reçu une immunothérapie.

La durée moyenne de l'immunothérapie était de 19,5 mois, avec une réponse variable selon les patients. <u>TABLEAU 4</u>

B. Caractéristiques tumorales et moléculaires

1. Données des échantillons tumoraux

Les 138 échantillons d'ADN de la cohorte d'intérêt étaient extraits essentiellement à partir de tissus FFPE de pièces opératoires (92%) ayant emporté la tumeur primitive. Pour l'un des patients, nous disposions de la pièce opératoire d'une récidive locale.

Dans la majorité des cas, nous disposions d'un prélèvement avec plus de 20% de cellules tumorales. La cellularité tumorale était la plupart du temps élevée et ça, grâce à la sélection par le pathologiste d'une zone d'intérêt riche en cellules tumorales sur la lame HE (macrodissection). <u>TABLEAU 5</u>

Type tumoral			Tout type tumoral	Colorectal	Endomé- trial	Digestif non CR	Autre
	Piè	ce opératoire	127	102	12	8	5
		du cancer primitif	124	100	12	8	4
		d'une métastase	2	1	0	0	1
Prélèvement		autre	1	1	0	0	0
anatomopa- thologique	Bio	psie	10	5	2	2	1
		du cancer primitif	9	5	2	1	1
		d'une métastase	1	0	0	1	0
	Dor	née manquante	1	1	0	0	0
	< 20%		0	0	0	0	0
	20-30%		5	3	0	1	1
% cellules tumorales	30-50%		18	18	0	0	0
	> 50%		108	82	13	9	4
	Non précisé		7	5	1	0	1
	Non		4	4	0	0	0
Macrodissec-	Oui		117	92	13	7	5
	Nor	n précisé	17	12	1	3	1
TOTAL			138	108	14	10	6

<u>**Tableau 5**</u> : Détails des prélèvements anatomopathologiques des échantillons tumoraux.

2. Statut MMR des tumeurs

a. Analyse immunohistochimique des protéines MMR

Sur les 138 tumeurs de la cohorte d'intérêt, 134 présentaient une perte d'expression d'une ou plusieurs protéines du système MMR (97,1%). Dans la grande majorité des cas il s'agissait d'une perte d'expression combinée des protéines MLH1 et PMS2 (100/138, 75,2%). On retrouvait de façon moins fréquente une perte d'expression des protéines MSH2 et MSH6 (22/138, 16,5%) ou une perte d'expression isolée de PMS2 ou de MSH6. Deux tumeurs présentaient une conservation de l'expression des 4 protéines.

Enfin, le statut immunohistochimique n'a pu être déterminé pour deux tumeurs, soit parce que l'IHC n'avait pas été réalisée (1/138) soit à cause d'un échec technique (marquage équivoque : 1/138). <u>TABLEAU 6</u>

				Pentaplex-PCR			
			Profi	l MSI-H	Profil MSI-L	TOTAL	
	Phénotype dMMR-IHC par			134	0		
		Perte d'expression combinée des protéines MLH1 et PMS2	100	74,6%			
Etude immuno-		Perte d'expression combinée des protéines MSH2 et MSH6	22	16,4%		134	
histochimique des protéines du		Perte d'expression isolée de PMS2	6	4,5%			
système MMR		Perte d'expression isolée de MSH6	6	4,5%			
	Phénotype pMMR-IHC par maintien de l'expression des 4 protéines			1	1	2	
	Pł	nénotype indéterminé	2		0	2	
TOTAL			137 1		1	138	

<u>**Tableau 6**</u> : Détails du profil MMR des échantillons tumoraux en immunohistochimie.

Pour les deux patients avec tumeurs synchrones, nous avons étudié chaque tumeur de façon indépendante : la synthèse de ces cas figure à la fin de cette section.

b. Analyse moléculaire en PCR Pentaplex (MSI-PCR)

Par définition, tous les ADN tumoraux de notre cohorte avaient été analysés en Pentaplex-PCR. Sur les 138 tumeurs, 137 présentaient un profil MSI-H avec dans la majorité des cas 5 marqueurs instables (112/138, 81,8%) et une tumeur présentait un statut MSI-L. <u>TABLEAU 7</u>
				Etude immunohistochimique des protéines MMR				TOTAL	
		dMM	dMMR-IHC pMMR-IHC		Indéterminé				
Penta-	Profil MSI-H		1	.34	1 2		2		
		2 marqueurs instables	3	2,2%	0	0%	1	50%	
		3 marqueurs instables	8	6,0%	0	0%	0	0%	137
ріех-РСК		4 marqueurs instables	12	9,0%	1	100%	0	0%	
		5 marqueurs instables	111	82,8%	0	0	1	50%	
	Profil MSI-L		0		1		0		1
TOTAL		134 2 2		2	138				

Tableau 7 : Détails du profil MMR des échantillons tumoraux en biologie moléculaire.

c. Statut MMR global de l'échantillon

Au total, le statut MMR était concordant entre l'immunohistochimie et la PCR Pentaplex pour la grande majorité de nos échantillons (97,8% : 135/138) : une seule tumeur présentait un statut discordant. Les deux tumeurs restantes ne disposaient pas de statut MMR-IHC (IHC non réalisée ou marquage équivoque).

La tumeur au profil discordant entre les deux techniques était d'origine colique et présentait un profil MSI-H (avec 4 marqueurs instables) en biologie moléculaire et un profil pMMR-IHC en immunohistochimie. Devant la discordance de ces résultats, le patient avait été adressé en consultation d'oncogénétique afin de réaliser des analyses génétiques constitutionnelles : ces analyses avaient révélé la présence d'une mutation germinale du gène *PMS2*, signant ainsi le diagnostic de syndrome de Lynch. L'instabilité microsatellitaire retrouvée en biologie moléculaire était donc bel et bien valide et la tumeur était bel et bien dMMR. Les lames d'IHC avaient été relues en connaissance du diagnostic et montraient en réalité un marquage de la protéine PMS2 plus faible que pour les autres protéines.

La tumeur dont le profil n'était pas analysable en immunohistochimie était une tumeur endométriale. Le marquage était équivoque pour les protéines MLH1, MSH2 et PMS2 et non interprétable (échec) pour MSH6. Pour ce cas, il avait été plus difficile de trancher sur le statut MMR de la tumeur : en effet, l'analyse en biologie moléculaire avait un profil MSI-H mais avec seulement 2 marqueurs instables sur les 5. De plus, il n'avait pas été possible de réaliser d'analyse comparative avec l'ADN normal puisqu'il s'agissait d'un prélèvement biopsique entièrement infiltré par la tumeur. Sans aide de l'immunohistochimie, le pathologiste avait finalement conclu que le statut MMR de cette tumeur était non interprétable et qu'il devait être contrôlé sur pièce opératoire. Nous ne disposions pas de donnée d'oncogénétique pour cette patiente.

La deuxième tumeur qui ne disposait pas de statut MMR-IHC était la tumeur B59, détaillée cidessous.

Concernant les deux patients aux tumeurs synchrones, les résultats étaient les suivants :

- <u>Pour la patiente B59 avec les tumeurs synchrones duodénale et colique</u> : la tumeur duodénale présentait un statut dMMR concordant entre la Pentaplex-PCR (profil MSI-H) et l'immunohistochimie (dMMR-IHC par perte d'expression combinée de MSH2 et MSH6). Le statut de la tumeur colique avait été déterminé uniquement en biologie moléculaire (IHC non faite) : elle présentait un profil MSI-H et avait donc été rendue avec un statut dMMR. Au final cette patiente avait été reçue en consultation d'oncogénétique pour rechercher un syndrome de Lynch : la mise en évidence d'une mutation germinale du gène *MSH2* avait permis de confirmer le diagnostic.
- Pour le patient B26 avec les tumeurs synchrones gastrique et rectale : le statut MMR était discordant entre les deux tumeurs. En effet, la tumeur rectale présentait un profil MSI-H en biologie moléculaire avec un profil dMMR-IHC concordant en immunohistochimie (perte d'expression des protéines MLH1/PMS2) : elle avait donc été rendue comme dMMR. La tumeur gastrique, quant à elle, présentait un profil MSI-L en Pentaplex-PCR et avait finalement été rendue comme pMMR par le pathologiste devant le maintien de l'expression des 4 protéines MMR en IHC.

		Nombre	%
	Statut dMMR	136	98,6%
Statut MMR de l'échantillon	Statut pMMR	1	0,7%
rechartenon	Statut MMR non interprétable	1	0,7%

Le statut MMR final des tumeurs de la cohorte d'intérêt est détaillé en TABLEAU 8.

Tableau 8: Statut MMR des échantillons de la cohorte d'intérêt.

3. Analyses moléculaires complémentaires

L'ensemble des données des analyses moléculaires complémentaires sont résumées en <u>TABLEAU 9</u>. Au final, 99 échantillons avaient bénéficié d'une recherche d'hyperméthylation du promoteur *MLH1* en biologie moléculaire, en grande partie des tumeurs colorectales. Cette recherche de méthylation était justifiée le plus souvent par la constatation d'une perte d'expression des protéines MLH1 et PMS2 en immunohistochimie (96%) : la perte d'expression immunohistochimique était corrélée à une inactivation sporadique de *MLH1* par hyperméthylation de son promoteur dans 71,6% des cas (68/95). C'était notamment le cas pour la tumeur rectale du patient B26 : pour rappel, ce patient était porteur d'une tumeur gastrique synchrone pMMR, il s'agissait donc d'un argument supplémentaire en faveur de l'origine sporadique de ces deux tumeurs.

Quatre-vingts échantillons avaient également bénéficié de la recherche d'une mutation du gène BRAF, majoritairement des tumeurs colorectales (76/80). Seulement 24 d'entre elles présentaient réellement une mutation de BRAF: il s'agissait de la mutation p.V600E et elle était associée dans 95,8% des cas à une hyperméthylation du promoteur du gène *MLH1* (23/24).

Quatre tumeurs non colorectales ont également bénéficié de cette analyse : il s'agissait d'une tumeur ovarienne, d'une tumeur gastrique, d'une tumeur duodénale et d'un glioblastome. Aucune mutation *BRAF* n'avait été retrouvée pour ces tumeurs.

Aucun des échantillons avec une perte d'expression isolée de PMS2 en IHC ne présentait d'hyperméthylation du promoteur *MLH1*.

Dans notre cohorte, une tumeur présentait une mutation du gène BRAF V600E sans hyperméthylation du promoteur MLH1. Il s'agissait d'une tumeur colique, pour laquelle une perte d'expression des protéines MLH1 et PMS2 avait été mise en évidence en IHC : cependant, aucune hyperméthylation du promoteur de MLH1 n'avait pu être mis en évidence malgré deux essais techniques. La patiente avait donc été référée en consultation d'oncogénétique afin d'écarter formellement un syndrome de Lynch. La détection de la mutation BRAF pV600E était plutôt en faveur d'un cancer d'origine sporadique, ce qui a été confirmé plus tard par les analyses génétiques constitutionnelles qui retrouvaient aucune mutation germinale du gène MLH1. ne

		Méthylation du promoteur du gène <i>MLH1</i>		Mutation V(BF	600E du gène RAF	Conjonction des analyses de méthylation de MLH: et du statut mutationnel de BRAF			on de MLH1 RAF	TOTAL
		présente	recherchée	présente	recherchée	MLH1 + BRAF +	MLH1+ BRAF -	MLH1 - BRAF +	MLH1 - BRAF -	
٦	Fumeurs colorectales (n = 108)	57	86	24	76	23	25	1	26	75
	Perte d'expression combinée des protéines MLH1 et PMS2	57	82	24	72	23	25	1	23	72
	Perte d'expression isolée de la protéine PMS2	0	4	0	3	0	0	0	3	3
	Autre profil en IHC	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Tumeurs endométriales (n = 14)		8	9	0	0	0	0	0	0	0
	Perte d'expression combinée des protéines MLH1 et PMS2	8	9	0	0	0	0	0	0	0
	Perte d'expression isolée de la protéine PMS2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Autre profil en IHC	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	Autres tumeurs (n = 16)	3	4	0	4	0	2	0	0	2
	Perte d'expression combinée des protéines MLH1 et PMS2	3	4	0	4	0	2	0	0	2
	Perte d'expression isolée de la protéine PMS2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Autre profil en IHC	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	TOTAL	68	99	24	80	23	27	1	26	77

<u>**Tableau 9**</u> : Description des profils de méthylation du promoteur de MLH1 et du statut mutationnel de BRAF des échantillons de la cohorte d'intérêt, déclinés selon le type tumoral et le profil immunohistochimique.

4. Données oncogénétiques

D'après les recommandations de l'INCa, 63 patients sur les 136 présentaient une indication de consultation d'oncogénétique (CO) pour l'une des raisons suivantes: <u>TABLEAU 10</u>

- Tumeur de phénotype dMMR-IHC par perte d'expression de MSH2/MSH6 (n = 22)
- Tumeur de phénotype dMMR-IHC par perte d'expression isolée de MSH6 (n = 6)
- Tumeur de phénotype dMMR-IHC par perte d'expression isolée de PMS2 (n = 6)
- Tumeur de phénotype dMMR-IHC par perte d'expression combinée de MLH1 et PMS2 sans hyperméthylation du promoteur *MLH1* et/ou sans mutation *BRAF* retrouvées (n = 27)
- Tumeur au profil discordant entre la biologie moléculaire et l'immunohistochimie (n = 1)
- Tumeur MSI-H en biologie moléculaire sans étude immunohistochimique (n = 1)

	Patient reçu en CO	Pas de CO
Avec une indication de CO	40	23
Sans indication de CO	8	61
Données incomplètes	1	3
Total	49	87

Compte-tenu des informations recueillies dans les dossiers cliniques, 69 patients ne présentaient pas d'indication de CO. Nous ne disposions pas d'assez d'information pour évaluer l'indication ou non de CO pour les 4 patients restants.

<u>**Tableau 10</u>** : Répartition des patients en consultation d'oncogénétique.</u>

		Nombre
	Recherche effectuée	43
	Absence de mutation	21
	Mutation du gène MLH1	7
Recherche de	Mutation du gène MSH2	12
gènes MMR	Mutation du gène MSH6	1
	Mutation du gène PMS2	2
	Pas de recherche effectuée	1
	Information manquante	5
	Tumeur sporadique	19
	Syndrome de Lynch prouvé	22
Diagnostic final	Syndrome Lynch-like	3
	Information manquante	5

Tableau 11 : Détails des 49 patients vus en consultation d'oncogénétique.

Au total, 49 patients ont été reçus en consultation d'oncogénétique (<u>TABLEAU 11</u>) dont la patiente B59 qui présentait deux tumeurs synchrones (duodénale et colique). Parmi eux, 43 ont bénéficié d'une recherche de mutation germinale des gènes MMR, permettant d'identifier une mutation germinale d'un gène MMR et d'affirmer le diagnostic de syndrome de Lynch pour 23 patients. Il s'agissait le plus souvent d'une mutation du gène *MSH2* qui concordait dans 100% des cas avec une perte d'expression de la protéine MSH2 en immunohistochimie. Un patient avait été vu en consultation d'oncogénétique mais n'avait pas bénéficié d'analyses génétiques constitutionnelles devant un contexte familial peu évocateur.

Comme mentionné précédemment, la tumeur colique au profil discordant en Pentaplex-PCR (MSI-H) et en IHC (pMMR-IHC) était liée, au final, à une mutation germinale du gène *PMS2*.

C. Résultats de l'analyse en PCR HSP110 T17

1. Résultats de l'analyse de la cohorte contrôle (tissu non tumoral)



a. <u>Profil basal d'HT17</u>

Figure 22 : Profils phénotypiques d'HT17 dans notre laboratoire. A gauche, un profil homozygote T16/T16 (90/90 pb), au centre, un profil hétérozygote T16/T17 (90/91 pb) et à droite un profil homozygote T17/T17 (91/91 pb). Les 54 échantillons d'ADN normaux ont pu être correctement amplifiés en PCR HT17, générant 108 allèles. Le profil était hautement monomorphique avec seulement deux allèles différents à 90 et 91 bp, identifiés respectivement comme T16 et T17. Ces allèles se répartissaient selon trois profils phénotypiques : homozygote T16/T16 90/90 pb (12/54 : 22%), homozygote T17/T17 91/91 pb (28/54 : 52%) et hétérozygote T16/T17 90/91 (14/54 : 26%). FIGURE 22 Par conséquent nous avons déterminé le QMVR d'HT17 comme étant de 90-91 pb dans les conditions PCR utilisées dans notre laboratoire.

b. Mesure des ratios de hauteur de pics R1 et R2

Les ratios R1 et R2, correspondant respectivement aux ratios de hauteur entre les pics T14 (88 pb) et T15 (89 pb) sur celle du pic T16 (90 pb), ont été calculés à partir des données brutes de PCR du séquenceur capillaire des 54 échantillons d'ADN normaux : la valeur maximale de R1 et de R2 en population normale servira de seuil pour l'analyse des profils des ADN tumoraux.

Nous avons retrouvé les résultats suivants :

- Ratio T14/T16 (R1) : valeur maximale de 0,1144
- Ratio T15/T16 (R2) : valeur maximale de 0,489

2. Résultats de l'analyse de la cohorte d'intérêt (tumeurs MSI)



a. Données de l'analyse en PCR HT17

Parmi les 138 échantillons d'ADN tumoraux, 132 ont pu être analysés en PCR HT17 : deux échantillons ont été écartés par épuisement du matériel et quatre échantillons n'ont pas pu être analysés en raison d'un échec technique (signal non amplifié).

Le profil d'HT17 était considéré comme altéré s'il présentait de multiples allèles aberrants non retrouvés lors de l'analyse de la cohorte contrôle : ces allèles étaient généralement plus courts avec par conséquent, l'apparition de multiples allèles supplémentaires sur la gauche. <u>FIGURE 23</u>

C'était le cas pour 106 échantillons, qui ont été classés directement comme MSI.

Nous avons retrouvé un profil sensiblement normal pour les 26 autres échantillons, nécessitant alors une étape supplémentaire de calcul des ratios R1 et R2 : 21 échantillons présentaient des ratios R1 et/ou R2 au-delà du seuil déterminé dans la cohorte contrôle et ont donc été conclus comme MSI-R.

Les 5 échantillons restants ne présentaient pas d'élévation pathologique de R1 ni de R2 et ont donc été classés comme MSS.

	Analyse visuelle du profil	Statut final après mesure des ratios	Nombre	%
	Profil altéré MSI		106	76,8%
	Profil non altéré	26	18,8%	
PCR HT17		MSI-R	21	15,2%
		MSS	5	3,6%
	Echec technique/épuise	6	4,3%	

Les résultats des 138 échantillons sont résumés dans le TABLEAU 12.

Tableau 12 : Résultats de l'analyse d'HT17 en PCR.

b. Performance du marqueur HT17 en PCR

Au total, l'analyse du marqueur HT17 en PCR a permis d'établir un profil MSI pour 127 des 132 échantillons analysés (soit 96,2%). Cinq échantillons présentaient un profil HT17 non altéré et des ratios R1 et R2 non pathologiques.

Parmi ces 132 échantillons, 128 présentaient un profil concordant entre les deux techniques (<u>TABLEAU 13</u>). Pour rappel, la tumeur gastrique au profil MSI-L en Pentaplex-PCR avait finalement été rendue comme pMMR par le pathologiste devant le maintien de l'expression des 4 protéines en IHC. Cette tumeur présentait un profil MSS en PCR HT17, ce qui était donc concordant.

		Statut de l'échantille	TOTAL	
		MSI-H MSI-L		TOTAL
Profil HT17 en PCR	MSI ou MSI-R	127	0	127
	MSS	4	1	5
TOTAL		131	1	132

Tableau 13 : Statuts d'instabilité microsatellitaire en PCR HT17 et en Pentaplex-PCR.

L'analyse du marqueur HT17 n'a pas réussi à classer correctement 4 échantillons : il s'agissait de trois tumeurs endométriales et d'une tumeur rénale, toutes de profil MSI-H en Pentaplex-PCR et pour lesquelles nous avions constaté en immunohistochimie une perte d'expression, soit isolée de la protéine MSH6 (n = 2), soit combinée des protéines MLH1/PMS2 (n = 2). Une hyperméthylation du promoteur MLH1 avait notamment été retrouvée pour ces deux dernières tumeurs. Il s'agit donc ici de quatre faux-négatifs de la PCR HT17.

La tumeur colique qui présentait un profil discordant entre la Pentaplex-PCR (MSI-H) et l'IHC (pMMR) présentait un profil MSI en PCR HT17. Nous rappelons que l'instabilité microsatellitaire de cette tumeur avait finalement été confirmée grâce à l'analyse oncogénétique, qui avait rapporté la présence d'une mutation du gène *MSH2*. La PCR HT17 a donc réussi à classer correctement cette tumeur comme MSI.

3. Performances globales de la PCR HT17

Au total, si l'on considère les 132 échantillons tumoraux et les 54 échantillons normaux analysés en PCR HSP110 T17 (<u>TABLEAU 14</u>), le marqueur HT17 retrouve un statut d'instabilité microsatellitaire concordant avec la Pentaplex-PCR dans 97,8% des cas (182/186).

PENTAPLEX-PCR			PCR	τοται	
			MSI	MSS	TOTAL
Cohorte tumorale (n = 132)	Turnours colorectales $(n - 102)$	MSI	103	0	103
	Tumeurs colorectales (II – 105)	MSI-L	0	0	0
	Tumeurs non colorectales (n = 29)	MSI	24	4	28
		MSI-L	0	1	1
Cohorte normale (n = 54) MSS			0	54	54
TOTAL			127	59	186

Tableau 14 : Performances globales de la PCR HSP110 T17.

Nous comparons ici le statut de l'échantillon en Pentaplex-PCR et du statut obtenu en PCR HT17 sur le total des échantillons analysés par cette PCR (tumoraux et normaux), en différenciant le type tumoral. Toutes tumeurs confondues, la PCR HT17 présente une sensibilité de 96,9% et une spécificité de 100%. La PCR HT17 est nettement plus sensible dans les tumeurs colorectales que dans les tumeurs non colorectales (100% versus 85,7%). La spécificité de la PCR HT17, quant à elle, reste équivalente quel que soit le type tumoral. <u>TABLEAU 15</u>

PCR HT17	Toutes tumeurs confondues	Tumeurs colorectales	Tumeurs non colorectales
Sensibilité	96,9%	100%	85,7%
Spécificité	100%	100%	100%
Concordance du statut de l'échantillon en PCR HT17 et en Pentaplex-PCR	97,8%	100%	96,3%

Tableau 15 : Déclinaison des performances de la PCR HT17 selon le type tumoral.

D. Résultats de l'analyse MSI en NGS

Sur nos 192 échantillons d'ADN (138 tumoraux et 54 normaux), 190 ont pu être analysés en technique NGS. Deux échantillons d'ADN tumoraux étaient épuisés et ont été écartés de l'analyse.

Comme expliqué précédemment, afin que le logiciel MIAmS puisse correctement interpréter les échantillons de nos cohortes, nous avons réalisé un apprentissage spécifique au type d'échantillons analysés, c'est-à-dire des tumeurs MSI et du tissu normal. (*cf. p.43*)

Nous avons décidé de réaliser deux apprentissages différents : un apprentissage basé sur le statut PCR des marqueurs (réalisé sur 200 cycles d'apprentissage) et un apprentissage basé sur le statut global de l'échantillon en PCR (également réalisé sur 200 cycles d'apprentissage).

1. Evaluation de la conformité de la technique NGS avec les résultats de la Pentaplex-PCR

La 1^{ère} étape de notre travail sur le NGS était d'évaluer si les résultats de l'analyse d'instabilité microsatellitaire en NGS étaient bien conformes avec ceux de la Pentaplex-PCR. Nous nous sommes basés pour cela sur les données obtenues via l'apprentissage par statut du marqueur et nous avons vérifié, pour chaque marqueur, que le statut prédit par MIAmS était bien concordant avec le statut de référence du marqueur en Pentaplex-PCR.

Le marqueur NR27 a été écarté de cette analyse puisqu'il ne possédait pas de statut de référence en PCR. Le marqueur NR24 n'a pas non plus été étudié, cette fois pour des raisons techniques. En effet, nous avons rencontré des difficultés pour amplifier la séquence de NR24, ce qui s'est traduit par des profondeurs inférieures au seuil d'interprétabilité (300 reads). Nous n'avons donc jamais pu séquencer NR24 en NGS. C'est pour cette raison qu'il ne figure pas dans les analyses qui suivent.

Dans la majorité des cas, le statut prédit par le logiciel MIAmS pour un marqueur donné était concordant avec son statut de référence en PCR. Le taux de concordance des deux statuts était similaire pour les marqueurs BAT26, NR21, NR22 et HT17 (médianes de 97,3% pour BAT26, NR21 et NR22 et 97,2% pour HT17). Il était cependant moins efficace pour prédire le statut de BAT25 (95,9%). <u>FIGURE 24</u>



Cette 1^{ère} étape nous a donc permis de montrer que dans notre cohorte, l'analyse de l'instabilité microsatellitaire en NGS avec le logiciel MIAmS était fiable pour ces 5 microsatellites.

2. Evaluation de la sensibilité de l'analyse d'instabilité microsatellitaire en NGS

La 2^{ème} étape de notre travail sur le NGS était d'évaluer la sensibilité de chacun des marqueurs et celle de différents panels de marqueurs (Pentaplex ou Hexaplex) pour déterminer le statut d'instabilité microsatellitaire d'un échantillon.

a. <u>Sensibilité de chaque marqueur pour déterminer le statut MSI de</u> <u>l'échantillon</u>

La sensibilité d'un microsatellite pour le diagnostic de MSI en NGS se définit par sa capacité à prédire à lui seul, le statut de stabilité ou d'instabilité de l'échantillon tumoral. Pour évaluer la sensibilité des différents microsatellites, nous avons utilisé d'une part les données issues de l'apprentissage basé sur le marqueur et d'autre part, celles issues de l'apprentissage basé sur le statut de l'échantillon. Nous avons ensuite comparé le statut de chaque microsatellite en NGS au statut de référence de l'échantillon en Pentaplex-PCR.

Les résultats ont aussi été analysés selon le type tumoral.



<u>Figure 25</u> : Concordance du statut de chaque microsatellite en NGS et du statut global de l'échantillon en Pentaplex-PCR (toutes tumeurs confondues). Médiane [1^{er} quartile – 3^{ème} quartile]

En haut, les données obtenues avec un apprentissage basé sur le statut du microsatellite en PCR. **En bas**, les données obtenues avec un apprentissage basé sur le statut de l'échantillon en PCR.

Toutes tumeurs confondues et quel que soit l'apprentissage, il ressort que NR22 et NR27 sont les deux marqueurs les plus sensibles pour prédire le statut de l'échantillon (avec une sensibilité médiane de 98,6%), suivis de BAT25 et BAT26 (sensibilité médiane de 97,3%). De son côté, NR21 est le marqueur le moins sensible pour prédire le statut de l'échantillon (sensibilité médiane de 93,2%). Le statut d'HT17 en NGS était concordant avec le statut de l'échantillon en PCR dans 94,6% (apprentissage sur le statut du marqueur) à 95,9% des cas (apprentissage sur le statut de l'échantillon).

Au final, le type d'apprentissage n'avait pas d'impact évident sur les résultats. FIGURE 25

Lorsqu'on différencie les tumeurs colorectales et non colorectales (<u>TABLEAU 16</u>), on observe plusieurs choses : quel que soit le type tumoral, ce sont les mêmes marqueurs qui présentent la meilleure sensibilité (NR22, NR27 suivis de BAT26 et BAT25) et que c'est toujours NR21 qui présente les moins bons résultats. On observe également que les 6 marqueurs analysés sont tous moins sensibles pour prédire le statut d'une tumeur non colorectale.

Dans les tumeurs non colorectales, les résultats de l'apprentissage basé sur le statut de l'échantillon sont globalement meilleurs que ceux de l'apprentissage basé sur le statut du marqueur, avec une différence très nette pour NR21 et HT17.

	TUMEURS CC	DLORECTALES	TUMEURS NON COLORECTALES			
	Apprentissage sur le statut du marqueur	Apprentissage sur le statut de l'échantil- lon	Apprentissage sur le statut du marqueur	Apprentissage sur le statut de l'échantil- lon		
BAT25	<mark>98,5%</mark> [98,4-100]	<mark>98,5%</mark> [98,3-100]	90% [83,7-92,9]	91,7% [86-93,3]		
BAT26	100% [98,4-100]	100% [98,4-100]	84,6% [76,9-90,9]	85,7% [80-91,5]		
NR21	<mark>95,4%</mark> [94,9-96,8]	<mark>95,3%</mark> [94,3-96,8]	77,4% [69,2-84,6]	<mark>85,7%</mark> [78,6-90,9]		
NR22	100% [100-100]	100% [100-100]	<mark>90%</mark> [83,3-93,3]	<mark>92,9%</mark> [90,9-100]		
NR27	100% [100-100]	100% [100-100]	92,3% [86,7-100]	<mark>92,3%</mark> [86,9-100]		
HT17	<mark>98,4%</mark> [96,8-100]	98,4% [96,8-100]	78,2% [71,4-84,6]	82,4% [75-89,3]		

<u>**Tableau 16**</u> : Sensibilité des microsatellites en NGS selon le type tumoral et selon le type d'apprentissage.

Au final, cette analyse nous a permis de montrer qu'en NGS, quel que soit le type tumoral et quel que soit le type d'apprentissage, NR22 et NR27 sont les marqueurs les plus sensibles pour prédire le statut d'instabilité de l'échantillon et qu'à l'inverse, NR21 est le marqueur le moins sensible. Cela peut s'expliquer par le fait que NR21 est un microsatellite plus polymorphe que les autres marqueurs, avec un profil d'instabilité plus variable, ce qui a pu perturber MIAmS durant sa phase d'apprentissage.

Concernant HT17, il n'apparaît pas comme supérieur aux autres marqueurs pour prédire le statut de l'échantillon. Les données de sensibilité en NGS sont similaire à celles retrouvées en PCR HT17 (cf. chapitre IV.C.3). Enfin, cette analyse met en évidence que le type d'apprentissage peut avoir un impact sur la sensibilité des marqueurs en NGS et notamment

dans les tumeurs non colorectales. En effet, nous avons retrouvé de meilleurs résultats lorsque l'apprentissage était basé sur le statut de l'échantillon que lorsqu'il se basait sur celui du marqueur.

b. Sensibilité de l'analyse en panel de microsatellites

Avec la même méthodologie, nous nous sommes ensuite intéressés à la sensibilité de l'analyse en panel de microsatellites en NGS. Nous avons étudié plusieurs combinaisons de marqueurs : le panel Pentaplex-NGS comprenant BAT25, BAT26, NR21, NR22 et NR27 et le panel Hexaplex-NGS comprenant ces cinq marqueurs avec HT17. Les résultats ont été analysés selon le type tumoral (colorectal et non colorectal), selon le type d'apprentissage réalisé et selon le seuil d'instabilité (2 marqueurs ou 3 marqueurs instables).

Toutes tumeurs confondues (<u>TABLEAU 17</u>), le panel Pentaplex-NGS présente une sensibilité médiane de 98,6% lorsque le seuil est fixé à 2 marqueurs instables. L'élévation du seuil à 3 marqueurs s'accompagne inévitablement d'une diminution de cette sensibilité : cette baisse reste néanmoins minime (97,3%). Le panel Hexaplex-NGS, qui est l'analyse conjointe du marqueur HT17 et du panel Pentaplex-NGS, présente des résultats similaires en termes de sensibilité et ce, quel que soit le seuil d'instabilité.

Type d'apprentissage	Panel	Seuil d'instabili- té	TOUTES TUMEURS CONFON- DUES
	Pentaplex-	≥2	<mark>98,6%</mark> [98,6-100]
Apprentissage sur le	NGS	≥ 3	97,3% [95,9-98,6]
statut du marqueur	Hexaplex-	≥2	<mark>98,6%</mark> [98,6-100]
	NGS	≥ 3	<mark>98,6%</mark> [97,3-98,6]
	Pentaplex-	≥ 2	<mark>98,6%</mark> [98,6-100]
Apprentissage sur le	NGS	≥ 3	<mark>98,6%</mark> [98,6-100]
lon	Hexaplex- NGS	≥2	<mark>98,6%</mark> [98,6-100]
		≥3	98,6% [98,6-100]

<u>**Tableau 17</u>** : Sensibilité des panels de microsatellites en NGS selon le seuil d'instabilité et le type d'apprentissage réalisé dans la population toutes tumeurs confondues.</u>

Médiane en rouge, les 1^{ers} et 3^{èmes} quartiles entre crochets.

Pentaplex-NGS = BAT25, BAT26, NR21, NR22 et NR27.

Hexaplex-NGS = BAT25, BAT26, NR21, NR22, NR27 et HT17.

Le <u>TABLEAU 18</u> différencie les résultats selon le type d'apprentissage : on voit que les résultats obtenus après apprentissage sur le statut de l'échantillon étaient significativement meilleurs que ceux obtenus après apprentissage sur le statut du marqueur pour le panel Hexaplex-NGS. Pour le panel Pentaplex-NGS, la différence était significative uniquement avec un seuil d'instabilité de 2 marqueurs.

Coult		TOUTES TUMEUI		
d'instabilité	Panel	Apprentissage sur le statut du marqueur	Apprentissage sur le statut de l'échantillon	p
Seuil ≥ 2	Pentaplex-NGS	<mark>98,6%</mark> [98,6-100]	<mark>98,6%</mark> [98,6-100]	0,16
	Hexaplex-NGS	<mark>98,6%</mark> [98,6-100]	98,6% [98,6-100]	0,02
Seuil ≥ 3	Pentaplex-NGS	97,3% [95,9-98,6]	98,6% [98,6-100]	< 0,00001
	Hexaplex-NGS	<mark>98,6%</mark> [97,3-98,6]	<mark>98,6%</mark> [98,6-100]	< 0,00001

<u>**Tableau 18**</u> : Mesure de l'impact du type d'apprentissage sur la sensibilité de l'analyse d'instabilité microsatellitaire en technique NGS, déclinée selon le panel utilisé (Pentaplex-NGS ou Hexaplex-NGS) et le seuil d'instabilité utilisé.

Les données sont exprimées en %, avec la médiane en rouge et les 1ers et 3èmes quartiles entre crochets.

Les analyses statistiques comparant les données des deux apprentissages ont été réalisées via le test de Mac Nemar.

Au vu de ces résultats, nous avons examiné plus en détail les performances du panel Pentaplex-NGS. Pour rappel, le statut de l'échantillon qui sert de référence pour notre travail est le statut déterminé en Pentaplex-PCR avec un seuil d'instabilité fixé à 2 marqueurs instables : par conséquent nous aurions pu penser qu'en analysant ces échantillons dans des conditions très similaires en NGS (panel Pentaplex-NGS et seuil de 2 marqueurs instables), le statut d'instabilité aurait été concordant entre les 2 techniques dans 100% des cas (et non 98,6%). Le panel Pentaplex-NGS a donc été responsable de quelques erreurs de classification. Ces erreurs ciblaient préférentiellement 4 tumeurs non colorectales, toutes classées MSI en PCR mais faussement classées MSS en NGS :

- <u>une tumeur urothéliale</u> (A22) avec perte d'expression de MSH6 et 3 marqueurs instables sur 5 en PCR.
- <u>une tumeur gastrique</u> (A11) avec perte d'expression de MLH1/PMS2 et 2 marqueurs instables sur 5 en PCR, sans comparaison possible au tissu normal.
- <u>une tumeur endométriale</u> (A60) avec perte d'expression de MLH1/PMS2 et 4 marqueurs instables sur 5 en PCR.
- <u>une tumeur endométriale</u> (B35) avec perte d'expression de MSH6 et 3 marqueurs instables sur 5 en PCR, sans comparaison possible au tissu normal.

Sur la totalité des cycles d'apprentissage où ces échantillons tumoraux faisaient partie de la cohorte de validation (*cf. p.45*), ils totalisaient respectivement 5% (A22), 20% (A11), 30% (A60) et 100% (B35) d'erreurs.

Ces erreurs peuvent s'expliquer par la composition de notre cohorte : en étant composée d'une majorité de tumeurs colorectales avec des profils d'instabilité microsatellitaire « marqués », l'apprentissage du logiciel MIAmS a été biaisé de telle sorte qu'il s'est mieux entraîné à reconnaître des profils d'instabilité « typiques » de tumeurs colorectales que des profils moins tranchés de tumeurs non colorectales.

Cette hypothèse se confirme lorsqu'on analyse les performances des panels Pentaplex-NGS et Hexaplex-NGS selon le type tumoral. (<u>TABLEAU 19</u>) De façon globale, les deux panels sont nettement plus performants dans les tumeurs colorectales que dans les tumeurs non colorectales. En effet, quel que soit le seuil d'instabilité et le type d'apprentissage réalisé, les panels montrent une sensibilité de 100% pour déterminer le statut d'instabilité d'une tumeur colorectale tandis qu'on observe une baisse globale et significative de leurs performances dans les tumeurs non colorectales.

Type d'apprentissage	Panel	Seuil d'instabilité	TUMEURS COLORECTALES	TUMEURS NON COLOREC- TALES	p
	Pentaplex- NGS	≥ 2	100% [100-100]	93,3% [91,7-100]	< 0,001
Apprentissage sur le statut du marqueur		≥ 3	100% [100-100]	85,7% [78,6-91,7]	< 0,001
	Hexaplex- NGS	≥ 2	100% [100-100]	94,1% [92,3-100]	< 0,001
		≥ 3	100% [100-100]	90,9% [84,6-93,3]	< 0,001
	Pentaplex- NGS	≥ 2	100% [100-100]	100% [92,3-100]	< 0,001
Apprentissage		≥ 3	100% [100-100]	91,7% [85,7-100]	< 0,001
l'échantillon	Hexaplex- NGS	≥ 2	100% [100-100]	100% [92,3-100]	< 0,001
		≥3	100% [100-100]	<mark>93,3%</mark> [90,9-100]	< 0,001

<u>**Tableau 19**</u> : Sensibilité des panels de microsatellites en NGS selon le seuil d'instabilité, le type tumoral et le type d'apprentissage réalisé.

Les analyses statistiques comparant les résultats entre les tumeurs colorectales et non colorectales pour chaque panel et pour chaque seuil d'instabilité ont été réalisées via le test de Fisher.

Cependant, malgré cette baisse globale de performances, on constate que le panel Hexaplex-NGS présente de meilleurs résultats que le panel Pentaplex-NGS dans les tumeurs non colorectales : cette supériorité de l'Hexaplex est significative quel que soit le seuil d'instabilité lorsque l'apprentissage a été réalisé sur le statut du marqueur (94,1% vs 93,3% et 90,9% vs 85,7%). Lorsque l'apprentissage a été réalisé sur le statut de l'échantillon, la supériorité de l'Hexaplex apparaît seulement avec un seuil d'instabilité fixé à 3 marqueurs instables : les performances des deux panels sont strictement identiques lorsque le seuil est fixé à 2 marqueurs. <u>TABLEAU 20</u>

TUMEURS NON COLORECTALES									
Seuil d'instabilité	Panel	Apprentissage sur le statut du marqueur	ρ	Apprentissage sur le statut de l'échantillon	p				
Seuil ≥ 2	Pentaplex NGS	93,3% [91,7-100]	10.001	100% [92,3-100]	NI				
	Hexaplex NGS	94,1% [92,3-100]	< 0,001	100% [92,3-100]					
Seuil ≥ 3	Pentaplex NGS	85,7% [78,6-91,7]	< 0.001	<mark>91,7%</mark> [85,7-100]	< 0.001				
	Hexaplex NGS	90,9% [84,6-93,3]	< 0,001	<mark>93,3%</mark> [90,9-100]	< 0,001				

<u>**Tableau 20</u>** : Comparaison des performances des panels de microsatellites pour chaque type d'apprentissage et pour chaque seuil d'instabilité.</u>

Les analyses statistiques comparant les résultats des panels Pentaplex-NGS et Hexaplex-NGS ont été réalisées via le test de Mac Nemar sauf pour les données obtenues après apprentissage avec un seuil à 2 marqueurs instables (résultats <u>strictement</u> identiques donc analyse statistique non indiquée = NI).

Au total, cette analyse nous a permis de montrer plusieurs choses. Tout d'abord, on peut retenir de l'analyse toutes tumeurs confondues que les panels Pentaplex-NGS et Hexaplex-NGS montrent des performances similaires, avec de très bonnes médianes de sensibilité (97,3-98,6%), quel que soit le seuil d'instabilité choisi. De plus, il apparaît que les résultats de MIAmS après la réalisation d'un apprentissage basé sur le statut de l'échantillon en PCR sont significativement meilleurs que lorsque son apprentissage s'est basé sur le statut du marqueur, et ce quel que soit le panel.

On retient de l'analyse par type tumoral que les deux panels (Pentaplex-NGS et Hexaplex-NGS) présentent des performances excellentes dans les tumeurs colorectales (sensibilité de 100%) mais qu'elles diminuent nettement dans les tumeurs non colorectales. Dans ce type de tumeurs, le panel Hexaplex-NGS prouve sa supériorité et permet de prédire le statut d'instabilité de l'échantillon avec une sensibilité au minimum strictement égale mais le plus souvent significativement plus élevée que le panel Pentaplex-NGS. Cet écart de performances entre les tumeurs colorectales et non colorectales s'explique par la surreprésentation des tumeurs colorectales dans notre cohorte, responsable d'un biais dans l'apprentissage du logiciel MIAmS, qui sera meilleur pour reconnaître l'instabilité dans une tumeur colorectale que dans une tumeur non colorectale.

V. DISCUSSION

L'instabilité microsatellitaire est un marqueur d'importance croissante en cancérologie, par son implication diagnostique dans le syndrome de Lynch (60) mais aussi théranostique avec l'avènement de l'immunothérapie. En effet, celle-ci est désormais indiquée dans les cancers métastatiques de phénotype MSI quel que soit le type histologique. (71) Cependant la détection de l'instabilité microsatellitaire dans les tumeurs non-colorectales est souvent difficile avec la technique de référence Pentaplex-PCR. (18-19) Nous avons donc réalisé ce travail dans le but de rechercher un moyen de simplifier la recherche d'instabilité microsatellitaire en pratique de routine et d'améliorer ces performances, notamment dans les tumeurs noncolorectales.

Notre étude comportait deux objectifs principaux : évaluer les performances du microsatellite HT17 dans le diagnostic d'instabilité microsatellitaire et évaluer la conformité de la technique NGS avec la technique standard (Pentaplex-PCR). Pour cela nous avons réuni une cohorte de 138 ADN de tumeurs variées, de statut dMMR parfaitement documenté avec les techniques de référence (MSI et dMMR-IHC) entre 2016 et 2017 dans notre laboratoire.

A. Apport du marqueur HT17 en PCR pour la détection d'une MSI

En 2016, Buhard et al. (86) ont décrit le microsatellite HT17 comme un marqueur très monomorphe dans la population générale et capable de diagnostiquer à lui-seul l'instabilité microsatellitaire avec une sensibilité de 98,4% et une spécificité de 100%. Il faut néanmoins préciser que ces valeurs ont été obtenues en considérant l'immunohistochimie comme gold standard : en utilisant la Pentaplex-PCR comme technique de référence, la sensibilité est similaire (98,7%) mais la spécificité diminue (96,2%). Lors de l'analyse des ADN normaux nous avons pu effectivement constater le monomorphisme d'HT17 et que son profil en analyse de fragment était net et facile à lire. Les données de sensibilité et de spécificité dans notre cohorte d'ADN tumoraux et d'ADN normaux étaient sensiblement similaires aux leurs, avec des valeurs respectives de 96,9% et 100%. Elles concordent également avec les données de Collura et al. qui retrouvaient une sensibilité de 97% pour une spécificité de 100%. (84) Notre valeur de sensibilité, légèrement inférieure à celle rapportée par Buhard et al. peut s'expliquer par la composition de notre cohorte, qui renferme des tumeurs colorectales et des tumeurs non colorectales, ce qui n'était pas le cas dans leur étude. Cette hypothèse se confirme lorsqu'on analyse les performances de la PCR HT17 en fonction du type tumoral, avec des résultats nettement meilleurs dans le groupe des tumeurs colorectales que dans le groupe des tumeurs non colorectales (sensibilité de 100% versus 85,7%). Nous ne disposons pas de donnée comparative pour les tumeurs non colorectales puisqu'à ce jour, aucune étude en dehors de la nôtre n'a étudié les performances du marqueur HT17 dans d'autres tumeurs que les CCR.

L'autre argument avancé par *Buhard et al.* en faveur de l'utilisation d'HT17 est la simplicité de son analyse et de son interprétation. Notre avis diverge en ce point : en effet nous avons fait face à plusieurs problèmes lors de l'implémentation de la PCR HT17 dans le laboratoire, en commençant par la nécessité de modéliser un couple d'amorce sur-mesure. De plus, la mesure des ratios de hauteur de pics a représenté une contrainte non négligeable lors de l'élaboration du protocole PCR, nécessitant d'adapter les conditions de PCR afin d'éviter toute saturation du signal. Enfin, nous avons fait le choix d'utiliser une ADN polymérase spécifique, plus fidèle, afin d'obtenir un tracé le plus précis possible. L'analyse du statut des ADN tumoraux s'est révélée laborieuse et chronophage eu égard à cette étape de mesure de ratios : celle-ci s'est pourtant avérée essentielle et a permis de rattraper le diagnostic d'instabilité microsatellitaire pour 21 tumeurs. Ce calcul de ratios, qui a nécessité d'extraire manuellement les données brutes de l'analyse de fragments à partir du séquenceur capillaire, nous paraît difficilement réalisable en pratique de routine.

Au total, le diagnostic de l'instabilité microsatellitaire avec HT17 en PCR ne parait pas présenter d'avantage majeur en termes de temps technique et d'implication médicale vis-à-vis de la Pentaplex-PCR. Il ne semble pas non plus présenter d'intérêt dans les tumeurs non colorectales.

B. Méthodologie de validation d'une technique NGS pour la détection de l'instabilité microsatellitaire

Le deuxième sujet de notre travail était l'analyse de l'instabilité microsatellitaire en technique NGS. De nombreuses tumeurs nécessitent la recherche de mutations récurrentes à visée théranostique (ex : CCR et mutations de *KRAS*, cancer de l'endomètre et mutations de *POL-E et POL-D*) : en 2015, nous avons mis en place la recherche de ces mutations en NGS par approche amplicon avec un panel de 16 gènes puis de 35 gènes (panel INCa-V2) et un pipeline d'analyses des SNV (single nucleotide variants). Avec la généralisation de l'immunothérapie à tous les cancers métastatiques MSI, il serait intéressant d'utiliser une méthode unique pour rechercher ces mutations récurrentes incluant également la recherche de l'instabilité microsatellitaire : nous avons donc décidé d'incorporer des cibles microsatellitaires à notre panel NGS. Lorsque ce travail a été initié en 2018, nous avons fait le choix d'utiliser les marqueurs consensuels de la Pentaplex-PCR (BAT25, BAT26, NR21, NR22, NR24 et NR27) et d'y ajouter HT17.

L'analyse de SNV et de l'instabilité microsatellitaire en NGS s'appuient sur des pipelines d'analyses bien distincts : la première étape a donc été de choisir un outil dédié à l'analyse de MSI (classifieur) en NGS. De nombreux classifieurs ont vus le jour au cours de ces dernières années, qui utilisent des méthodes différentes : par exemple, MANTIS (**31**) est un classifieur qui s'appuie sur la comparaison à l'ADN normal pour diagnostiquer l'instabilité microsatellitaire, ce qui freine son utilisation en routine. D'autres classifieurs s'appuient sur le principe de *machine learning*, comme mSINGS ou MSISensor. (**29–31, 36,92–94**) Ces outils présentent cependant plusieurs limites : la grande majorité n'ont été testés que dans le CCR, beaucoup moins dans d'autres types de tumeur, et leurs performances n'ont pas encore été correctement évaluées par rapport aux techniques de référence (Pentaplex-PCR et IHC).

Le logiciel MIAmS, qui a été développé au sein de notre laboratoire, a prouvé ses performances dans l'analyse de l'instabilité microsatellitaire sur une large cohorte de tumeurs variées (poumon, colon et autres). **(35)** En plus d'offrir une interface d'analyse lisible et intuitive, il se distingue d'autres classifieurs en utilisant une approche amplicon : en effet, la majorité d'entre eux se base sur une approche de capture, ce qui les rend plus coûteux et moins accessibles. Nous avons donc utilisé le logiciel MIAmS pour ce travail.

Il s'appuie sur le concept de machine learning et détecte l'instabilité microsatellitaire grâce à deux classifieurs, mSINGS et RandomForrest, par le biais de deux phases : une phase d'apprentissage et une phase de prédiction. La phase d'apprentissage s'appuie sur une cohorte d'échantillons dédiés, dont le statut MSI a été documenté antérieurement en Pentaplex-PCR. Lors de la publication de la méthode MIAmS en 2019, cet apprentissage avait été réalisé sur une cohorte d'échantillons de tumeurs MSI et MSS. Notre travail étant basé uniquement sur des tumeurs MSI et du tissu normal, nous avons dû réaliser un nouvel apprentissage, spécifiquement adapté à notre cohorte.

Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier la conformité de la technique NGS vis-àvis des résultats de la Pentaplex-PCR. Pour cela nous avons réalisé un apprentissage basé sur le statut individuel des marqueurs en Pentaplex-PCR pour ensuite évaluer la concordance du statut de chacun des microsatellites en NGS avec leur statut de référence en PCR. Nos résultats montrent que l'analyse MSI en NGS était conforme, avec un statut d'instabilité en NGS concordant avec le statut PCR dans 97% des cas et ce, pour l'ensemble des microsatellites. Les performances de MIAmS variaient néanmoins selon le type tumoral, avec de très bonnes performances dans le groupe tumeurs colorectales (médiane de concordance : 98,3-100%) et de moins bonnes dans le groupe des tumeurs non colorectales (médiane de concordance : 84,6-93,3%).

En plus de ce premier apprentissage basé sur le statut individuel des marqueurs, nous avons décidé d'en réaliser un deuxième, basé cette fois sur le statut global de l'échantillon en Pentaplex-PCR. Notre hypothèse était que ce type d'apprentissage permettrait de s'affranchir de potentielles erreurs humaines commises lors de l'interprétation du statut des marqueurs en Pentaplex-PCR. Il était donc nécessaire pour cet apprentissage que le statut MMR des échantillons soit très bien caractérisé. C'était le cas pour les échantillons de notre cohorte, pour lesquels nous disposions des données immunohistochimiques, du statut de la Pentaplex-PCR et parfois des données oncogénétiques. Le statut MMR de nos échantillons était donc très bien documenté et robuste.

Au final, nos résultats montrent que les performances de MIAmS étaient significativement meilleures lorsque son apprentissage s'appuyait sur le statut global de l'échantillon en Pentaplex-PCR. Il semblerait donc qu'en imposant un apprentissage basé sur le statut individuel du marqueur (qui est, rappelons-le, interprété manuellement en PCR), on limite les performances du logiciel en reproduisant de potentielles erreurs humaines. Lorsque l'apprentissage est réalisé sur la base du statut global de l'échantillon, le classifieur détermine de façon autonome ce qui correspond à un profil « type » MSS et à un profil « type » MSI. La principale limite de cet apprentissage apparaît en présence de polymorphismes. En effet, un échantillon non tumoral, dont le statut global est MSS en Pentaplex-PCR, peut comporter un ou plusieurs marqueurs sièges de polymorphismes et qui présentent un profil de répartition des allèles modifié : en se basant sur le statut global de l'échantillon (MSS), le profil du/des marqueurs concernés va être faussement classé comme MSS par MIAmS. Cet apprentissage est donc moins fiable et risque d'introduire des erreurs en cas d'utilisation de cibles microsatellitaires sujets à polymorphismes dans la population générale (ex : NR21). **(9, 96)**

C. Diagnostic d'une MSI en NGS : impact du seuil d'instabilité et de la composition du panel de microsatellites

Ce travail comportait plusieurs objectifs secondaires : évaluer la sensibilité de chacun des marqueurs pour le diagnostic d'instabilité microsatellitaire en NGS et étudier l'intérêt d'ajouter HT17 au panel Pentaplex en évaluant les performances des panels Pentaplex et Hexaplex sur différents types tumoraux et avec différents seuils d'instabilité.

Quel que soit le type tumoral, NR22 et NR27 étaient les microsatellites avec la meilleure valeur prédictive du statut de l'échantillon (médiane 98,6%), suivis de BAT25 et BAT26 (médiane 97,3%). Ces marqueurs étaient plus sensibles dans les tumeurs colorectales que dans les tumeurs non colorectales (100% versus 84,6-92,3%). De son côté, NR21 était le marqueur le moins performant pour prédire le statut de l'échantillon (médiane de 93,2%). Ces données concordent avec les études de *Goel et al.* (96) et de *Pagin et al.* (93), réalisées en PCR respectivement sur des CCR et sur des tumeurs d'origine variée, et qui retrouvaient des sensibilités pour NR27, BAT26 et NR21 respectivement de 93,9%, 94,7 et 87,7% (*Goel et al.*) et de 82,1%, 84,6% et 70,1% (*Pagin et al.*). Nous avons constaté une très bonne sensibilité du marqueur HT17 dans les tumeurs colorectales (98,4%), ce qui concorde également avec la littérature. (83,85–88) Malheureusement, comme nous l'avions déjà remarqué en PCR, ses performances diminuent nettement dans les tumeurs non colorectales (sensibilité variant de 72,8 à 82,4% selon l'apprentissage), ce qui confirme que ce marqueur ne présente pas d'intérêt supplémentaire vis-à-vis des marqueurs du panel Pentaplex lorsqu'il est analysé seul.

Toutes tumeurs confondues, l'analyse du panel Pentaplex-NGS et de ses 5 marqueurs (BAT25, BAT26, NR21, NR22 et NR27) permettait de retrouver un statut d'instabilité microsatellitaire en NGS concordant avec celui de la PCR dans l'immense majorité des cas (médiane de concordance : 98,6%). Nous avons cependant constaté plusieurs erreurs de classification récurrentes du logiciel MIAmS avec le panel Pentaplex-NGS : ces erreurs ciblaient préférentiellement 4 échantillons de tumeurs non colorectales (d'origine urothéliale, gastrique et endométriale), toutes classées MSI-H en Pentaplex-PCR et faussement classées MSS en NGS. Ces erreurs peuvent s'expliquer d'une part par notre cohorte, composée davantage de tumeurs colorectales (91,8%) au profil d'instabilité « facile » (avec 4 à 5 marqueurs instables en PCR) que de tumeurs non colorectales au profil « difficile » (2 ou 3 marqueurs instables) : la conséquence était un biais dans l'apprentissage de MIAmS, qui s'est davantage entraîné à reconnaître le profil d'instabilité d'une tumeur colorectale (facile) que celui d'une tumeur non colorectale (difficile) et qui échoue donc plus facilement à classer ce type de tumeur.

D'autre part, parmi ces 4 tumeurs, deux présentaient une perte d'expression de la protéine MSH6 en immunohistochimie, or plusieurs études rapportent que les tumeurs liées à des mutations du gène *MSH6* se caractérisent souvent par des profils d'instabilité moins marqués, d'où un risque non négligeable de faux négatifs. (15, 95, 98) Pour ces tumeurs, l'analyse comparative avec l'ADN normal aurait probablement aidé à redresser le diagnostic d'instabilité microsatellitaire.

Pour ce qui est du panel Hexaplex-NGS, il présentait des performances superposables à celles du panel Pentaplex-NGS (98,6%). Il semblait donc peu intéressant d'ajouter le marqueur HT17 aux marqueurs usuels pour l'analyse d'instabilité microsatellitaire en routine.

Par ailleurs, nous avons pu constater que passer d'un seuil de 2 marqueurs instables à un seuil de 3 marqueurs instables ne semblait pas avoir d'incidence sur les performances des deux panels.

Au total, en NGS comme en PCR, les marqueurs NR27, NR22, BAT26 et BAT25 sont les meilleurs pour prédire le statut d'instabilité d'un échantillon et NR21 est le moins performant. De son côté, HT17 présente peu d'intérêt supplémentaire vis-à-vis des marqueurs du panel Pentaplex. Toutes tumeurs confondues, le logiciel MIAmS est très performant pour diagnostiquer l'instabilité microsatellitaire, quel que soit le panel (Pentaplex ou Hexaplex) et quel que soit le seuil d'instabilité (2 ou 3 marqueurs instables) qu'il utilise.

Notre travail confirme donc que la détection d'une instabilité microsatellitaire est transposable au NGS en technique amplicon avec le logiciel MIAmS. L'équipe de biologie moléculaire du CHU de Montpellier, qui a par ailleurs participé au développement de MIAmS, utilise cette méthode en routine depuis 2019 pour étudier le profil d'instabilité microsatellitaire des échantillons tumoraux.

Dans notre laboratoire, le projet de transposer le diagnostic d'instabilité microsatellitaire au NGS a été compromis en 2019 par l'abandon de la technologie Amplicon au profit de la technologie Capture. Nous espérons tout de même un jour pouvoir appliquer la recherche d'instabilité microsatellitaire à la technique NGS mais il sera indispensable de réaliser une nouvelle épreuve de validation pour adapter le logiciel MIAmS à l'analyse en capture, avec la même méthodologie qui a été utilisée dans ce travail.

D. Diagnostic de MSI en fonction du type tumoral

Les performances de MIAmS étaient excellentes mais variables selon le type de tumeur analysée. En effet, il était très performant dans le groupe des tumeurs colorectales et permettait de retrouver un statut d'instabilité identique en NGS et en PCR dans 100% des cas, quels que soit les panel/seuils/apprentissages. Néanmoins ses performances étaient inférieures dans le groupe de tumeurs non-colorectales, avec un taux de concordance entre les statuts de l'échantillon en PCR et NGS variant de 85,7% à 100% selon les panel/seuils/apprentissages. Pour ce type de tumeur, les performances du panel Hexaplex-NGS était significativement meilleures que celles du panel Pentaplex et ce, quel que soit l'apprentissage réalisé et le seuil d'instabilité utilisé. Ces données concordent avec celles de *Pagin et al.*, (**95**) dont l'étude a démontré qu'utiliser un panel Hexaplex (avec BAT40 au lieu de HT17) était plus efficace que le panel Pentaplex pour détecter l'instabilité microsatellitaire en PCR dans des tumeurs non colorectales (sensibilité de 92,9% vs 85,7%). Au total, l'analyse conjointe du marqueur HT17 et du panel Pentaplex (panel Hexaplex) démontre son intérêt dans l'analyse de tumeurs non colorectales, ce qui pourrait justifier son utilisation en routine pour l'analyse de ce type de tumeurs.

Ce travail permet de soulever la problématique du choix des microsatellites pour le diagnostic d'instabilité microsatellitaire. La technique consensus (Pentaplex), recommandée jusqu'à présent pour le diagnostic, a été développé principalement dans le cancer colorectal et est donc très performante pour ce type de tumeurs. Cependant, plusieurs études rapportent que dans les tumeurs non colorectales (comme les cancers de l'endomètre ou des tumeurs des voies excrétrices supérieures les cibles de l'instabilité sont différentes de celles du cancer colorectal : par exemple, les microsatellites fréquemment atteints dans le CCR se trouvent au niveau de gènes *TGFBR2* et *ACVR2A* et au niveau des gènes *JAK1* et *TFAM* pour le cancer de l'endomètre. (97,98) On comprend donc que l'expression de l'instabilité soit différente avec le panel consensus (17, 18, 96,100) et qu'il soit primordial d'utiliser des marqueurs adaptés à chaque type de tumeur.

Plusieurs études rapportent un intérêt potentiel de marqueurs mononucléotidiques au nombre élevé de répétitions (« *long mononucleotide repeats* » ou LMR) pour augmenter la sensibilité des tests dans les tumeurs non colorectales. (96, 102,103) Par exemple, le microsatellite BAT40, localisé dans un intron du gène de la $3-\beta$ -hydroxystéroide déshydrogénase et siège d'une répétition de 40 T, serait plus sensible que les marqueurs BAT25 et BAT26 dans les tumeurs urinaires. (100) Ce nouveau type de marqueur suscite l'intérêt de plusieurs sociétés comme celle de Promega®, qui a proposé en 2015 un panel « pan-cancer » constitué de 5 LMR. (102)

L'avènement ces dernières années du séquençage haut débit nous offre désormais la possibilité de séquencer de larges séquences (exome ou larges panels) et d'accroître le nombre de cibles potentielles d'instabilité. Par exemple, des séquençages réalisés à l'échelle de l'exome ont permis d'analyser jusqu'à 200 000 loci microsatellitaires dans plusieurs types de cancer. (33) Cependant, il n'existe pas à ce jour de réelle comparaison des performances des différents homopolymères testés (marqueurs mono, di ou tétra nucléotidiques), ni de consensus sur le nombre de marqueurs nécessaire pour établir un diagnostic de MSI pour un type tumoral donné. Nous avons récemment implémenté au sein du laboratoire un panel commercialisé par Illumina®, le TruSight Oncology 500 (ou TSO500), qui offre entre autres la possibilité via une seule technique de séquencer 523 gènes, d'analyser la charge mutationnelle et de rechercher l'instabilité microsatellitaire. (103) Cependant, en raison de son coût élevé, l'utilisation de ce type de panel restera réservée à des indications spécifiques. Pour rechercher l'instabilité microsatellitaire dans les échantillons tumoraux en routine, nous privilégierons l'utilisation d'un panel NGS plus restreint, d'où l'objectif dans ce travail d'étudier les performances des marqueurs consensuels en technique NGS.

E. Limites de l'étude

Notre étude présente plusieurs limites, la première étant la composition de notre population d'étude. En effet notre cohorte de 138 échantillons était composée uniquement de tumeurs MSI et d'aucune tumeur MSS, ce qui nous a limité pour le calcul des valeurs prédictives positives et négatives lors des différentes analyses. Elle était de plus constituée d'une majorité de tumeurs colorectales avec un degré d'instabilité marqué, possiblement responsable d'une surestimation des performances des marqueurs et des techniques évalués dans cette étude. Enfin, par manque de puissance nous n'avons pas pu analyser les performances des différents microsatellites et des différents panels dans chaque type tumoral. Cette analyse aurait été pourtant intéressante dans la mesure où d'autres types de tumeur comme les tumeurs endométriales ou urothéliales présentent fréquemment un degré d'instabilité plus faible et donc difficile à mettre en évidence. (95,99) Il aurait également été intéressant d'analyser des tumeurs moins fréquentes (grêle, voies biliaires...), pour lesquelles les données de la littérature restent à ce jour très limitées, voire absentes.

Nous n'avons malheureusement pas pu augmenter la taille de nos effectifs : en effet, nous avions envisagé d'allonger la période de recrutement et d'inclure des tumeurs non colorectales supplémentaires, ce qui n'a pas été possible en raison de l'abandon de la technique amplicon en 2019 au profit de la capture. Nous avions également envisagé de solliciter le CHU de Montpellier pour compléter notre cohorte avec des échantillons tumoraux de leur laboratoire, ce qui n'a pas non plus été possible puisque leurs échantillons ne sont pas analysés en parallèle en Pentaplex-PCR et que ces données étaient indispensables pour notre travail.

Cependant, le point fort de notre travail réside dans la très bonne caractérisation des échantillons de notre cohorte : tous les échantillons avaient été analysés en Pentaplex-PCR et en immunohistochimie (136/138) et nous disposions, quand c'était nécessaire, du statut de méthylation du promoteur de *MLH1*, du statut mutationnel de *BRAF* et des données de la consultation d'oncogénétique. Nos échantillons étaient donc très bien documentés, avec un statut MMR irréfutable. En revanche, les 54 ADN normaux avaient été analysés uniquement en NGS et pas en Pentaplex-PCR compte-tenu du coût et du temps technique que cela aurait représenté pour le laboratoire. Il en résulte donc une absence de données de référence pour des ADN normaux. Nous avons donc extrapolé ces données à partir des données obtenues manuellement en NGS, ce qui représente un biais méthodologique notable pour les analyses de sensibilité et spécificité.

Une autre limite, sur un plan méthodologique cette fois, réside dans l'utilisation de panels Pentaplex différents entre la PCR (panel avec NR24) et le NGS (panel avec NR27) : la comparaison des résultats entre les deux techniques peut donc être critiquable.

F. Perspectives

Les derniers changements opérés au sein du laboratoire, avec l'abandon de la technologie amplicon au profit de la capture et plus récemment, le changement de procédé de synthèse des sondes de capture ont mis un vrai coup de frein à la transposition de l'analyse MSI au NGS car il est nécessaire de revalider tout le processus d'analyse. Cela reste toujours notre priorité et une nouvelle étape de validation de cette technique sera réalisée dès que les ressources humaines du laboratoire le permettront.

Les résultats de notre étude, montrant notamment la supériorité du panel Hexaplex-NGS visà-vis du panel Pentaplex dans la détection de l'instabilité microsatellitaire en NGS, nous incite à l'avenir à privilégier l'emploi de ce panel à 6 marqueurs. De plus, en accord avec les futures recommandations de l'INCa⁵ nous appliquerons un seuil d'instabilité fixé à 3 marqueurs instables.

Néanmoins, la mise en évidence des moins bonnes performances du panel Hexaplex-NGS dans les tumeurs non colorectales souligne la nécessité de tester de nouveaux panels de microsatellites. Nous sommes actuellement en train de constituer un panel spécifiquement dédié à la recherche de l'instabilité microsatellitaire en NGS, qui inclut les microsatellites du panel Hexaplex-NGS, des LMR (BAT40, BAT52, BAT57...) et d'autres homopolymères ayant démontré de bonnes performances dans les tumeurs non colorectales. Nous prévoyons de le tester sur une cohorte d'échantillons de tumeurs variées. L'objectif sera d'identifier, pour chaque type tumoral, les marqueurs les plus performants pour détecter l'instabilité microsatel-

Nous allons également collaborer avec les équipes des CHU de Saint Antoine à Paris (Alex Duval), de Lille (Marie-Pierre Buisine) et de Poitiers (Lucie Karayan–Tapon) afin de mettre en commun nos ressources biologiques de tumeurs non colorectales rares et de tester différentes approches de détection de MSI par NGS.

 $^{^{\}rm 5}$ « Recommandations pour la recherche du statut MMR tumoral », INCa, en cours de publication

VI. <u>CONCLUSION</u>

Notre travail a permis de démontrer que l'analyse du marqueur HSP110 T17 (HT17) en PCR est sensible et spécifique pour le diagnostic d'instabilité microsatellitaire, en particulier dans les tumeurs colorectales. Ses performances diminuent dans le groupe des tumeurs non colorectales, ce qui réduit *a priori* son intérêt vis-à-vis de la Pentaplex-PCR. Des études supplémentaires portant sur de plus larges cohortes de tumeurs non colorectales restent néanmoins nécessaires afin de préciser sa supériorité ou son infériorité vis-à-vis des techniques de référence. D'autre part, son interprétation en deux temps (avec la mesure de ratios de hauteur de pics) rend son utilisation difficilement applicable en pratique de routine.

La méthode que nous avons appliquée dans ce travail pour détecter l'instabilité microsatellitaire par NGS s'est appuyée sur le logiciel MIAmS, qui a été développé dans notre laboratoire. Elle s'est avérée performante et a permis de retrouver un statut d'instabilité identique au statut PCR de l'échantillon dans la grande majorité des cas, notamment dans les tumeurs colorectales. Ce travail nous a aussi permis de tester deux panels (Pentaplex et Hexaplex) avec différents seuils d'instabilité et de valider le panel Hexaplex, en particulier dans les tumeurs non colorectales où il apparaît significativement plus sensible que le panel Pentaplex. Comme pour HT17, ces données nécessitent néanmoins d'être confirmées par d'autres études portant sur un plus grand nombre de tumeurs non colorectales. Les performances de MIAmS pour détecter l'instabilité d'un l'échantillon en NGS étaient significativement meilleures lorsque son apprentissage était basé sur le statut global de l'échantillon en PCR que sur le statut individuel des marqueurs. Cependant, la surreprésentation des tumeurs colorectales dans notre cohorte peut avoir biaisé l'apprentissage : il serait donc nécessaire de réaliser des études similaires à la nôtre, mais pour chaque type tumoral. Notre travail souligne la nécessité d'employer des cohortes avec un statut MMR très bien caractérisé dans chaque type tumoral pour la validation de nouveaux panels de microsatellites en NGS.

En conclusion, nous avons pu définir une méthodologie de validation du MSI en NGS par amplicon basée sur le logiciel MIAmS. Notre priorité à l'heure actuelle est d'adapter cette méthode d'analyse d'instabilité microsatellitaire à la technologie capture. L'autre objectif sera de définir pour chaque type tumoral le panel de microsatellites le plus sensible et le plus adapté en routine pour un diagnostic fiable d'instabilité microsa-

> Professeur Pierre BROUSSET Directeur du Département de Pathologie Institut Universitaire du Cancer Toulouse Oncopôle 1, av. Irène Jellot-Curie - 31059 Toulouse cedex 9 Tél. 05 31 15 61 41

tellitaire.

Vu permis d'imprime Le Doyen de la Faculié de Médecine Toulouse - Purpan

ant

Didier CARRIE

VII. <u>ANNEXES</u>

Microsatellite	Séquence de l'amorce
BAT25_F	TCGCCTCCAAGAATGTAAGT
BAT25_R	TCTGCATTTTAACTATGGCTC
BAT26_F	TGACTACTTTTGACTTCAGCC
BAT26_R	AACCAATCAACATTTTTAACCC
NR21_F	TAAATGTATGTCTCCCCTGG
NR21_R	ATTCCTACTCCGCATTCACA
NR22_F	GAGGCTTGTCAAGGACATAA
NR22_R	AATTCGGATGCCATCCAGTT
NR24_F	CCATTGCTGAATTTTACCTC
NR24_R	ATTGTGCCATTGCATTCCAA

Annexe 1 : Séquences des amorces forward (F) et reverse (R) utilisées pour la PCR Pentaplex.

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	05	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.Ź	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.Z	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	-

<u>Annexe 2</u> : Tailles alléliques de HT17 et des marqueurs du panel Pentaplex dans la population générale (Buhard et al, 2016).

Gènes	Exons / Hotspots	Transcrits de référence	Gènes	Exons / Hotspots	Transcrits de référence	
AKT1	3	NM_001014431	HIST1H3B	1	NM_003537	
ALK	20 à 25	NM_004304	HRAS	2, 3 et 4	NM_005343	
BRAF	11 et 15	NM_004333	IDH1	4	NM_005896	
CDKN2A	1, 2 et 3	NM_000077	IDH2	4	NM_002168	
CTNNB1	3	NM_001904	JAK2	12, 13 et 14	NM_004972	
DDR2	17	NM_006182	КІТ	8, 9, 11, 13, 17 et 18	NM_000222	
EGFR	18, 19, 20 et 21	NM_005228	KRAS	2, 3 et 4	NM_033360	
ERBB2	20	NM_004448	MAP2K1	2	NM_002755	
ERBB4	10 et 12	NM_005235	MET	14 à 20 Introns 13 et 14	NM_001127500	
FGFR1	12 et 14	NM_023110	NRAS	2, 3 et 4	NM_002524	
FGFR2	7, 12 et 14	NM_000141	PDGFRA	12, 14 et 18	NM_006206	
FGFR3	7, 9 et 14	NM_000142	РІКЗСА	10 et 21	NM_006218	
GNA11	4 et 5	NM_002067	POLE	9à14	NM_006231	
GNAQ	5	NM_002072	PTEN	1à9	NM_000314	
GNAS	8 et 9	NM_000516	RAC1	2	NM_018890	
H3F3A	2	NM_002107	SMAD4	2, 3, 9, 10, 11 et 12	NM_005359	
H3F3B	2	NM_005324	STK11	1à9	NM_000455	
Microsatel- lites	BAT25, BAT26, NR21, NR22, NR24, NR27, HT17		TERT	promoteur		

<u>Annexe 3</u> : Liste des cibles analysées sur panel Amplicon INCa-V2.

VIII. <u>BIBLIOGRAPHIE</u>

1. Liu D, Keijzers G, Rasmussen LJ. DNA mismatch repair and its many roles in eukaryotic cells. Mutat Res Mutat Res. 1 juill 2017;773:174-87.

2. Lahue RS, Au KG, Modrich P. DNA mismatch correction in a defined system. Science. 14 juill 1989;245(4914):160-4.

3. 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. 10 juin 1993;363(6429):558-61.

4. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. 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. 15 nov 1998;58(22):5248-57.

5. Acharya S, Wilson T, Gradia S, Kane MF, Guerrette S, Marsischky GT, et al. hMSH2 forms specific mispair-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. Proc Natl Acad Sci U S A. 26 nov 1996;93(24):13629-34.

6. Kadyrov FA, Dzantiev L, Constantin N, Modrich P. Endonucleolytic Function of MutLα in Human Mismatch Repair. Cell. 28 juill 2006;126(2):297-308.

7. Perucho M. Correspondence re: C. R. Boland et al. 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., 58: 5248–5257, 1998. Cancer Res. 1 janv 1999;59(1):249-56.

8. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. J Natl Cancer Inst. 18 févr 2004;96(4):261-8.

9. Yuasa Y. Frequent Somatic Mutations of hMSH3 with Reference to Microsatellite Instability in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancers.

10. Suraweera N, Duval A, Reperant M, Vaury C, Furlan D, Leroy K, et al. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. Gastroenterology. déc 2002;123(6):1804-11.

11. Buhard O, Cattaneo F, Wong YF, Yim SF, Friedman E, Flejou J-F, et al. Multipopulation analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability status of human tumors. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 10 janv 2006;24(2):241-51.

12. Buhard O, Suraweera N, Lectard A, Duval A, Hamelin R. Quasimonomorphic Mononucleotide Repeats for High-Level Microsatellite Instability Analysis. Dis Markers. 2004;20(4-5):251-7.

13. Wang Y, Shi C, Eisenberg R, Vnencak-Jones CL. Differences in Microsatellite Instability Profiles between Endometrioid and Colorectal Cancers: A Potential Cause for False-Negative Results? J Mol Diagn. 2017;Jan;19(1):57-64.

14. Lee M, Chun SM, Sung CO, Kim SY, Kim TW, Jang SJ, et al. Clinical Utility of a Fully Automated Microsatellite Instability Test with Minimal Hands-on Time. J Pathol Transl Med. 2019;(v;53(6):386-392).

15. Susanti S, Fadhil W, Ebili HO, Asiri A, Nestarenkaite A, Hadjimichael E, et al. N_LyST: a simple and rapid screening test for Lynch syndrome. J Clin Pathol. août 2018;71(8):713-20.

16. Danjoux M, Guimbaud R, Al Saati T, Meggetto F, Carrère N, Portier G, et al. Contribution of microdissection for the detection of microsatellite instability in colorectal cancer. Hum Pathol. mars 2006;37(3):361-8.

17. You J-F, Buhard O, Ligtenberg MJL, Kets CM, Niessen RC, Hofstra RMW, et al. Tumours with loss of MSH6 expression are MSI-H when screened with a pentaplex of five mononucleotide repeats. Br J Cancer. 7 déc 2010;103(12):1840-5.

18. Kuismanen SA, Moisio A-L, Schweizer P, Truninger K, Salovaara R, Arola J, et al. Endometrial and Colorectal Tumors from Patients with Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer Display Different Patterns of Microsatellite Instability. Am J Pathol. juin 2002;160(6):1953-8.

19. Mongiat-Artus P, Miquel C, Van der Aa M, Buhard O, Hamelin R, Soliman H, et al. Microsatellite instability and mutation analysis of candidate genes in urothelial cell carcinomas of upper urinary tract. Oncogene. mars 2006;25(14):2113-8.

20. Idylla MSI Test | Biocartis [Internet]. [cité 18 avr 2021]. Disponible sur: https://www.biocartis.com/en/meet-idylla/idylla-oncology-assays/idylla-msi-test

21. Samaison L, Grall M, Staroz F, Uguen A. Microsatellite instability diagnosis using the fully automated Idylla platform: feasibility study of an in-house rapid molecular testing ancillary to immunohistochemistry in pathology laboratories. J Clin Pathol. 1 déc 2019;72(12):830-5.

22. Zwaenepoel K, Holmgaard Duelond J, De Winne K. Clinical Performance of the Idylla MSI Test for a Rapid Assessment of the DNA Microsatellite Status in Human Colorectal Cancer.

23. Li X, Wang Y, Li X. Evaluation of a Fully Automated Idylla Test System for Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. Clin Colorectal Cancer. 1 déc 2019;18(4):e316-23.

24. Lee M, Chun S-M, Sung CO, Kim SY, Kim TW, Jang SJ, et al. Clinical Utility of a Fully Automated Microsatellite Instability Test with Minimal Hands-on Time. J Pathol Transl Med. 11 oct 2019;53(6):386-92.

25. Pécriaux A, Favre L, Calderaro J, Charpy C, Derman J, Pujals A. Detection of microsatellite instability in a panel of solid tumours with the Idylla MSI Test using extracted DNA. J Clin Pathol. 1 janv 2021;74(1):36-42.

26. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. déc 1977;74(12):5463-7.

27. Recommandations professionnelles • ANPGM [Internet]. 2014 [cité 5 févr 2021]. Disponible sur: https://anpgm.fr/recommandations-professionnelles/

28. Salipante SJ, Scroggins SM, Hampel HL, Turner EH, Pritchard CC. Microsatellite Instability Detection by Next Generation Sequencing. Clin Chem. 1 sept 2014;60(9):1192-9.

29. Middha S, Zhang L, Nafa K, Jayakumaran G, Wong D, Kim HR, et al. Reliable Pan-Cancer Microsatellite Instability Assessment by Using Targeted Next-Generation Sequencing Data. JCO Precis Oncol. 2017;2017.

30. Niu B, Ye K, Zhang Q, Lu C, Xie M, McLellan MD, et al. MSIsensor: microsatellite instability detection using paired tumor-normal sequence data. Bioinformatics. 1 avr 2014;30(7):1015-6.

31. Kautto EA, Bonneville R, Miya J, Yu L, Krook MA, Reeser JW, et al. Performance evaluation for rapid detection of pan-cancer microsatellite instability with MANTIS. Oncotarget. 12 déc 2016;8(5):7452-63.

32. Zhao L, Shan G, Li L, Yu Y, Cheng G, Zheng X. A robust method for the rapid detection of microsatellite instability in colorectal cancer. Oncol Lett. août 2020;20(2):1982-8.

33. Hause RJ, Pritchard CC, Shendure J, Salipante SJ. Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types. Nat Med. nov 2016;22(11):1342-50.

34. Health C for D and R. List of Cleared or Approved Companion Diagnostic Devices (In Vitro and Imaging Tools) [Internet]. FDA. FDA; 2021 [cité 18 avr 2021]. Disponible sur: https://www.fda.gov/medical-devices/in-vitro-diagnostics/list-cleared-or-approved-companion-diagnostic-devices-in-vitro-and-imaging-tools

35. Escudié F, Van Goethem C, Grand D, Vendrell J, Vigier A, Brousset P, et al. MIAmS: microsatellite instability detection on NGS amplicons data. Bioinforma Oxf Engl. 24 oct 2019;

36. Weisenberg. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer | Nature Genetics [Internet]. [cité 7 avr 2021]. Disponible sur: https://www.nature.com/articles/ng1834

37. Ollikainen M, Abdel-Rahman WM, Moisio A-L, Lindroos A, Kariola R, Järvelä I, et al. Molecular Analysis of Familial Endometrial Carcinoma: A Manifestation of Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer or a Separate Syndrome? J Clin Oncol. 20 juill 2005;23(21):4609-16.

38. Knudson AG. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. Proc Natl Acad Sci U S A. avr 1971;68(4):820-3.

39. Plazzer J, Sijmons RH, Woods MO, Peltomaki P. The InSiGHT database: utilizing 100 years of insights into Lynch Syndrome. Fam Cancer. 1 juin 2013;

40. Lynch HT, Snyder CL, Shaw TG, Heinen CD, Hitchins MP. Milestones of Lynch syndrome: 1895–2015. Nat Rev Cancer. mars 2015;15(3):181-94.

41. Bansidhar BJ. Extracolonic Manifestations of Lynch Syndrome. Clin Colon Rectal Surg. juin 2012;25(2):103-10.

42. Watson P, Vasen HFA, Mecklin J-P, Bernstein I, Aarnio M, Järvinen HJ, et al. The Risk of Extra-colonic, Extra-endometrial Cancer in the Lynch Syndrome. Int J Cancer J Int Cancer. 15 juill 2008;123(2):444-9.

43. Lin-Hurtubise KM, Yheulon CG, Gagliano RA, Lynch HT. Excess of extracolonic nonendometrial multiple primary cancers in MSH2 germline mutation carriers over MLH1. J Surg Oncol. 2013;108(7):433-7.

44. Ramsoekh D, van Leerdam ME, Wagner A, Kuipers EJ, Steyerberg EW. Mutation prediction models in Lynch syndrome: evaluation in a clinical genetic setting. J Med Genet. 1 nov 2009;46(11):745.

45. Vasen HFA, Watson P, Mecklin J, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. Gastroenterology. 1 juin 1999;116(6):1453-6.

46. Vasen HFA, Blanco I, Aktan-Collan K, Gopie JP, Alonso A, Aretz S, et al. Revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): recommendations by a group of European experts. Gut. juin 2013;62(6):812-23.

47. Pearlman R, Haraldsdottir S, de la Chapelle A, Jonasson JG, Liyanarachchi S, Frankel WL, et al. Clinical Characteristics of Colorectal Cancer Patients with Double Somatic Mismatch Repair Mutations Compared to Lynch Syndrome. J Med Genet. juill 2019;56(7):462-70.

48. Sourrouille I, Coulet F, Lefevre JH, Colas C, Eyries M, Svrcek M, et al. Somatic mosaicism and double somatic hits can lead to MSI colorectal tumors. Fam Cancer. 1 mars 2013;12(1):27-33.

49. Mensenkamp AR, Vogelaar I, Van Zilst-Stams WAG. Somatic Mutations in MLH1 and MSH2 Are a Frequent Cause of Mismatch-Repair Deficiency in Lynch Syndrome-Like Tumors.

50. Haraldsdottir S, Hampel H, Tomsic J, Frankel WL, Pearlman R, de la Chapelle A, et al. Colon and Endometrial Cancers with Mismatch Repair Deficiency can Arise from Somatic, Rather Than Germline, Mutations. Gastroenterology. déc 2014;147(6):1308-1316.e1.

51. Geurts-Giele WR, Leenen CH, Dubbink HJ, Meijssen IC, Post E, Sleddens HF, et al. Somatic aberrations of mismatch repair genes as a cause of microsatellite-unstable cancers. J Pathol. 1 déc 2014;234(4):548-59.

52. Lefol C, Sohier E, Baudet C, Naïbo P, Ruano E, Grand-Masson C, et al. Acquired somatic MMR deficiency is a major cause of MSI tumor in patients suspected for "Lynch-like syndrome" including young patients. Eur J Hum Genet. 5 déc 2020;1-7.

53. Morak M, Heidenreich B, Keller G, Hampel H, Laner A, de la Chapelle A, et al. Biallelic MUTYH mutations can mimic Lynch syndrome. Eur J Hum Genet. nov 2014;22(11):1334-7.

54. Lefevre JH, Colas C, Coulet F, Bonilla C, Mourra N, Flejou J-F, et al. MYH biallelic mutation can inactivate the two genetic pathways of colorectal cancer by APC or MLH1 transversions. Fam Cancer. 1 déc 2010;9(4):589-94. 55. Colebatch A, Hitchins M, Williams R, Meagher A, Hawkins NJ, Ward RL. The role of MYH and microsatellite instability in the development of sporadic colorectal cancer. Br J Cancer. 6 nov 2006;95(9):1239-43.

56. Cleary SP, Cotterchio M, Jenkins MA, Kim H, Bristow R, Green R, et al. Germline MutY Human Homologue Mutations and Colorectal Cancer: A Multisite Case-Control Study. Gastroenterology. avr 2009;136(4):1251-60.

57. Castillejo A, Vargas G, Castillejo M-I. Prevalence of germline MUTYH mutations among Lynch-like syndrome patients. Eur J Cancer. 1 sept 2014;50(13):2241-50.

58. Pearlman R, Frankel WL, Swanson B, Zhao W, Yilmaz A, Miller K, et al. Prevalence and Spectrum of Germline Cancer Susceptibility Gene Mutations Among Patients With Early-Onset Colorectal Cancer. JAMA Oncol. 1 avr 2017;3(4):464-71.

59. Elsayed FA, Kets CM, Ruano D, van den Akker B, Mensenkamp AR, Schrumpf M, et al. Germline variants in POLE are associated with early onset mismatch repair deficient colorectal cancer. Eur J Hum Genet. août 2015;23(8):1080-4.

60. Palles C, Cazier J-B, Howarth KM, Domingo E, Jones AM, Broderick P, et al. Germline mutations affecting the proofreading domains of POLE and POLD1 predispose to colorectal adenomas and carcinomas. Nat Genet. févr 2013;45(2):136-44.

61. Yoshida R, Miyashita K, Inoue M, Shimamoto A, Yan Z, Egashira A, et al. Concurrent genetic alterations in DNA polymerase proofreading and mismatch repair in human colorectal cancer. Eur J Hum Genet. mars 2011;19(3):320-5.

62. INCa. Tests somatiques recherchant une déficience du système MMR au sein des tumeurs du spectre du syndrome de Lynch [Internet]. [cité 29 janv 2021]. Disponible sur: https://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Tests-somatiquesrecherchant-une-deficience-du-systeme-MMR-au-sein-des-tumeurs-du-spectre-du-syndrome-de-Lynch

63. Zaanan A, Bouché O, Benhaim L, Buecher B, Chapelle N, Dubreuil O, et al. Gastric cancer: French intergroup clinical practice guidelines for diagnosis, treatments and follow-up (SNFGE, FFCD, GERCOR, UNICANCER, SFCD, SFED, SFRO). Dig Liver Dis. août 2018;50(8):768-79.

64. Ribas A, Wolchok JD. Cancer Immunotherapy Using Checkpoint Blockade. Science. 23 mars 2018;359(6382):1350-5.

65. Dudley JC, Lin M-T, Le DT, Eshleman JR. Microsatellite Instability as a Biomarker for PD-1 Blockade. Clin Cancer Res. 15 févr 2016;22(4):813.

66. Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulakh LK, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. Science. 28 juill 2017;357(6349):409-13.

67. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1500596. Massachusetts Medical Society; 2015.

68. Le Flahec G, Badic B, Guibourg B, Doucet L. Mismatch repair–deficient colorectal cancer: a model of immunogenic and immune cell–rich tumor despite nonsignificant programmed cell death ligand-1 expression in tumor cells.

69. FDA approves first cancer treatment for any solid tumor with a specific genetic feature | FDA [Internet]. [cité 1 févr 2021]. Disponible sur: https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-cancer-treatment-any-solid-tumor-specific-genetic-feature

70. Overman MJ, Lonardi S, Wong KYM. Durable Clinical Benefit With Nivolumab Plus Ipilimumab in DNA Mismatch Repair–Deficient/Microsatellite Instability–High Metastatic Colorectal Cancer.

71. Bouffet E, Larouche V, Campbell BB, Merico D, de Borja R, Aronson M, et al. Immune Checkpoint Inhibition for Hypermutant Glioblastoma Multiforme Resulting From Germline Biallelic Mismatch Repair Deficiency. J Clin Oncol. 21 mars 2016;34(19):2206-11. 72. Castro MP, Goldstein N. Mismatch repair deficiency associated with complete remission to combination programmed cell death ligand immune therapy in a patient with sporadic urothelial carcinoma: immunotheranostic considerations. J Immunother Cancer. 15 déc 2015;3.

73. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, et al. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non–small cell lung cancer. Science. 3 avr 2015;348(6230):124-8.

74. Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, Heijden MS van der, Balar AV, Necchi A, et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. The Lancet. 7 mai 2016;387(10031):1909-20.

75. Snyder A, Makarov V, Merghoub T, Yuan J, Zaretsky JM, Desrichard A, et al. Genetic Basis for Clinical Response to CTLA-4 Blockade in Melanoma. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1406498. Massachusetts Medical Society; 2014.

76. Patel SP, Kurzrock R. PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. Mol Cancer Ther. 1 avr 2015;14(4):847-56.

77. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non–Small-Cell Lung Cancer. http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1507643. Massachusetts Medical Society; 2015.

78. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder JP, et al. Pembrolizumab for the Treatment of Non–Small-Cell Lung Cancer. http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1501824. Massachusetts Medical Society; 2015.

79. Taube JM, Klein A, Brahmer JR, Xu H, Pan X, Kim JH, et al. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 1 oct 2014;20(19):5064-74.

80. Storm FK, Mahvi DM, Gilchrist KW. Heat shock protein 27 overexpression in breast cancer lymph node metastasis. Ann Surg Oncol. 1 nov 1996;3(6):570-3.

81. Slaby O, Sobkova K, Svoboda M, Garajova I, Fabian P, Hrstka R, et al. Significant overexpression of Hsp110 gene during colorectal cancer progression. Oncol Rep. mai 2009;21(5):1235-41.

82. Kai M, Nakatsura T, Egami H, Senju S, Nishimura Y, Ogawa M. Heat shock protein 105 is overexpressed in a variety of human tumors. Oncol Rep. 1 nov 2003;10(6):1777-82.

83. Collura A, Lagrange A, Svrcek M, Marisa L, Buhard O, Guilloux A, et al. Patients with colorectal tumors with microsatellite instability and large deletions in HSP110 T17 have improved response to 5-fluorouracil–based chemotherapy. Gastroenterology. févr 2014;146(2):401-411.e1.

84. Kim JH, Kim K-J, Rhee Y-Y, Oh S, Cho N-Y, Lee HS, et al. Expression status of wild-type HSP110 correlates with HSP110 T17 deletion size and patient prognosis in microsatellite-unstable colorectal cancer. Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc. mars 2014;27(3):443-53.

85. Dorard C, de Thonel A, Collura A, Marisa L, Svrcek M, Lagrange A, et al. Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. Nat Med. 25 sept 2011;17(10):1283-9.

86. Buhard O, Lagrange A, Guilloux A, Colas C, Chouchène M, Wanherdrick K, et al. HSP110 T17 simplifies and improves the microsatellite instability testing in patients with colorectal cancer. J Med Genet. 2016;53(6):377-84.

87. Markovic S, Antic J, Dimitrijevic I, Zogovic B, Bojic D, Svorcan P, et al. Microsatellite instability affecting the T17 repeats in intron 8 of HSP110, as well as five mononucleotide repeats in patients with colorectal carcinoma. Biomark Med. 1 août 2013;7(4):613-21.

88. Berardinelli GN, Scapulatempo-Neto C, Durães R, Antônio de Oliveira M, Guimarães D, Reis RM. Advantage of HSP110 (T17) marker inclusion for microsatellite instability (MSI) detection in colorectal cancer patients. Oncotarget. 19 juin 2018;9(47):28691-701.

89. Kim T-M, Laird PW, Park PJ. The Landscape of Microsatellite Instability in Colorectal and Endometrial Cancer Genomes. Cell. 7 nov 2013;155(4).

90. Kim K-J, Lee TH, Kim JH, Cho N-Y, Kim WH, Kang GH. Deletion in HSP110 T17: correlation with wild-type HSP110 expression and prognostic significance in microsatellite-unstable advanced gastric cancers. Hum Pathol. 1 sept 2017;67:109-18.

91. Vanderwalde A, Spetzler D, Xiao N, Gatalica Z, Marshall J. Microsatellite instability status determined by next-generation sequencing and compared with PD-L1 and tumor mutational burden in 11,348 patients. Cancer Med. 13 févr 2018;7(3):746-56.

92. Bonneville R, Krook MA, Chen H-Z, Smith A, Samorodnitsky E, Wing MR, et al. Detection of microsatellite instability biomarkers via next-generation sequencing. Methods Mol Biol Clifton NJ. 2020;2055:119-32.

93. Johansen AFB, Kassentoft CG, Knudsen M, Laursen MB, Madsen AH, Iversen LH, et al. Validation of computational determination of microsatellite status using whole exome sequencing data from colorectal cancer patients. BMC Cancer. 21 oct 2019;19.

94. Berginc G, Glavac D. Rapid and accurate approach for screening of microsatellite unstable tumours using quasimonomorphic mononucleotide repeats and denaturating high performance liquid chromatography (DHPLC). Dis Markers. 2009;26(1):19-26.

95. Pagin A, Zerimech F, Leclerc J, Wacrenier A, Lejeune S, Descarpentries C, et al. Evaluation of a new panel of six mononucleotide repeat markers for the detection of DNA mismatch repair-deficient tumours. Br J Cancer. 28 mai 2013;108(10):2079-87.

96. Goel A, Nagasaka T, Hamelin R, Boland CR. An optimized pentaplex PCR for detecting DNA mismatch repair-deficient colorectal cancers. PloS One. 24 févr 2010;5(2):e9393.

97. Duval A, Hamelin R. Mutations at Coding Repeat Sequences in Mismatch Repairdeficient Human Cancers: Toward a New Concept of Target Genes for Instability. Cancer Res. 1 mai 2002;62(9):2447-54.

98. Kim T-M, Park PJ. A genome-wide view of microsatellite instability: old stories of cancer mutations revisited with new sequencing technologies. Cancer Res. 15 nov 2014;74(22):6377-82.

99. Wong YF, Cheung TH, Lo KWK, Yim SF, Chan LKY, Buhard O, et al. Detection of microsatellite instability in endometrial cancer: advantages of a panel of five mononucleotide repeats over the National Cancer Institute panel of markers. Carcinogenesis. mai 2006;27(5):951-5.

100. Hartmann A, Zanardo L, Bocker-Edmonston T, Blaszyk H, Dietmaier W, Stoehr R, et al. Frequent Microsatellite Instability in Sporadic Tumors of the Upper Urinary Tract. Cancer Res. 1 déc 2002;62(23):6796-802.

101. Dietmaier W, Büttner R, Rüschoff J. [Microsatellite instability: Review of methods and applications]. Pathol. mai 2019;40(3):313-27.

102. Bacher JW, Sievers CK, Albrecht DM, Grimes IC, Weiss JM, Matkowskyj KA, et al. Improved Detection of Microsatellite Instability in Early Colorectal Lesions. PLoS ONE. 7 août 2015;10(8).

103. TruSight Oncology 500 Assay | For pan-cancer biomarkers in DNA and RNA [Internet]. [cité 20 avr 2021]. Disponible sur: https://www.illumina.com/products/by-type/clinical-researchproducts/trusight-oncology-500.html

RESUME EN ANGLAIS

Microsatellite instability (MSI) is a biomarker of interest in oncology. Standard methods for MSI detection in tumors are immunohistochemical (IHC) analysis of MMR proteins and PCR testing with a panel of 5 microsatellites (Pentaplex). However, new molecular markers, as well as new technologies as NGS, are needed to improve diagnosis of MSI. The aims of our study were to evaluate, in a cohort of 138 MSI tumors of various origin, the performances of a new marker, HSP110 T17 (HT17), and of the NGS sequencing using a bioinformatics tool (MIAmS) specifically developed for MSI analysis. Using PCR, HT17 performed better in colorectal cancer (CRC) than in non-colorectal cancer (non-CRC) (100% vs 85,7%) and did not improve MSI diagnosis compared to the Pentaplex panel. MSI detection with NGS using MIAmS and Pentaplex panel was reliable, with better performances in CRC and when applying a global sample status-based learning than an individual microsatellite status-based learning. In non-CRC tumors, Hexaplex panel (Pentaplex + HT17) worked significantly better than the Pentaplex panel to detect MSI. In the future, we plan to test additional microsatellite markers to determine specific panels for each tumor type.
EVALUATION DES PERFORMANCES DU MARQUEUR HSP110 T17 ET DE LA TECHNIQUE NGS DANS LA DETECTION DE L'INSTABILITE MICROSATELLITAIRE

RESUME EN FRANÇAIS :

L'instabilité microsatellitaire (MSI) est un marqueur d'intérêt majeur en cancérologie et se recherche par immunohistochimie des protéines MMR et en PCR avec un panel de 5 microsatellites (Pentaplex). Il est cependant nécessaire de disposer de nouveaux marqueurs microsatellitaires et de transposer la technique en NGS. Dans ce travail, nous avons évalué les performances d'un nouveau marqueur, HSP110 T17 (HT17), et de la technique NGS-Amplicon avec le logiciel MIAmS dédié au diagnostic de MSI, dans une cohorte de 138 tumeurs MSI d'origine variée. En PCR, HT17 était plus sensible dans les cancers colorectaux (CCR) que non-colorectaux (non-CCR) (100% vs 85,7%) et n'améliorait pas le diagnostic vis-à-vis du panel Pentaplex. Le diagnostic de MSI en NGS avec MIAmS et le panel Pentaplex était fiable et significativement plus performant avec un apprentissage basé sur le statut global PCR de l'échantillon que sur le statut individuel de chaque marqueur, et dans les CCR. Dans les autres tumeurs, le panel Hexaplex (Pentaplex+HT17) était significativement meilleur que le panel Pentaplex pour le diagnostic de MSI. L'objectif à l'avenir sera de tester d'autres microsatellites afin d'établir des panels de marqueurs spécifiques et adaptés à chaque type tumoral.

TITRE EN ANGLAIS : Performance evaluation of HSP110 T17 marker and NGS approach in the detection of microsatellite instability.

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Médecine spécialisée clinique

MOTS-CLÉS : instabilité microsatellitaire - HSP110 T17 - Lynch – NGS – Pentaplex - Système MMR - machine learning – cancer colorectal

INTITULÉ ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

Université Toulouse III-Paul Sabatier Faculté de médecine Toulouse-Purpan, 37 Allées Jules Guesde 31000 Toulouse