THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE - PARIS VI

École doctorale : Physiologie, physiopathologie et thérapeutique
Spécialité : Génétique des tumeurs

Induction d'un Processus d'Instabilité des Microsatellites du Génome dans des Modèles Murin et Cellulaire : Intérêt Physiopathologique et Clinique

Présentée par
Sahra BODO

Pour l'obtention du grade de DOCTEUR
de l'Université Pierre et Marie Curie

Soutenue publiquement le 20 Octobre 2014,
Devant un jury composé de :

Pr Dominique HIGUET	Président
Dr Céline GONGORA	Rapporteur
Pr Martine RAPHAËL	Rapporteur
Dr Laurence BRUGIÈRES	Examinatrice
Pr Hein te RIELE	Examinateur
Dr Alex DUVAL	Directeur d'équipe
Dr Martine MULERIS	Directrice de thèse

THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE - PARIS VI

École doctorale : Physiologie, physiopathologie et thérapeutique
Spécialité : Génétique des tumeurs

Induction d'un Processus d'Instabilité des Microsatellites du Génome dans des Modèles Murin et Cellulaire : Intérêt Physiopathologique et Clinique

Présentée par
Sahra BODO

Pour l'obtention du grade de DOCTEUR
de l'Université Pierre et Marie Curie

Soutenue publiquement le 20 Octobre 2014,
Devant un jury composé de :

Pr Dominique HIGUET	Président
Dr Céline GONGORA	Rapporteur
Pr Martine RAPHAËL	Rapporteur
Dr Laurence BRUGIÈRES	Examinatrice
Pr Hein te RIELE	Examinateur
Dr Alex DUVAL	Directeur d'équipe
Dr Martine MULERIS	Directrice de thèse

Adresse du laboratoire :

Centre de Recherche Saint-Antoine

Hôpital Saint-Antoine

Bâtiment Raoul Kourilsky

184, rue du faubourg Saint-Antoine

75571 PARIS Cedex 12

Remerciements

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à ma directrice de thèse, Martine Muleris, pour son encadrement très impliqué dans mon travail de thèse, ainsi que pour m'avoir permis de profiter pleinement de cette expérience, en m'encourageant à m'impliquer dans les activités d'animation scientifique en tant que co-organisatrice des journées de l'école doctorale et des doc/post-doc de Saint-Antoine.

Je remercie également Alex Duval, de m'avoir accueillie au sein de son équipe « Instabilité des Microsatellites et Cancer » du centre de recherche Saint-Antoine, et pour les moyens qu'il donne à son équipe afin de travailler dans les meilleures conditions.

Mes remerciements vont aux membres de mon jury: le Pr Dominique Higuet, pour avoir accepter de présider cette soutenance de thèse, le Pr Martine Raphaël et le Dr Céline Gongora, pour avoir accepter la lourde tâche de rapporteur, ainsi que mes examinateurs le Pr Hein te Riele et le Dr Laurence Brugières, de leur participation à cette soutenance de thèse.

Je remercie également l'ensemble des membres de mon équipe : Richard Hamelin, pour tes questions toujours très pertinentes aux réunions MSI et ton sens de l'humour; Thécla Lesuffleur, pour ta rigueur dans le travail et pour m'avoir fait profiter de ta grande expérience en culture cellulaire; Chrystelle Colas, de m'avoir fait passer l'autre côté du miroir en me permettant d'assister à ces consultations; Olivier, le premier des OPK3, pour les conseils techniques; Patricia, pour ta gentillesse et pour avoir partager mon fardeau des génotypage de souris; Kristell, pour le ravitaillement en caféine ce qui constitue un apport significatif à mes travaux de recherche; les inséparables Ada et Anaïs, je nous revois il y a trois ans aller chercher les résultats du concours de l'ED, bonne continuation pour la suite de ta thèse; Nizar, merci pour cette belle rencontre; Philippe, tu m'a prise sous ton aille à mon arrivée au labo, je garde un excellent souvenir de cette période de stage de Master à tes côté; Mouna, que j'ai découvert depuis peu et avec qui j'ai eu plaisir à partager un bout de paillasse; Marie-Annick, pour m'avoir permis de toujours travailler dans les meilleures conditions, merci pour tes attentions. Camille, ça a été un réel plaisir d'encadrer ton stage de BTS, tu t'es montrée très vite autonome. Dilleta, en très peu de temps tu m'as fait une très forte impression et nos échanges me manquent. Merci à tous pour ce travail d'équipe, et pour les fameuses réunions MSI.

Merci au ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche qui a financé cette thèse.

Merci également aux patients et à leurs familles, pour leur confiance.

Un grand merci à l'ensemble du service d'anatomie et de cytologie pathologiques du petit animal dirigé par Jean-François Fléjou, et en particulier Sylvie Dumond et Magali Svrcek, pour leur contribution à mes travaux de thèse dans les analyses histologiques.

Ainsi qu'à la plateforme d'hébergement et d'expérimentation animale, pour leur aide dans la gestion des lignées murines. Tatiana Ledent qui dirige cette plateforme, merci pour ton souci du bien-être des animaux, je te souhaite le meilleur dans tes projets à venir et je sais que tu mettras tout en oeuvre pour y parvenir. Laetitia, maintenant tu es experte en prélèvement d'organe, et je suis ravie de savoir que j'y suis un peu pour quelque chose.

Dans une thèse, il y a certes l'équipe et puis il y a des rencontres à l'échelle du centre: merci à tous les doctorants ceux qui sont déjà parti, je pense notamment à Fatiha pour ses pauses toujours très distrayantes, et ceux qui sont toujours là et qui participent à la bonne ambiance quotidienne, j'ai été honorée d'être votre représentante des doctorants au sein du Conseil du CdR. Vanessa, parce qu'il y a eu beaucoup de première fois, et que si je te dis que nous avons partagé plein de bons moments toutes les deux, je suis certaine que tu me diras que « c'est pas faux ». Et parce que deux fois n'y sufise pas, mille fois merci, Dylla, tu as été pour moi une véritable amie.

Un grand merci à ma bouffée d'oxygène, un groupe d'amis comme vous c'est très précieux et j'en suis consciente: Steph et Mathurin, Emilie et Thibault, Syx, Antoine, Séb, Laeti et J-B. Merci pour tous ces bons moments de décompressions. Je vous souhaite à tous le meilleur dans vos projets respectifs.

A ma famille, je ne suis pas certaine de pouvoir en quelques mots vous exprimer toute ma gratitude mais disons que ça approche d'autant qu'il y a de grain de sable sur terre et d'étoiles dans le ciel. A ma petite maman adorée, merci pour ton soutien sans faille, tu es à l'origine de tout ceci. A mon frère pendant ces trois années, on a passé beaucoup de temps à se dire au revoir sur les quais de gare, je sais que je peux toujours compter sur toi pour partager mes joies et mes peines, merci pour ta patience. A mon papounet, merci pour tous ces merveilleux souvenir de voyages, et merci de faire toujours ton maximum pour contenter mes requêes les plus bizarres. Je vous remercie tous les trois et par extension tous les membres de notre famille pour votre soutien et vos encouragements.

Résumé

L'inactivation du système MMR (*mismatch repair* ou réparation des mésappariements de bases de l'ADN) favorise un processus oncogénique d'instabilité des séquences répétées microsatellites du génome (MSI, *microsatellite instability*). Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à l'induction d'un processus MSI d'une part dans un modèle murin, afin de démontrer l'impact oncogénique de l'azathioprine (Aza), un immunosuppresseur fréquemment utilisé en clinique; et d'autre part, dans un modèle cellulaire de lignées lymphoblastoïdes, dans le but d'améliorer le diagnostic du syndrome CMMRD (*constitutional MMR deficiency*), un syndrome rare de prédisposition aux cancers MSI.

Des études ont rapporté une association entre la prise d'Aza au long terme, et l'émergence de tumeurs MSI rares et tardives, chez les patients. Cette molécule a une toxicité cellulaire médiée par l'activité du système MMR et conduit, à forte dose, à une induction massive de tumeurs MSI chez des souris génétiquement prédisposées à ce type de cancer. Dans cette partie de mon travail, j'ai cherché à évaluer précisément le risque lié à la prise d'Aza, en comparaison avec la ciclosporine A, un immunosuppresseur dont le mode d'action est indépendant du système MMR, pour l'induction de tumeurs MSI iatrogènes. Au cours d'une étude dose-réponse, j'ai pu observer l'émergence de rares lymphomes MSI, de survenue tardive, chez la souris de génotype sauvage traitée par l'Aza, mais pas par la ciclosporine A. Au total, mes résultats permettent d'établir *in vivo* que l'Aza est un facteur risque pour l'émergence de tumeurs MSI, qui persiste en l'absence de prédisposition à ce type tumoral (souris de génotype sauvage) dans le contexte d'une exposition prolongée au traitement, à l'instar de ce qui est observé chez les patients traités au long cours avec cette molécule.

Dans le deuxième axe de ma thèse, je me suis intéressée au syndrome CMMRD, une prédisposition majeure à la survenue précoce de cancers MSI (hémopathies, tumeurs cérébrales, coliques, …). Les patients atteints sont porteurs de mutations germinales bialléliques d'un gène MMR, et sont diagnostiqués grâce à l'analyse génétique constitutionnelle, une méthode insatisfaisante qui s'avère non contributive en cas de détection de variants de signification biologique inconnue. Dans ce contexte, j'ai développé une méthode fonctionnelle de dépistage du syndrome CMMRD chez les sujets à risque. Elle repose sur l'hypothèse que deux caractéristiques phénotypiques déjà rapportées dans les cellules tumorales MMR-déficientes, le phénotype MSI et la tolérance à certains agents génotoxiques, sont également présentes dans les tissus sains de patients CMMRD (cellules lymphoïdes en culture). Au total, mes travaux proposent une approche fonctionnelle, non invasive, sensible et spécifique pour le diagnostic des patients CMMRD, qui est susceptible de répondre aux limites de l'analyse génétique constitutionnelle.

Mots clés : mismatch repair, instabilité des microsatellites, cancer, syndrome CMMRD, test diagnostique, azathioprine.

Abstract

Inactivation of the DNA mismatch repair system (MMR) promotes an oncogenic process of microsatellite instability (MSI). During my thesis, I was interested in the induction of an MSI process (i) in a mouse model, in order to demonstrate the oncogenic impact of azathioprine (Aza), an immunosuppressive drug frequently used in humans, and (ii) in a cellular model of lymphoblastoid cell lines, to improve the diagnosis of a rare predisposition syndrome to MSI cancers, termed the constitutional MMR deficiency syndrome (CMMRD).

Epidemiological studies reported an association between long-term Aza treatment and emergence of rare MSI tumors of late-onset in patients. The cellular toxicity of Aza is known to be mediated by the MMR system and in a previous study, the team demonstrated that Aza induces a massive emergence of MSI tumors in mice genetically predisposed to this type of cancers, when used at at high doses. In the first part of my work, I have accurately assessed the risk associated with Aza intake, compared to cyclosporine A, an immunosuppressant whose mode of action is independent of the MMR system, for the induction of iatrogenic MSI tumors. In the course of a dose-response study, I observed the emergence of rare MSI lymphomas of late-onset, in MMR wild-type mice treated with Aza but not with cyclosporine A. Overall, my work demonstrates *in vivo*, that a prolonged Aza exposure is a risk factor for the development of rare MSI tumors of late-onset, even in the absence of predisposition to this tumor type (*i.e.* in MMR wild-type mice), as reported in treated patients.

In the second axis of my thesis, I focused on the CMMRD syndrome, a major predisposition to early-onset of MSI cancers (hematologic diseases, cerebral and colon tumors, ...). CMMRD patients are carriers of biallelic germline mutations of a MMR gene. They are diagnosed through constitutional mutational screening of MMR genes, an unsatisfactory method that turns to be non-contributory when variants of unknown biological significance are detected. In this context, we developed a functional method to diagnose CMMRD syndrome in individuals with evocative clinical criteria. It is based on the assumption that two phenotypic features previously reported in MMR-deficient tumor cells, *i.e.* their MSI phenotype and tolerance to certain genotoxic drugs, could also be detected in non-neoplastic tissues from CMMRD patients (*i.e.* immortalized lymphoid cells). We propose a functional approach for the diagnosis of CMMRD patients, which is non-invasive, sensitive and specific, and could overcome the limits of the constitutional analysis of MMR genes.

Keywords: mismatch repair, instability of microsatellites, cancer, syndrome CMMRD, diagnostic test, azathioprine.

Table des matières

RÉSUMÉ **4**

ABSTRACT **5**

TABLE DES MATIÈRES **6**

TABLE DES FIGURES **9**

TABLE DES TABLEAUX **10**

LISTE DES ABRÉVIATIONS **11**

INTRODUCTION GÉNÉRALE **14**

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE **16**

Partie I. Rôles du système MMR (mismatch repair) *17*

A. Réparation des mésappariements de bases de l'ADN par le système MMR 17

1. Chez les procaryotes : le complexe MutHLS 17

2. Chez les eucaryotes 18

2. a. Protéines homologues de MutS 18

2. b. Protéines homologues de MutL 19

2. c. Protéines impliquées dans la discrimination du brin néosynthétisé 19

2. d. Protéines impliquées dans l'excision/resynthèse 20

B. Implication du système MMR dans la signalisation des lésions induites de l'ADN 24

1. Les thiopurines 24

1. a. Premières indications cliniques des thiopurines 24

1. b. Mode d'action des thiopurines 24

1. c. Tentative de réparation des lésions Me6-TG par le système MMR 26

2. Les agents alkylants 30

2. a. Premières indications cliniques des agents alkylants 30

2. b. Mode d'action des agents alkylants 31

2. c. Réparation des lésions O6-MeG par l'enzyme MGMT 31

2. d. Tentative de réparation des lésions O6-MeG par le système MMR 32

Partie II. Les cancers caractérisés par une instabilité des microsatellites *36*

A. Le phénotype d'instabilité sur les séquences microsatellites du génome (MSI) 36

1. Historique et définition du phénotype MSI 36

2. Détermination du statut MSI des tumeurs humaines 37
2. a. Immunohistochimie sur tissu tumoral 37
2. b. Phénotype d'instabilité des microsatellites dans le tissu tumoral 38
B. Cancers de phénotype MSI 42
1. Description des cancers MSI sporadiques 42
2. Cancers MSI iatrogènes 42
2. a. Leucémies aiguës myéloblastiques 43
2. b. Lymphomes non-Hodgkiniens 44
2. c. Cancers cutanés 46
2. d. Néoplasies intestinales compliquant une MICI 48

Partie III. Syndromes héréditaires de prédisposition aux cancers MSI 51

A. Le syndrome de Lynch, une prédisposition fréquente aux cancers MSI 51
1. Définition du syndrome de Lynch (LS) 51
1. a. Caractéristiques moléculaires et génétiques du LS 52
1. b. Spectre clinique du LS et corrélation génotype – phénotype 53
2. Identification des patients atteints du syndrome de Lynch 53
2. a. Critères d'identification des patients à risque pour le LS 53
2. b. Variantes du syndrome de Lynch 54
3. Analyse constitutionnelle des gènes MMR pour le diagnostic du LS 57
4. Surveillance clinique des patients atteints du syndrome de Lynch 58
B. Le syndrome de déficience constitutionnelle du système MMR 60
1. Définition du syndrome CMMRD 60
1. a. Caractéristiques moléculaires et génétiques du syndrome CMMRD 60
1. b. Spectre clinique du syndrome CMMRD et corrélation génotype – phénotype 61
1. c. Manifestations non tumorales dans le syndrome CMMRD 61
2. Identification des patients atteints du syndrome CMMRD 64
2. a. Critères cliniques d'identification des patients à risque pour le syndrome CMMRD 64
2. b. Diagnostics différentiels du syndrome CMMRD 66
3. Techniques diagnostiques du syndrome CMMRD 68
3. a. Analyse constitutionnelle des gènes MMR 68
3. b. Immunohistochimie sur tissu sain 68
3. c. Phénotype d'instabilité des microsatellites dans le tissu sain 69

4. Propositions de prise en charge des patients atteints du syndrome CMMRD 71
4. a. Surveillance clinique des patients atteints du syndrome CMMRD 71
4. b. Stratégie thérapeutique adaptée aux patients atteints du syndrome CMMRD 72

Partie IV. Modèles d'étude de la déficience du système MMR *74*

A. Les modèles murins de déficience du système MMR 74
1. Souris invalidées pour le gène *Msh2* 74
2. Souris invalidées pour les homologues de MutS 76
2. a. Souris invalidées pour *Msh6* et *Msh3* 76
2. b. Souris invalidées pour *Msh4* et *Msh5* 78
3. Souris invalidées pour les homologues de MutL 78
3. a. Souris invalidées pour *Mlh1* 78
3. b. Souris invalidées pour *Pms2, Pms1* et *Mlh3* 79
4. Souris invalidées pour les protéines accessoires du système MMR 79
5. Pertinence des modèles murins pour l'étude de l'oncogenèse MSI 82
B. Les modèles cellulaires humains de déficience du système MMR 83
1. Lignées épithéliales cancéreuses 83
2. Lignées lymphoblastoïdes 83
2. a. Généralités sur le virus d'Epstein-Barr 83
2. b. La physiopathologie de l'infection des cellules lymphoïdes par le virus EBV 85
3. Pertinence de l'utilisation des lignées cellulaires lymphoblastoïdes 87

TRAVAUX DE RECHERCHE 88
DISCUSSION 190
PERSPECTIVES 204
CONCLUSION GÉNÉRALE 210
ANNEXE 212
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 252

Table des figures

Figure 1. Le système de réparation des mésappariements de bases de l'ADN ou système MMR (mismatch repair).....23

Figure 2. Métabolisme et structure chimique des thiopurines.....28

Figure 3. Prise en charge par le système MMR (mismatch repair) des lésions Me6-TG induites par les thiopurines.....29

Figure 4. Prise en charge par la MGMT des bases modifiées O6-MeG et du pseudosubstrat O6-benzylguanine.....34

Figure 5. Prise en charge par l'enzyme MGMT et le système MMR des lésions O6-MeG induites par les agents alkylants.....35

Figure 6. Pathway mutator de l'instabilité des microsatellites (MSI).....40

Figure 7. Détermination du statut MSI (microsatellite instability) des tumeurs.....41

Figure 8. Spectre d'absorbance de la 6-thioguanine (6-TG) et de la guanine (G).....50

Figure 9. Dispositif national d'oncogénétique.....56

Figure 10. Arbre décisionnel d'analyse des variants des gènes MMR dans le cadre du syndrome de Lynch.....59

Figure 11. Mutation germinale des gènes MMR dans les syndromes héréditaires de prédispositions aux cancers MSI.....63

Figure 12. Etablissement d'une lignée cellulaire lymphoblastoïde (LCL) lors de l'infection par le virus d'Epstein-Barr (EBV).....86

Figure 13. Mode d'action de la ciclosporine A (CsA).....197

Table des tableaux

Tableau 1. Homologie des gènes du système MMR dans les différentes espèces considérées.....22

Tableau 2. Critères d'Amsterdam II préconisant l'orientation vers une consultation d'oncogénétique dans le cadre du syndrome de Lynch 55

Tableau 3. Critères de Bethesda révisés préconisant la mise en œuvre préalable d'un pré-criblage somatique dans le cadre du syndrome de Lynch. 55

Tableau 4. Critères cliniques préconisant la recherche d'un syndrome CMMRD, chez les patients atteints de cancer 65

Tableau 5. Phénotype des souris invalidées pour les gènes du système MMR. 81

Liste des abréviations

5-FU : 5-fluorouracile
6-MP : 6-mercaptopurine
6-TG : 6-thioguanine
8-OHTG : 8-hydroxythioguanine

ADN : acide désoxyribonucléique
AGAT : O6-alkylguanine-DNA alkyltransférase
AO : aldéhyde oxydase
APC : *adenomatous polyposis coli*
ARN : acide ribonucléique
ATR-CHK1 : *ataxia telangiectasia and Rad3-related checkpoint kinase 1*
Aza : azathioprine
B6 : C57BL/6J
BAT : *big adenine track*
C4CMMRD : *care for constitutional mismatch repair deficiency*
CALM : café-au-lait macule
CaN : calcineurine
CCR : cancer colorectal
CCS : *childhood cancer syndrome*
CLS : café-au-lait spot
CMMRD : *constitutional mismatch repair deficiency*
CNI : *calcineurin inhibitors*
CoLoN : *Colon tumours or/and Leukaemia/Lymphoma or/and Neurofibromatosis*
CpN : ciclophiline
CsA : ciclosporine A
CXCL10 : CXC *chemokine ligand* 10
CXCR3 : CXC *chemokine receptor* 3
DAM : déoxyadénosine méthyltransférase
E. coli : *Escherichia coli*
EBV : *Epstein-Barr virus*
EpCAM : *epithelial cell adhesion molecule*
*ev*MSI : *ex vivo microsatellite instability*
EXO : exonucléase
FDA : *Food and Drug Administration,* ou agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux
FVB : FVB/NJ
GMPS : guanosine monophosphate synthase
gMSI : *germline microsatellite instability*

H. sapiens : *Homo sapiens*
HIV : *human immunodeficiency virus*
HNPCC : *hereditary nonpolyposis colorectal cancer*
HPRT : hypoxanthine guanine phosphoribosyltransférase
HSP : *heat shock protein*
IBD : *inflammatory bowel disease*
IHC : immunohistochimie
IL2 : interleukine 2
IMPD : inosine monophosphate dehydrogenase
INCa : institut national du cancer
InSiGHT : *international society for gastrointestinal hereditary tumors*
IRM : imagerie par résonance magnétique
KO : *knockout*
LAM : leucémie aiguë myéloblastique
LCL : lignée cellulaire lymphoblastoïde
LNH : lymphome non-Hodgkinien
LOH : *loss of heterozygosity* pour perte d'hétérozygotie
LPD : *lymphoproliferative disorders*
LS : *Lynch syndrome*
M. musculus : *Mus musculus*
MC : maladie de Crohn
Me6-TG : 6-méthylthioguanine
MeMP : 6-méthylmercaptopurine
MGMT : O6-méthylguanine ADN méthyltransférase
MICI : maladie inflammatoire chronique de l'intestin
MLH : MutL homologue
MLPA : *multiplex ligation-dependent probe amplification*
MMR : *mismatch repair*
MMR-D : *mismatch repair deficiency*
MNNG : methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
MNU : N-méthyl-N-nitrosourea
MRE11 : *meiotic recombination 11*
MSH : MutS homologue
MSI : *microsatellite instability*
MSS : *microsatellite stability*
NF-Atc : *nuclear factor of activated T-cells*
NF1 : neurofibromatose de type 1
NR : *new repeat*
O6-BzG : O6-benzyl guanine
OMS : organisation mondiale de la santé

PAF : polypose adénomateuse familiale

PCNA : *proliferating cell nuclear antigen*

PCR : *polymerase chain reaction*

PMS : *postmeiotic segregation*

POL : ADN polymérase

PRPP : 5′-phosphoribosyl-1-pyrophosphate

PTLD : *post-transplant lymphoproliferative disorder* pour syndrome lymphoprolifératif post-transplantation

QMPSF : *quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragment*

RA : *retinoic acid*

RAMBA : *retinoic acid metabolim blocking agent*

RCH : rectocolite hémorragique

RFC : *replication factor C*

ROS : *reactive oxygen species*

RPA : *replication protein A*

S. cerevisae : *Saccharomyces cerevisae*

SAM : S-adénosylméthionine

SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise

SN : substitution nucléophile

SP-PCR : *small pool-polymerase chain reaction*

SPRED1 : *sprouty-related EVH1 domain containing 1*

STZ : streptozocin

TCL : tache café-au-lait

TGF-β : *transforming growth factor beta*

TGMP : thioguanosine monophosphate

Thio-dGTP : 6-thioguanosine 5′-triphosphate

TIMP : thioinosine 5′-monophosphate

TMZ : témozolomide

TP53 : *tumor protein 53*

TPMT : thiopurine S-méthyltransférase

TXMP : thioxanthine monophosphate

UV : ultraviolet

VEGF : *vascular endothelial growth factor*

VSI : variant de signification inconnue

VUS : *variant of uncertain significance*

WHO : *world health organization*

WT : *wild-type*

XO : xanthine oxydase

Introduction générale

Le laboratoire dans lequel j'ai effectué ma thèse s'intéresse à un phénotype tumoral dit MSI, pour microsatellite instable. Un lien a été établi entre la survenue de tumeur MSI caractérisée par une instabilité nucléotidique, et l'inactivation du système de réparation des mésappariements de bases de l'ADN ou système MMR (*mismatch repair*). Si l'inactivation du système MMR n'est pas un événement transformant en soi, il est généralement admis que c'est l'instabilité génomique qu'elle engendre, notamment au niveau de séquences répétées des gènes dits « cibles », qui constitue un processus oncogénique. Le phénotype MSI est associé à la fois à l'un des syndromes de prédisposition au cancer le plus fréquent, le syndrome de Lynch, mais également à l'un des syndromes de prédisposition au cancer le plus rare, le syndrome de déficience constitutionnelle du système MMR (CMMRD). Les patients atteints de ces syndromes sont porteurs de mutations germinales d'un des gènes du système MMR, respectivement à l'état mono- ou biallélique. Par ailleurs, le phénotype MSI est également retrouvé en dehors de tout contexte de prédisposition, notamment dans environ 10% des tumeurs colorectales, gastriques ou de l'endomètre qui surviennent de manière sporadique.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à l'induction d'un processus oncogénique MSI d'une part, *in vivo* dans un modèle murin, afin de démontrer l'impact oncogénique de l'azathioprine, un immunosuppresseur fréquemment utilisé en clinique; et d'autre part, *in vitro* en utilisant des lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCL) issues de patients CMMRD, dans le but d'améliorer le diagnostic de ce syndrome.

En plus de son implication dans la réparation des mésappariements résultant des erreurs de réplication impliquant les bases canoniques de l'ADN, le système MMR joue un rôle clé dans la signalisation des dommages de l'ADN induits par certains agents cytotoxiques. Des données de la littérature, dont certaines issues du laboratoire, ont suggéré qu'un traitement prolongé par certains immunosuppresseurs pourrait favoriser l'émergence de tumeurs MSI chez les patients. Lors d'une précédente étude du laboratoire, l'impact oncogénique de l'azathioprine (Aza), un immunosuppresseur de la classe des thiopurines fréquemment prescrit chez l'homme dans divers contextes cliniques, avait pu être objectivé dans un modèle murin de prédisposition

génétique aux lymphomes MSI. En raison d'une très forte toxicité de l'Aza vis-à-vis des souris de génotype sauvage à la dose utilisée, cette étude n'avait pas permis de mettre en évidence un éventuel impact oncogénique de l'Aza en dehors de ce contexte de prédisposition génétique. Dans ce but, j'ai mené une étude dose-réponse afin d'évaluer la dose d'azathioprine compatible avec une survie prolongée des souris de génotype sauvage et la survenue de lymphomes MSI. Par ailleurs, afin de déterminer si cet effet est spécifique des thiopurines ou s'il peut être reproduit avec un autre immunosuppresseur, j'ai également testé l'impact oncogénique de la ciclosporine A (Article 1).

En parallèle, j'ai mené une étude portant sur une nouvelle approche diagnostique du syndrome CMMRD, qui utilise les lymphocytes immortalisés issus de ces patients. Ce matériel biologique, précieux au vue de la rareté du syndrome (146 patients décrits à ce jour), a pu être établi dans le cadre du consortium européen « Care for CMMRD » (C4CMMRD), à l'initiative de notre laboratoire. Cette nouvelle approche diagnostique est basée sur deux caractéristiques fonctionnelles des cellules MMR déficientes, leur phénotype d'instabilité microsatellitaire et de tolérance à certains agents génotoxiques (Article 2). De manière intéressante, cette approche fonctionnelle permet de répondre aux limites de l'actuelle technique diagnostique, l'analyse génétique constitutionnelle des gènes MMR qui peut se révéler insatisfaisante, car non contributive, notamment en cas de détection de variants de signification inconnue dont la pathogénicité est incertaine. Les résultats de ce travail ont donné lieu à un dépôt de brevet.

Par ailleurs, j'ai participé à un travail sur HSP110 T17 (microsatellite T17 de *heat shock protein* 110) un nouveau marqueur de détection de l'instabilité des microsatellites. Nous avons mené au laboratoire une analyse morphométrique des profils alléliques sur une grande série de cancers colorectaux, visant à préciser les performances de ce nouveau marqueur pour la détection du phénotype MSI en comparaison avec l'actuel panel de marqueurs de références (Annexe).

La présentation de mes travaux de recherche est précédée d'une revue de la littérature faisant le point sur l'état actuel des connaissances concernant le rôle du système MMR dans la réparation des mésappariements de bases de l'ADN et son implication dans la signalisation des lésions induites par certains agents génotoxiques, ainsi qu'une présentation des cancers MSI dans les différents contextes cliniques dans lesquels ils peuvent être observés.

Revue bibliographique

Partie I. Rôles du système MMR (*mismatch repair*)

Le système MMR (*mismatch repair*) ou système de réparation des mésappariements de bases de l'ADN, joue un rôle déterminant dans le maintien de l'intégrité génomique. Au cours de la réplication, à partir d'un génome dit « mère », l'ADN polymérase duplique l'ADN en deux génomes filles. Cette enzyme a une activité de relecture exonucléotidique 3'-5' qui corrige les erreurs réplicatives. Néanmoins, les erreurs de réplication qui échappent à cette activité de relecture de l'ADN polymérase, sont prises en charge par le système MMR, qui intervient donc de manière post-réplicative. Les protéines du système MMR sont également impliquées dans d'autres processus, tels que la recombinaison génétique, la réparation des ponts inter- et intra-brins, ainsi que la diversité des immunoglobulines. Dans la première partie de cette revue bibliographique, seules les fonctions de réparation des mésappariements de bases et de signalisation des lésions induites de l'ADN seront détaillées.

A. Réparation des mésappariements de bases de l'ADN par le système MMR

Les fonctions individuelles des protéines MMR dans la détection, l'excision et la réparation des erreurs de type mésappariements de bases canoniques ou boucles insertions/délétions de bases survenant aux cours de la réplication de l'ADN sont bien décrites. Le système MMR est très conservé de la bactérie aux mammifères.

1. Chez les procaryotes : le complexe MutHLS

La plupart de nos connaissances sur le système MMR sont issues de l'étude de ce complexe chez la bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*), qui est composé de trois protéines principales: MutS, MutL et MutH (système nommé MutHLS) (Claverys & Lacks, 1986; Lahue et al, 1989; Lu et al, 1983; Modrich, 1989; Modrich, 1991; Modrich & Lahue, 1996). Le système MutHLS agit selon un processus post-réplicatif d'excision-resynthèse d'une portion d'ADN contenant un mésappariement (Wagner & Meselson, 1976; Wildenberg & Meselson, 1975). En effet, le système MMR est en charge de la réparation du brin néosynthetisé, facilement détecté chez *E. coli* puisqu'il est non méthylé de manière transitoire (Glickman et al, 1978; Marinus & Konrad, 1976;

Marinus et al, 1984; Schlagman et al, 1986). Chez la bactérie, la méthylation des adénines est une modification post-réplicative assurée par l'enzyme DAM (désoxyadénosine méthylase). La réparation débute avec la reconnaissance du mésappariement par un homodimère de protéines MutS (Natrajan et al, 2003), suivie par le recrutement d'un homodimère de protéines MutL, puis par le recrutement et l'activation de l'endonucléase MutH (Robertson et al, 2006). MutH est capable de cliver le brin d'ADN néosynthétisé non-méthylé (Au et al, 1992; Welsh et al, 1987). L'excision requiert la présence d'une hélicase MutU (ou UvrD) et d'une exonucléase qui vont digérer le brin néo-synthétisé (Cooper et al, 1993; Viswanathan et al, 2001). Ce brin va alors être re-synthétisé par l'ADN polymérase et l'ADN va être recirculariséé grâce à une ligase, l'ADN ligase 1 (Su et al, 1989) (**Figure 1**). De manière intéressante, l'inactivation du système MutHLS entraîne un taux accru (x1000) de mutations spontanées (Glickman & Radman, 1980).

2. Chez les eucaryotes

En comparaison avec le système bactérien, le système MMR des eucaryotes est hautement conservé, mais le degré de complexité est augmenté par l'ajout de plusieurs homologues de MutS et de MutL (respectivement, MSH pour MutS homologue et MLH pour MutL homologue). Dans la levure *Saccharomyces cerevisae* (*S. cerevisae*), les homologues de MutS décrits sont au nombre de six, et ils sont nommés MSH1 à MSH6 (Kolodner, 1996). La protéine MSH1 impliquée dans la réparation des mésappariements de bases dans le génome mitochondrial, semble être spécifique de la levure. Ainsi chez les mammifères, il existe cinq homologues de MutS (MSH2 à MSH6), et quatre homologues de MutL (MLH1, MLH3, PMS1 et PMS2), tandis que MutH n'a pas d'homologue connu (**Tableau 1**).

2. a. Protéines homologues de MutS

Chez les eucaryotes, le début du processus de réparation nécessite la présence de trois différents homologues de MutS (MSH2, MSH3, et MSH6) qui forment les complexes MSH2-MSH6 (MutSα) et MSH2-MSH3 (MutSβ) (Kolodner, 1996; Marsischky et al, 1996). Le complexe MSH2-MSH6 initie la réparation des mésappariements ne touchant qu'une seule base ainsi que les boucles d'insertions/délétions d'une seule base, tandis que le complexe MSH2-MSH3 initie la réparation des grandes boucles insertions/délétions de deux à quatre bases en plus des boucles

d'insertions/délétions d'une seule base (Edelmann et al, 2000; Genschel et al, 1998; Greene & Jinks-Robertson, 1997; Guerrette et al, 1998; Kolodner, 1996; Marsischky et al, 1996). Les fonctions des complexes MSH2-MSH6 et MSH2-MSH3 semblent donc être redondantes, du moins vis-à-vis de la réparation de certaines boucles d'insertions/délétions de bases. Deux homologues de MutS supplémentaires, appelés MSH4 et MSH5, sont décrits chez les eucaryotes (Her & Doggett, 1998; Paquis-Flucklinger et al, 1997; Winand et al, 1998) et jouent tous deux un rôle spécialisé dans le contrôle de la recombinaison méiotique chez la levure et l'homme (Hollingsworth et al, 1995; Ross-Macdonald & Roeder, 1994). Les protéines MSH4 et MSH5 sont dépourvues de domaine N-terminal, domaine nécessaire à la reconnaissance des mésappariements. Les complexes MSH2-MSH6 et MSH2-MSH3 nécessitent l'interaction avec des homologues de MutL pour activer les étapes ultérieures de la réparation.

2. b. Protéines homologues de MutL

Quatre homologues de MutL ont été décrits chez la levure et chez les mammifères: MLH1 (levure MLH1), PMS1 (*postmeiotique segregation*, levure MLH2), MLH3 (levure MLH3), et PMS2 (levure PMS1) (**Tableau 1**) (Buermeyer et al, 1999; Kolodner & Marsischky, 1999). Les homologues de MutL interagissent pour former trois hétérodimères composés respectivement de MLH1-PMS2 (MutLα), MLH1-PMS1 (MutLβ), et MLH1-MLH3 (MutLγ), MLH1 constituant la sous-unité commune à ces trois complexes (Kondo et al, 2001). Le complexe MLH1-PMS2 interagit avec les complexes MutSα et MutSβ, de façon analogue à ce qui est observé chez la bactérie entre les complexes MutL et MutS. Cette interaction est essentielle pour l'activation des étapes ultérieures de la réparation médiée par le système MMR, qui comprennent l'excision du brin d'ADN portant le mésappariement et la re-synthèse de l'ADN (Flores-Rozas & Kolodner, 1998; Li & Modrich, 1995; Prolla et al, 1994; Wang et al, 1999b). MutL participe donc à une étape intermédiaire entre la reconnaissance du mésappariement par MutS et la cascade d'événements qui vont se mettre en place par la suite (**Figure 1**).

2. c. Protéines impliquées dans la discrimination du brin néosynthétisé

Chez les eucaryotes, il n'existe pas d'homologue de la protéine bactérienne MutH, qui permettrait de discriminer le brin néosynthétisé (nécessitant la réparation) du brin matrice.

Parmi les différentes protéines qui interviennent dans la discrimination du brin néosynthétisé, il y a PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), qui est essentielle à la réplication puisqu'elle sert de cofacteur à l'ADN polymérase en augmentant, d'au moins un facteur 100, sa processivité, c'est-à-dire sa capacité à synthétiser l'ADN sans se détacher de la matrice (Lee & Hurwitz, 1990). Son implication dans le système MMR a été initialement mise en évidence par son interaction avec la protéine MLH1 (Umar et al, 1996; Yang, 2007) et avec les complexes MutSα et MutSβ *via* un motif N-terminal très conservé des protéines MSH6 et MSH3 (qui n'existe pas dans MSH2) (Clark et al, 2000; Flores-Rozas et al, 2000; Gu et al, 1998; Johnson et al, 1996; Umar et al, 1996). En plus de son rôle dans la discrimination du brin néosynthétisé, PCNA est aussi impliqué dans l'excision, puisqu'un de ses partenaires est l'exonucléase 1 (EXO1). La découverte de l'activité endonucléasique de MutLα, suggère que ce complexe serait également impliqué dans la discrimination du brin néosynthétisé (Kadyrov et al, 2006).

2. d. Protéines impliquées dans l'excision/resynthèse

Chez les eucaryotes, l'excision du brin néosynthétisé est assurée par l'exonucléase EXO1, homologue de l'exonucléase 1 bactérienne. Cette protéine, qui chez la levure interagit avec les protéines MLH1 et MSH2, et chez l'homme interagit avec ces même protéines auxquelles s'ajoute MSH3, participe à la réparation de l'ADN en catalysant la réaction d'excision orientée de 5' vers 3' (Schmutte et al, 2001; Tishkoff et al, 1997; Tran et al, 2001). Des études ont montré que l'excision était, comme chez la bactérie, un processus bidirectionnel (Zhang et al, 2005). En effet, l'excision est initiée à partir d'une cassure simple ou double brin de l'ADN puis se poursuit en direction du mésappariement. Paradoxalement, alors que la protéine EXO1 n'a qu'une activité exonucléasique 5'-3' reconnue, elle est nécessaire à l'excision 3'-5'. Ceci a conduit à suggérer que EXO1 pourrait posséder une activité exonucléasique 3'-5' cryptique qui ne serait activée que dans un contexte de réparation par le système MMR (Dzantiev et al, 2004; Genschel et al, 2002). D'autres protéines interviennent également dans l'excision bidirectionnelle de l'ADN, telles que le facteur de réplication C (RFC) et PCNA qui sont capables de moduler l'activité de EXO1 en fonction du point d'initiation et du mésappariement (Xie et al, 1999). La participation de EXO1 dans la réparation des mésappariements est sujette à controverse,

puisqu'une reconstruction *in vitro* d'un système fonctionnel ne contenant pas EXO1 a été réalisée (Kadyrov et al, 2009).

Par ailleurs, d'autres protéines possédant une activité exonucléasique 3'-5' ont été incriminées du fait que leur absence d'expression conduisait à un taux accru de mutations. C'est notamment le cas de MRE11 (*meiotic recombination* 11) ou des ADN polymérases δ et ε qui possèdent une activité de relecture 3'-5' (Longley et al, 1997; Vo et al, 2005). La re-synthèse du brin excisé nécessite la participation de l'activité polymérase 5'-3' des enzymes ADN polymérases δ ou ε, et de la protéine PCNA qui remplit alors son rôle de facteur de processivité pour aider la polymérase. Enfin, une dernière enzyme intervient pour clore le processus, il s'agit de l'ADN ligase 1 qui est un partenaire d'interaction avec la polymérase δ et PCNA (Kunkel & Erie, 2005; Modrich, 2006) (**Figure 1**).

E. coli	*S. cerevisiae*	*M. musculus / H. sapiens*
Mut S	*MSH1*	-
	MSH2	*Msh2 / MSH2*
	MSH3	*Msh3 / MSH3*
	MSH4	*Msh4 / MSH4*
	MSH5	*Msh5 / MSH5*
	MSH6	*Msh6 / MSH6*
Mut L	*MLH1*	*Mlh1 / MLH1*
	MLH2	*Pms1 / PMS1*
	MLH3	*Mlh3 / MLH3*
	PMS1	*Pms2 / PMS2*
Mut H	-	-
Mut U	-	-

Tableau 1. Homologie des gènes du système MMR dans les différentes espèces considérées. Chez la bactérie *Escherichia coli (E. coli)*; la levure *Saccharomyces cerevisae (S. cerevisae)*, et chez les mammifères *Mus musculus (M. musculus), et Homo sapiens (H. sapiens)*. MSH, MutS homologue; MLH, MutL homologue; PMS, *postmeiotique segregation* (d'après Duval & Hamelin, 2003).

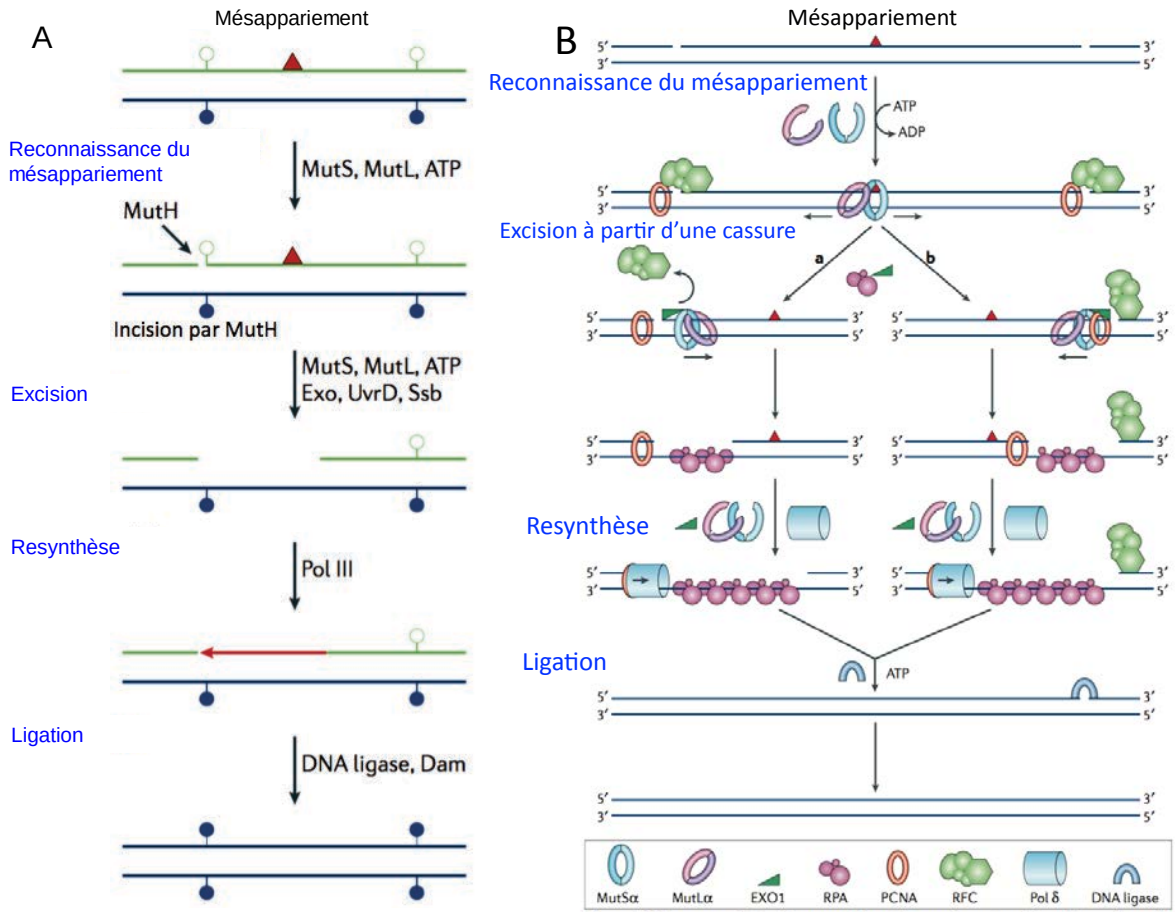


Figure 1. Le système de réparation des mésappariements de bases de l'ADN ou système MMR (*mismatch repair*). (A) Chez *E. coli*, l'ADN néo-synthétisé (vert) est transitoirement non méthylé (cercles vides). Le mésappariement (triangle rouge) active le complexe MutS-MutL-ATP et l'endonucléase MutH incise le brin d'ADN. L'hélicase UvrD, avec l'une des exonucléases, génèrent une portion d'ADN simple brin stabilisée par la protéine de liaison à l'ADN. Cette région est re-synthétisée (en rouge) par l'ADN polymérase III (Pol III) puis soudée par l'ADN ligase. Les sites de GATC sont ensuite méthylés (cercles bleus) par l'enzyme déoxyadénine méthylase (Dam). **(B)** Chez l'homme, le mésappariement active les complexes MutSα (ou MutSβ) et MutLα. L'activité endonucléasique de MutL favorise le recrutement d'EXO1 (exonucléase 1), puis Pol **δ** (ADN polymérase delta) effectue la re-synthèse et l'ADN ligase termine le processus de réparation (d'après Jiricny, 2006).

B. Implication du système MMR dans la signalisation des lésions induites de l'ADN

L'implication des protéines du système MMR ne se limite pas à la reconnaissance des mésappariements impliquant les bases canoniques de l'ADN. Elles interviennent également dans la réponse cellulaire à certains agents génotoxiques incluant entre autres, les thiopurines, les agents alkylants, les dérivés de platine qui créent des liaisons covalentes inter- et intra-brins, et les agents oxydants. Seul le rôle du système MMR dans le contrôle des lésions induites par les thiopurines et les agents alkylants sera détaillé par la suite. Brièvement, le système MMR prend en charge les adduits (contraction entre addition et produits) de l'ADN, en activant des voies de signalisation conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire ou à l'apoptose. L'inactivation du système MMR conduit à un phénotype de tolérance cellulaire à certains agents génotoxiques et permet ainsi la survie cellulaire.

1. Les thiopurines

1. a. Premières indications cliniques des thiopurines

Les thiopurines comprennent l'azathioprine (Aza), la 6-mercaptopurine (6-MP) et la 6-thioguanine (6-TG). La 6-MP et la 6-TG sont des antagonistes de la guanine (**Figure 2**) (Elion et al, 1953a; Elion et al, 1953b; Hitchings & Elion, 1954; Hitchings et al, 1950; Karran, 2006). Ces deux anti-métabolites ont été obtenus en remplaçant directement l'atome d'oxygène (O) situé sur le carbone en position 6 de la guanine (G) et de l'hypoxanthine respectivement, par un atome de soufre (S). A peine deux ans après sa synthèse, la 6-MP a obtenu une autorisation de mise sur le marché aux Etats-Unis sous le nom de Purinethol (approbation par la FDA *Food and Drug Administration* pour agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux) pour le traitement des leucémies aiguës chez l'enfant (Burchenal et al, 1953).

1. b. Mode d'action des thiopurines

L'azathioprine est une pro-drogue qui est clivée de manière non enzymatique dans le foie en 6-MP (Elion et al, 1962; Elion, 1972; Elion et al, 1963; Elion et al, 1960). Les métabolites issus de la transformation des thiopurines agissent selon deux modes d'action, par incorporation dans les acides nucléiques (ADN ou ARN) dans lesquels ils exercent leur action cytotoxique, ou par

inactivation de la voie de synthèse *de novo* des purines (Bertino, 1991; Coulthard et al, 2002; Dervieux et al, 2001). Dans les lymphocytes spécifiquement, il s'agit de la voie principale d'obtention des précurseurs puriques, car la voie de récupération est insuffisante. En conséquence, l'inhibition de la voie de synthèse *de novo* des purines entraîne un arrêt de la prolifération lymphocytaire et donc une immunosuppression efficace.

En tant qu'analogues des purines, la 6-MP et la 6-TG vont être successivement métabolisées par un grand nombre d'enzymes intervenant dans le métabolisme des purines endogènes en nucléotides 6-thioguanine (déoxy-6-thioguanosine 5'- triphosphates) (Elion et al, 1962; Elion, 1969) (**Figure 2**). La 6-MP et la 6-TG sont activées sous l'action enzymatique de l'hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl transférase (HPRT) et de son substrat la 54-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP), par ajout d'un groupe phosphoribosyl pour donner respectivement, la mercaptopurine-phosphoriboside appelée aussi thioinosine 5'-monophosphate (TIMP) et la thioguanosine monophosphate (TGMP). Néanmoins, la TIMP et la TGMP ne sont pas les seuls composants issus du métabolisme de ces deux thiopurines et trois autres enzymes entrent en compétition pour donner des métabolites qui ont peu ou pas d'action cytotoxique. D'une part, ces dérivés de l'hypoxanthine et de la guanine sont oxydés par l'aldéhyde oxydase (AO) et la xanthine oxydase (XO) en 8-hydroxythioguanine (8-OHTG) et en acide thiourique, respectivement. Dans le cas de la 6-TG, la XO ne peut agir que si elle a été préalablement convertie en thioxanthine, sous l'action de la guanase. D'autre part, la 6-MP et la 6-TG peuvent être méthylées sous l'action de la thiopurine S-méthyltransferase (TPMT) en 6-méthylmercaptopurine (MeMP) et 6-méthylthioguanine (Me6-TG) respectivement, grâce à un donneur de groupement méthyle, la S-adénosylméthionine (SAM) (Coulthard et al, 2002). La TGMT, produit commun du métabolisme de la 6-MP et de la 6-TG, va alors être phosphorylée de manière séquentielle par deux déoxynucléoside kinases pour donner des 6-thioguanosine 5'-triphosphates (thio-dGTP), qui pourront être incorporées dans l'ARN au cours de la transcription, ou dans l'ADN au cours de la réplication, après réduction en déoxy-6-thioguanosine 5'- triphosphates.

1. c. Tentative de réparation des lésions Me6-TG par le système MMR

Au cours de la réplication, les résidus Me6-TG s'accumulent dans l'ADN. Ces bases modifiées ne sont pas correctement reconnues par l'ADN polymérase qui peut incorporer en face une base thymine (T) conduisant à la formation de mésappariements (Me6-TG : T) susceptibles de générer des mutations de type transition (G:C > A:T) (Abbott & Saffhill, 1979). Les bases Me6-TG sont incorporées dans l'ADN au cours de la phase S, et donc les mésappariements Me6-TG : T, ne peuvent survenir qu'au cours du cycle suivant (deuxième phase S). En conséquence, l'arrêt du cycle cellulaire induit par la 6-TG est retardé. Le mésappariement est reconnu par le système MMR qui tente de le réparer. Cependant comme indiqué précédemment, le système MMR ne peut agir que sur le brin néo-synthétisé, il est donc incapable d'exciser la base Me6-TG anormale. La base T est donc excisée mais l'ADN polymérase est susceptible de placer à nouveau une base T en face de la Me6-TG au cycle suivant, provoquant ainsi des cycles futiles d'excision/re-synthèse (York & Modrich, 2006). Ces tentatives de réparation infructueuse, génèrent des portions d'ADN simple puis double brin en face de la base modifiée et un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/S conduisant à la mort cellulaire (apoptose) (Mojas et al, 2007; Yamane et al, 2004) (**Figure 3**). Une hypothèse alternative pour expliquer l'induction de l'apoptose est l'activation directe de la voie de signalisation ATR-CHK1 (ataxia telangiectasia and Rad3-related checkpoint kinase 1) (Liu et al, 2010; Stojic et al, 2004b; Yamane et al, 2004; Yan et al, 2004; Yoshioka et al, 2006).

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

réversion du phénotype de tolérance lorsqu'on transfère ces lignées avec les chromosomes 2 et 3, respectivement porteurs des gènes *MSH2* et *MLH1* (Aebi et al, 1997; Berry et al, 2000; Davis et al, 1998; Hawn et al, 1995).

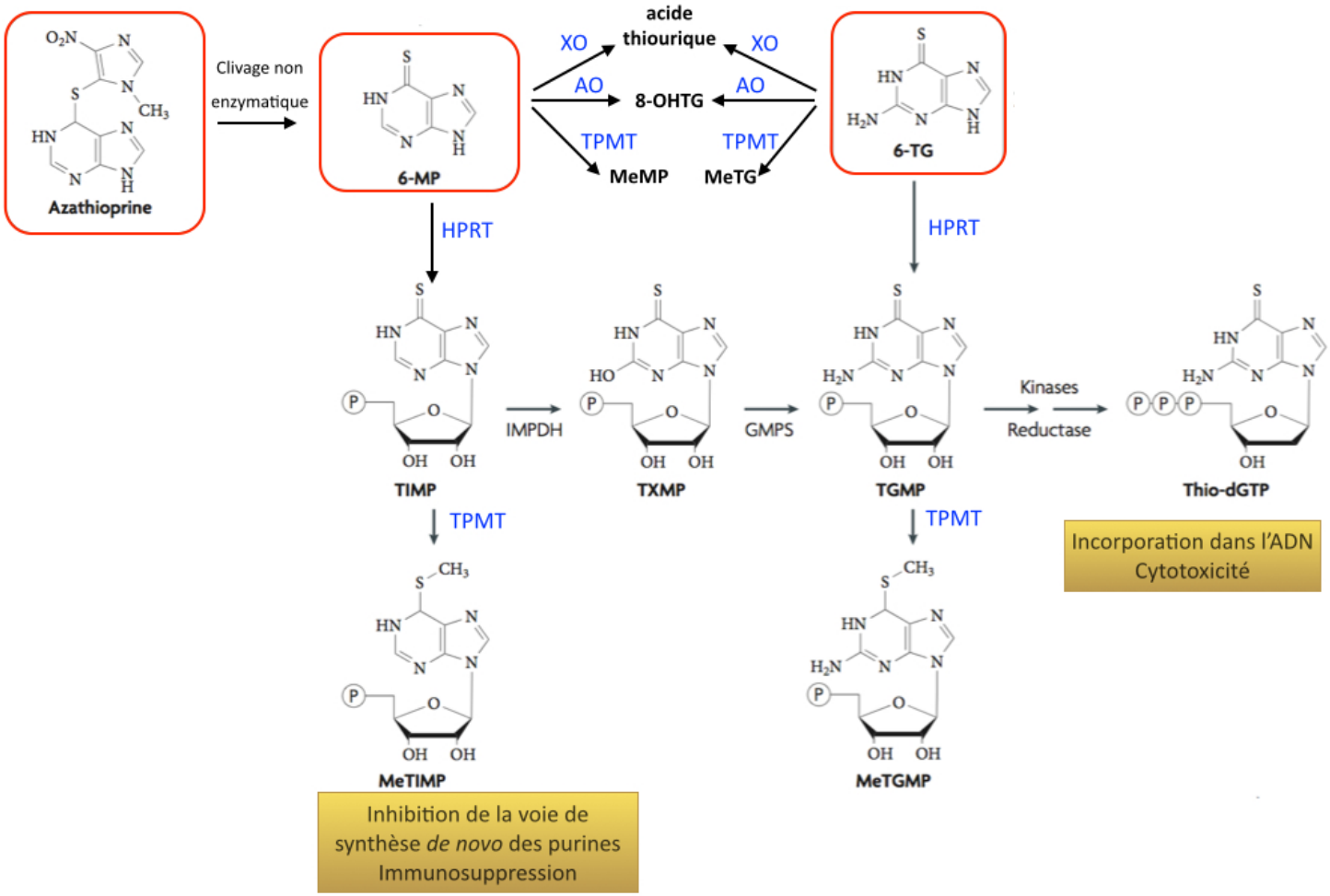


Figure 2. Métabolisme et structure chimique des thiopurines. AO, aldéhyde oxydase; XO, xanthine oxydase; TPMT, thiopurine méthyltransférase; 8-OH, 8-hydroxythioguanine; HPRT, hypoxanthine guanine phosphoribosyltransférase; TIMP, thioinosine 5'-monophosphate; TGMP, thioguanosine monophosphate; TXMP, thioxanthine monophosphate; GMPS, guanosine monophosphate synthase; IMPD, inosine monophosphate dehydrogenase; MeMP, 6-méthylmercaptopurine ; Me6-TG, 6-méthyl thioguanine (d'après Karran & Attard, 2008).

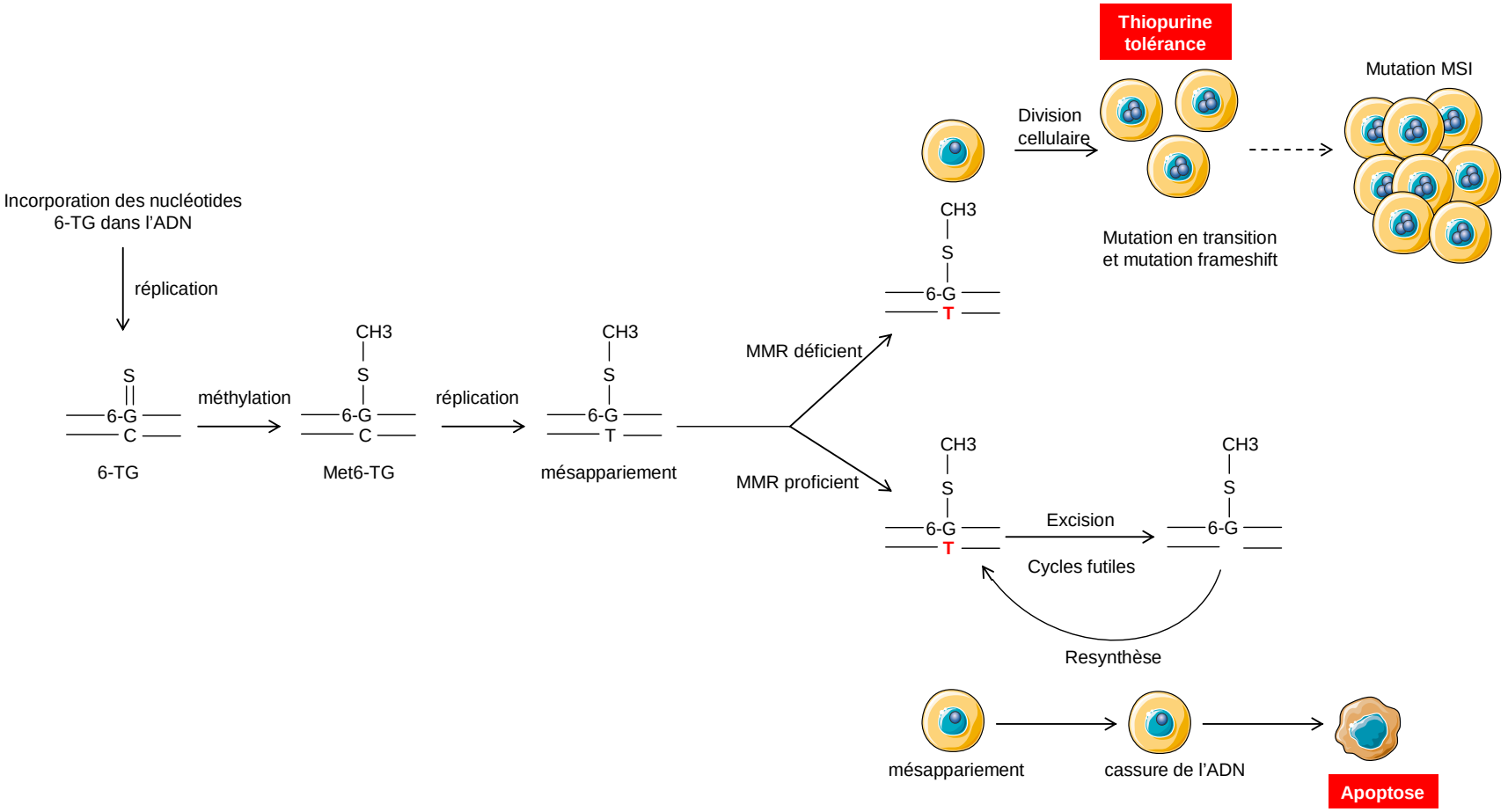


Figure 3. Prise en charge par le système MMR des lésions Me6-TG induites par les thiopurines. L'incorporation d'analogues de base (6TG, 6-thioguanine) crée des lésions Me-6TG par méthylation. Le mésappariement Me-6TG : T est reconnu par le système MMR *(mismatch repair)* ce qui déclenche des tentatives infructueuses de réparation conduisant à des cassures de l'ADN et à l'apoptose. Une déficience MMR permet à la cellule d'échapper à l'apoptose au prix d'une accumulation de mutations en transition et d'une instabilité des microsatellites susceptible de conduire à une oncogenèse de type MSI (d'après Karran & Attard, 2008).

2. Les agents alkylants

2. a. Premières indications cliniques des agents alkylants

L'histoire de l'utilisation des agents alkylants en clinique débute avec la première guerre mondiale. En 1917, les armes chimiques de type gaz moutarde font partie des substances les plus létales. La constatation selon laquelle des personnes (soldats et civils) exposées au gaz moutarde présentaient une aplasie lymphoïde, a abouti dès 1942 à l'utilisation des agents alkylants dans la thérapie des leucémies et des lymphomes (Krumbhaar & Krumbhaar, 1919; Gilman, 1963). Un alkylant est un composé organique capable d'introduire sur une molécule donnée, un groupement hydrocarboné (alkyl-, noté R-CH2). De nos jours, les agents alkylants constituent une classe majeure de l'arsenal des substances utilisées en chimiothérapie (Fu et al, 2012). En raison de leur cytotoxicité et de leurs effets tératogènes et carcinogènes, les agents alkylants représentent une menace considérable pour la santé humaine (Bartsch, 1987).

Les principales sources d'agents alkylants exogènes comprennent les constituants de l'air, de l'eau, de la nourriture, et de polluants (par exemple, la fumée de tabac). Les agents alkylants exogènes ne sont pas la seule source d'alkylation, ainsi de manière endogène, l'alkylation peut être initiée à partir des résidus des dommages oxydatifs, ou à partir de donneurs de groupements méthyle tels que la SAM, qui est un co-facteur communément trouvé dans les réactions biochimiques. Les agents alkylants sont subdivisés en deux familles: (i) substitution nucléophile monomoléculaire (SN1), (ii) substitution nucléophile bimoléculaire (SN2) (Fu et al, 2012). La principale différence entre ces familles est que la première, engendre, en plus des N7-méthylguanine et N3-méthyladénine, également des O6-méthylguanine (O6-MeG) et O4-méthylthymine, tandis que la seconde famille ne modifie que dans une très faible mesure les atomes d'oxygène. Les agents alkylants de type SN1 comprennent les molécules chimiothérapeutiques telles que le témozolomide (TMZ), la dacarbazine, la procarbazine, et la streptozotocin ainsi que les réactifs N-Methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) et N-Methyl-N-nitrosourea (MNU) (Fu et al, 2012). Le témozolomide est le traitement de référence des gliomes de haut grade tels que les astrocytomes anaplasiques et les glioblastomes multiformes (Friedman et al, 2000).

2. b. Mode d'action des agents alkylants

Les agents alkylants forment des radicaux alkyle, qui créent des liaisons covalentes avec certains atomes de l'ADN. Lors de la division cellulaire, la discrimination en deux brins d'ADN devient difficile et la transcription est arrêtée au niveau de la lésion induite par l'agent alkylant, aboutissant à l'arrêt du cycle cellulaire. Les agents alkylants sont également capables de modifier les bases déjà incorporées dans l'ADN ainsi que les bases des dNTP, par ajout d'un groupement alkyle plus ou moins complexe, le plus simple étant le groupement méthyle (CH_3). L'alkylation ne nécessite pas de conditions particulières, ainsi dans les conditions physiologiques, ces groupements se lient aux atomes d'oxygène (O) ou d'azote (N) de l'ADN, préférentiellement aux positions N3 et N7 de l'adénine, O2 et N3 de la cytosine, O2, N3 et O4 de la thymine et N3, O6 et N7 de la guanine (Saffhill et al, 1985). La mutagénicité et l'implication de ces agents dans la cancérogenèse sont le plus souvent corrélées à la méthylation en position O6 de la guanine (O6-MeG). En effet, bien que les agents alkylants produisent essentiellement des bases N7-méthylguanine, c'est la production d'O6-MeG qui leur confère leur cytotoxicité (Swann et al, 1996).

2. c. Réparation des lésions O6-MeG par l'enzyme MGMT

La base modifiée O6-MeG est un produit majeur de l'alkylation de l'ADN, qui possède des effets toxiques, mutagènes et carcinogènes (Pegg et al, 1995). L'enzyme de réparation de l'ADN, qui a pour fonction de retirer spécifiquement les groupements méthyle situés en position O6 de la guanine, est la MGMT (enzyme anciennement dénommée ATase, AGT ou AGAT (O6-alkylguanine-DNA alkyltransférase). La MGMT est essentielle pour la cellule dans la défense contre les agents méthylants (Karran & Bignami, 1992). Cette enzyme est ubiquitaire et possède un mode d'action singulier par rapport aux autres voies de réparation de l'ADN puisqu'elle ne nécessite aucune autre protéine ou cofacteur. La MGMT possède un site accepteur du groupement alkyle, et elle transfère le groupement méthyle, de l'O6-MeG vers un de ses propres résidus cystéines (cystéine en position 145). La MGMT-méthylée est un produit inactif issu de cette réaction ce qui permet de la qualifier d'enzyme « suicide » (**Figure 4**). Ce processus qui est très rapide, est également saturable (Gerson, 1989). Comme la réparation est stœchiométrique, une molécule de MGMT réparant une base O6-MeG, un excès de bases

modifiées peut épuiser la réserve de la cellule en MGMT et nécessiter l'intervention d'autres systèmes de réparation, notamment le système MMR (Pegg, 2000).

Dans des modèles cellulaires d'inactivation de la MGMT ou dans des cellules dans lesquelles la MGMT est inhibée par la O6-benzyl guanine (O6-BzG), il a été montré que la perte de fonction de la MGMT provoquait une sensibilité des cellules aux agents méthylants (Branch et al, 1995; Dolan & Pegg, 1997; Gerson, 2002; Kaina et al, 1997). Par ailleurs, les fibroblastes de souris invalidées pour la Mgmt sont beaucoup plus sensibles au témozolomide que ceux provenant de souris de génotype sauvage (Glassner et al, 1999). Il a été également rapporté que les souris *Mlh1*$^{+/-}$ et *Mgmt*^{ko} développent des lymphome MSI lorsqu'elles sont traitées avec l'agent méthylant MNU, alors que les souris *Mlh1*$^{+/-}$ et *Mgmt*^{wt} restent asymptomatiques (Kawate et al, 2000). L'inhibition de la MGMT par la O6-BzG favorise aussi l'activité anti-tumorale du témozolomide *in vivo* (Friedman et al, 1995; Wedge & Newlands, 1996). Par conséquent, la réparation directe de l'O6-MeG par la MGMT semble être le mécanisme majeur de résistance des cellules aux effets cytotoxiques des agents alkylants. Pourtant, les agents alkylants sont fréquemment utilisés de manière efficace dans le traitement de certains cancers. Ce paradoxe a été élucidé par la découverte d'une répression transcriptionnelle fréquente de la MGMT liée à une hyperméthylation du promoteur du gène, dans les cellules tumorales (Esteller et al, 1999; Esteller & Herman, 2004; Middleton & Margison, 2003; Qian & Brent, 1997). Il a été proposé que l'analyse de la méthylation du promoteur de la MGMT permettrait de prédire la réponse des patients aux chimiothérapies qui comportent des agents alkylants (Esteller et al, 2000).

2. d. Tentative de réparation des lésions O6-MeG par le système MMR

Lorsque des lésions O6-MeG non réparées par la MGMT persistent dans l'ADN, elles sont prises en charge par la deuxième ligne de défense des cellules, le système MMR. Il a été montré que les cellules MMR-déficientes sont jusqu'à 100 fois plus résistantes aux agents alkylants de type SN1 que les cellules proficientes pour ce même système (Jiricny, 2006). En effet, les lignées cellulaires établies à partir de tumeurs MSI (HCT116, LoVo, HCT15 ...) sont plus tolérantes aux agents alkylants tels que le MNNG ou le MNU que les cellules MMR proficientes (Bignami et al, 2000; Branch et al, 1995; Hsieh & Yamane, 2008). Par ailleurs, dans une culture de fibroblastes

embryonnaires murins de souris *Msh2*$^{+/-}$, les agents alkylants sélectionnent les clones ayant perdu l'allèle sauvage *Msh2*, soit par perte d'hétérozygotie, soit par mutation selon l'agent utilisé (Branch et al, 1995). Ainsi, la résistance aux agents alkylants est associée à la perte d'expression ou de fonction des protéines du système MMR, particulièrement en l'absence de MGMT (Sanada et al, 2004). La cytotoxicité de ces agents alkylants a été mise en évidence par leur capacité à induire l'apoptose de cellules tumorales.

L'inactivation MMR confère aux cellules un avantage sélectif, par un phénomène de tolérance à la methylation, de manière analogue à ce qui a précédemment été décrit avec les thiopurines (Claij & Te Riele, 2002; Claij et al, 2003). Les résidus O6-MeG s'accumulent et sont susceptibles d'être reconnus comme des adénines au cours de la réplication de l'ADN ce qui crée des mésappariements (**Figure 5**) (Allan & Travis, 2005; Karran, 2001; Karran & Bignami, 1994; Karran & Hampson, 1996; Roos et al, 2007). Les lésions O6-MeG sont structurellement similaires aux lésions Me6-TG (Swann et al, 1996; Waters & Swann, 1997). La tolérance à la O6-MeG est donc associée à celle de la Me6-TG et les mécanismes impliqués dans l'échappement cellulaire à l'apoptose sont les mêmes dans les deux cas (Allan & Travis, 2005; Branch et al, 1993; Fishel, 1999; Mello et al, 1996; Moreland et al, 1999).

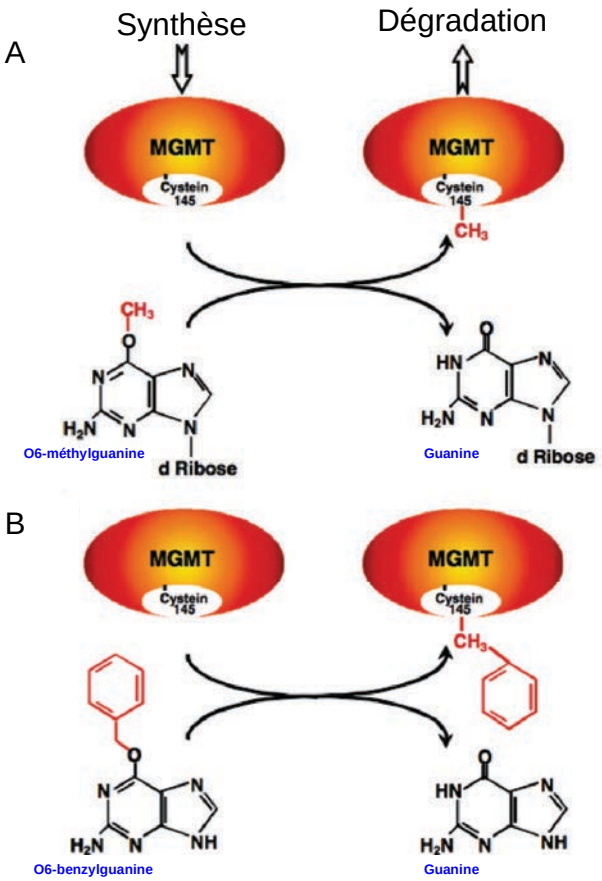


Figure 4. Prise en charge par la MGMT des bases modifiées O6-méthylguanine et du pseudosubstrat O6-benzylguanine. (A) Après la méthylation de l'ADN, le groupement méthyle (CH3) est transféré de l'O6-méthylguanine au site accepteur de l'enzyme MGMT ce qui induit sa dégradation par ubiquitination. **(B)** En présence d'O6-benzylguanine, le groupement benzyl est transféré à la cystéine en position 145 de la MGMT, ce qui entraine son inactivation et sa dégradation (d'après Kaina et al, 2010).

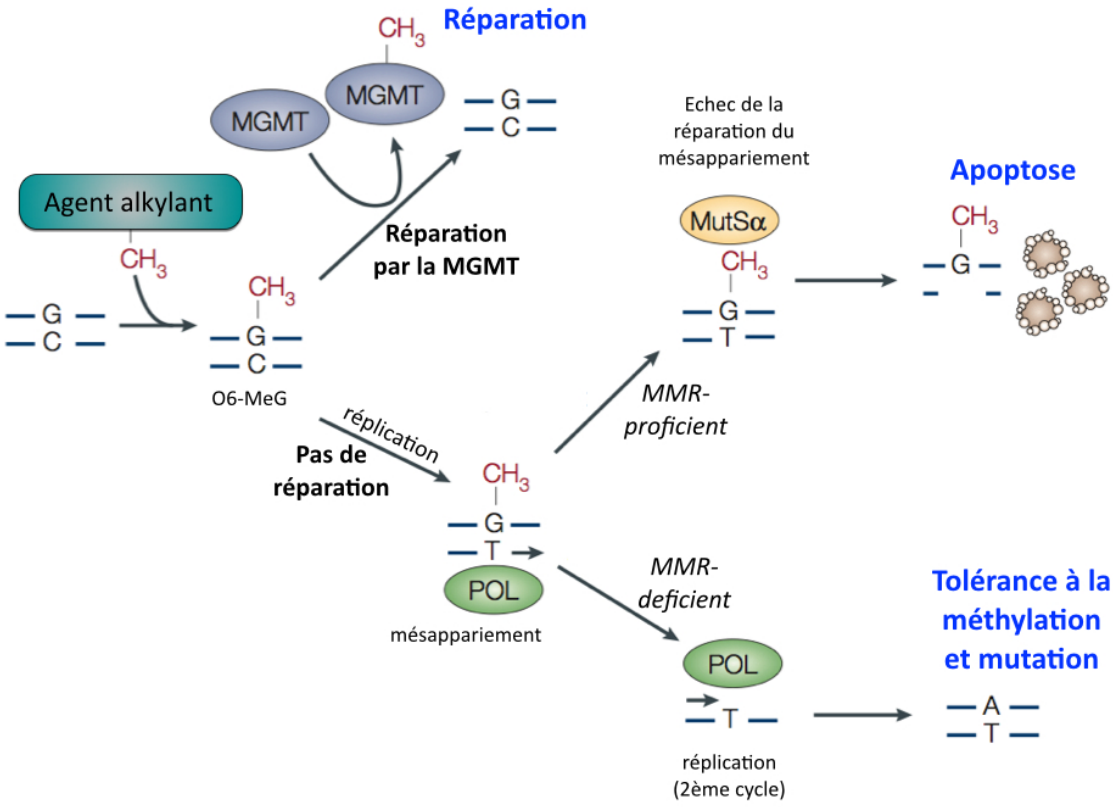


Figure 5. Prise en charge par l'enzyme MGMT et le système MMR des lésions O6-MeG induites par les agents alkylants. Illustration des trois devenirs possibles des lésions O6-méthylguanine (O6-MeG). (1) réparation de la lésion par la MGMT ; (2) cycles futiles de réparation conduisant les cellules MMR-proficientes (*mismatch repair*) à l'apoptose ; (3) survie des cellules MMR-déficientes *via* le mécanisme de tolérance à la méthylation, et accumulation de mutations pouvant conduire à la transformation cellulaire. MutSα, hétérodimère MSH2-MSH6; POL, ADN polymérase (d'après Allan & Travis, 2005).

Partie II. Les cancers caractérisés par une instabilité des microsatellites

Comme nous venons de le voir dans la première partie de cette revue bibliographique, le système MMR contrôle la fidélité du génome au cours de la réplication de l'ADN. Il n'est donc pas surprenant qu'un défaut de ce système engendre une instabilité génomique, se traduisant par une augmentation substantielle de la mutagenèse spontanée, qui peut conduire à la survenue de cancers. Ces cancers, qui se développent suite à une instabilité pouvant affecter les séquences répétées microsatellites du génome, sont de phénotype MSI (*microsatellite instability*). Dans la deuxième partie de cette revue bibliographique, nous débuterons par quelques mots sur le phénotype MSI en lui-même, avant d'évoquer brièvement les cancers MSI sporadiques, afin de nous concentrer sur les cancers MSI iatrogènes.

A. Le phénotype d'instabilité sur les séquences microsatellites du génome (MSI)

Bien que les cancers MSI aient historiquement été décrits dans des familles (cf. Partie III.) et donc dans un contexte héréditaire, ils surviennent plus fréquemment de manière sporadique. Par ailleurs, nous verrons que le phénotype MSI a également été rapporté dans certains cancers iatrogènes, survenant dans des contextes particuliers d'immunosuppression ou d'inflammation, contextes cliniques dans lesquels les traitements comprenant des thiopurines sont fréquemment prescrits aux patients.

1. Historique et définition du phénotype MSI

La présence d'une instabilité nucléotidique fut relatée pour la première fois lors d'une communication orale du groupe de M. Perucho à l'occasion d'un congrès international sur les oncogènes à Madrid en avril 1992. Après divers refus de journaux prestigieux, probablement dus à la grande nouveauté des faits décrits, ce n'est qu'en juin 1993 que Ionov et al. du groupe de M. Perucho, publient un article dans la revue Nature décrivant des « mutations somatiques ubiquitaires de séquences répétées dans les cancers colorectaux » (Ionov et al, 1993), un mois après que deux autres articles parus dans la revue Science aient relaté le même phénomène (Aaltonen et al, 1993; Thibodeau et al, 1993). Ce processus original, associé à la transformation

cellulaire, a été appelé MSI au cours d'une réunion internationale de consensus, dont le rapport a été publié fin 1998 (Boland et al, 1998).

L'oncogenèse MSI est caractérisée par une accumulation d'altérations nucléotidiques dans les microsatellites. Les séquences microsatellites sont des répétitions en tandem d'un motif de 1 à 6 bases qui sont réparties dans tout le génome avec une prépondérance dans les régions non codantes. En raison de leur nature répétée, les microsatellites sont souvent la cible d'erreurs de réplication commises par glissement de l'ADN polymérase sur la séquence d'ADN (Kim & Kang, 2014; Kim et al, 2013; Sinicrope & Sargent, 2012). Ainsi, l'instabilité de ces séquences se traduit par un changement de la taille des microsatellites par insertion ou délétion d'un ou plusieurs motifs nucléotidiques (**Figure 6**), ce qui est susceptible d'altérer la fonction d'un gène, en entraînant un décalage du cadre de lecture conduisant à la production d'une protéine tronquée. Cette protéine tronquée possède une extrémité C-terminale aberrante (Linnebacher et al, 2001).

2. Détermination du statut MSI des tumeurs humaines

La détermination du statut MSI des tumeurs peut être réalisée en étudiant l'expression des protéines du système MMR par immunohistochimie (IHC), ou en utilisant des marqueurs microsatellitaires pour évaluer le taux d'instabilité dans ces séquences par allélotypage.

2. a. Immunohistochimie sur tissu tumoral

L'IHC permet de déterminer l'expression des protéines grâce à des anticorps dirigés contre ces antigènes (ou séquences peptidiques). Les altérations des gènes MMR peuvent conduire à une perte de fonction et donc d'expression de la protéine. La détermination du statut MSI des tumeurs par IHC sur coupes tissulaires est réalisée en comparant l'expression des 4 principales protéines MMR (MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2) dans le tissu tumoral et dans la muqueuse saine environnante (**Figure 7A**). Il s'agit donc d'une méthode indirecte de détection du phénotype MSI.

Les protéines du système MMR agissent sous forme d'hétérodimères MLH1-PMS2 et MSH2-MSH6, comme décrit précédemment (cf. Partie I. A.). Lorsque la protéine MLH1 n'est pas

exprimée, il n'y a pas d'interaction avec la protéine PMS2. Cette dernière étant instable sous sa forme libre (non-complexée avec MLH1), elle est alors dégradée. Par contre, MLH1 reste stable en l'absence de PMS2, probablement parce qu'elle est capable d'interaction avec d'autres homologues de MutL, tels que PMS1 ou MLH3 (Bellizzi & Frankel, 2009; Raschle et al, 1999). C'est pourquoi en cas de perte d'expression de la protéine MLH1, on observe une perte d'expression conjointe de la protéine PMS2. Alors que la perte d'expression de la protéine PMS2 est dite exclusive. De la même façon, l'extinction de la protéine MSH2 s'accompagne d'une perte d'expression de la protéine MSH6, ce qui n'est pas réciproque.

L'IHC est une méthode qui présente de nombreux avantages : elle est facile à mettre en place, rapide, peu onéreuse, et peut donc être utilisée en routine. Les anticorps dirigés contre les protéines MSH2, MSH6, MLH1 et PMS2 montrent 92% de sensibilité dans l'identification des tumeurs (Shia, 2008). Cependant, plusieurs limitations sont d'ores et déjà rapportées relatives à l'absence de standardisation dans la fixation des tissus ou le choix des anticorps (Shia, 2008). Par ailleurs, il est généralement admis que l'IHC est moins fiable sur de petits échantillons de tissu (Zhang, 2008). À ces difficultés d'interprétation se surajoute le problème lié aux mutations faux sens, responsables d'une perte de fonction d'un gène MMR, sans perte d'expression du gène impliqué. Dans ce cas, l'IHC détecte la présence d'une protéine non fonctionnelle ; le marquage IHC est positif alors qu'il y a une déficience MMR (Bellizzi & Frankel, 2009; Wahlberg et al, 2002). Des données contradictoires existent concernant la sensibilité et l'utilisation de l'IHC en tant qu'outil de criblage des tumeurs MSI (Chapusot et al, 2004; Overbeek et al, 2008).

2. b. Phénotype d'instabilité des microsatellites dans le tissu tumoral

Dans cette méthode, le statut MSI des tumeurs est déterminé par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) de marqueurs microsatellitaires (ou allélotypage). Historiquement, un panel de cinq marqueurs comprenant deux marqueurs mononucléotidiques (BAT25 et BAT26) et trois marqueurs dinucléotidiques (D5S346, D2S123 et D17S250) était utilisé (Boland et al, 1998). Une tumeur était considérée comme MSI si deux marqueurs sur cinq étaient instables. En raison de leur nature hautement polymorphe, l'interprétation du profil des marqueurs dinucléotidiques nécessite une comparaison avec l'ADN germinal du patient, or ce

matériel n'est pas toujours disponible (Umar et al, 2004). Par ailleurs, les tumeurs MSI dues à une altération du gène *MSH6* sont indétectables sur les marqueurs dinucléotidiques alors que l'utilisation de marqueurs mononucléotidiques permet de détecter la majorité des CRC déficients pour *MSH6* (Goel et al, 2010). Cela est dù à l'incapacité du complexe protéique MSH2-MSH6 à reconnaître les boucles d'insertion/délétion de plus d'une paire de bases (Modrich, 2006).

A l'heure actuelle, la méthode de référence utilisée pour déterminer le statut MSI des tumeurs est un panel de cinq marqueurs mononucléotidiques quasi-monomorphes dans la population mondiale (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 et NR-27, « PCR pentaplex ») (**Figure 7B**), mis au point par notre groupe (Suraweera et al, 2002). La pentaplex est hautement sensible et spécifique, et ne nécessite pas une comparaison de l'ADN tumoral et germinal (Buhard et al, 2006). Cependant, beaucoup de laboratoires utilisent encore d'autres panels (Hegde et al, 2014). L'allélotypage MSI est une méthode efficace qui présente une sensibilité de 93% dans l'identification des tumeurs issues d'individus ayant une mutation germinale d'un gène MMR (Shia, 2008). Par ailleurs, ce test requiert très peu de matériel biologique et il est hautement reproductible (Zhang, 2008). Néanmoins, dans certains tissus, l'instabilité peut ne pas être détectée à cause de difficultés techniques comme une trop faible quantité d'ADN dans les tumeurs extrêmement mucineuses (Hampel et al, 2005).

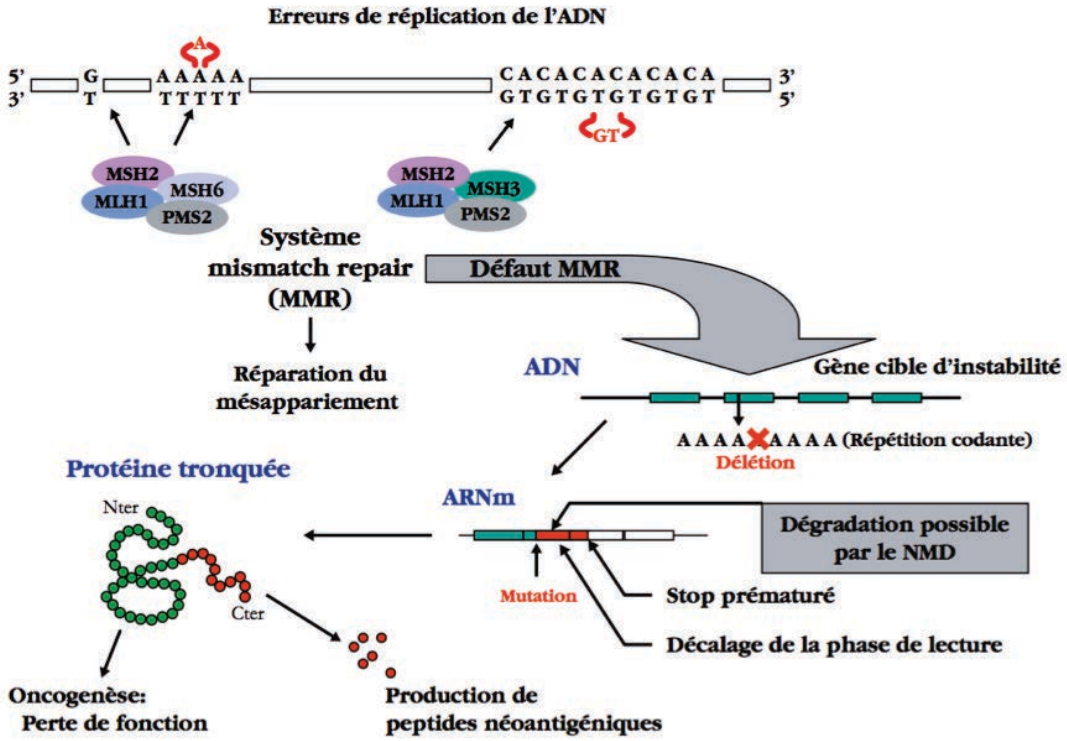


Figure 6. ***Pathway mutator*** **de l'instabilité des microsatellites (MSI).** La conséquence directe de la déficience du système MMR (*mismatch repair*) est l'accumulation de mutations dans l'ADN, particulièrement au niveau de séquences répétées dites microsatellites. L'instabilité des microsatellites est susceptible d'altérer la fonction d'un gène, en entraînant un décalage du cadre de lecture conduisant à la production d'une protéine tronquée présantant une extrémité C-terminale aberrante (d'après Hamelin et al, 2008).

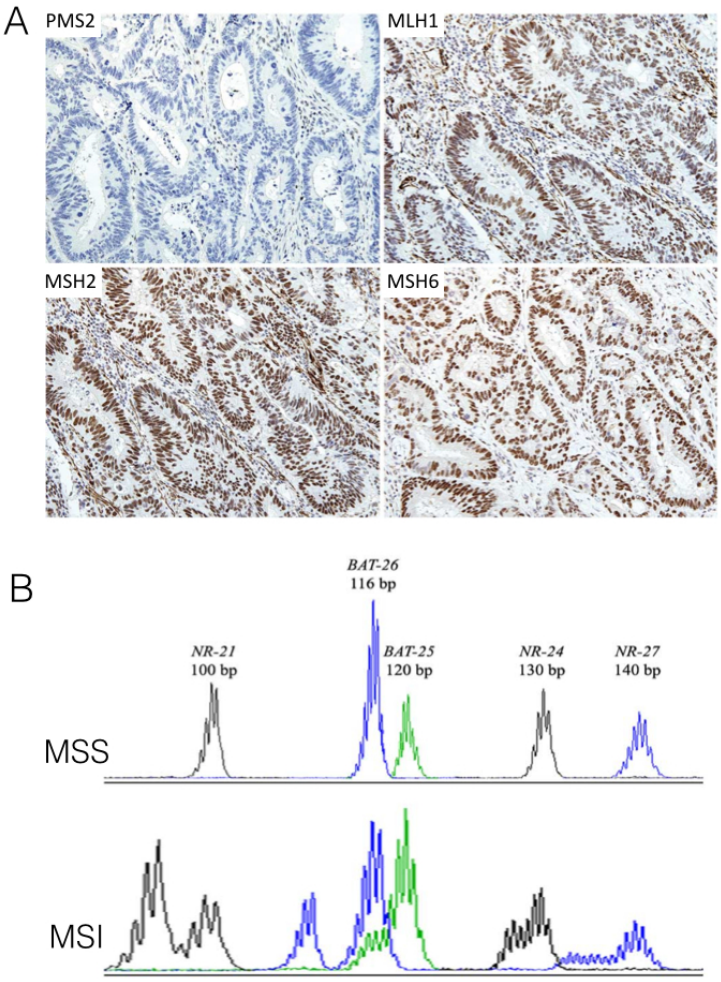


Figure 7. Détermination du statut MSI (*microsatellite instability*) des tumeurs. (A) Par immunohistochimie (IHC) des quatre protéines MMR (*mismatch repair*) ; exemple de perte d'expression de marquage PMS2 dans un cancer colorectal, avec conservation de l'expression de MLH1, MSH2 et MSH6 (x200) (d'après (Mojtahed et al, 2011)). **(B)** Par allélotypage à l'aide des cinq marqueurs microsatellitaires de la pentaplex, BAT26, BAT25, NR21, NR24 et NR27 ; exemple de cancer stable sur les microsatellites (MSS) (en haut) et MSI (en bas) (d'après Laghi et al, 2012).

B. Cancers de phénotype MSI

1. Description des cancers MSI sporadiques

Les cancers MSI sporadiques touchent principalement le côlon, l'estomac et l'endomètre et ils sont de survenue plus tardive que les cancers MSI héréditaires (Boland et al, 1998). D'un point de vue moléculaire, la majorité des tumeurs MSI sporadiques ne présente aucune altération génétique des gènes MMR (Liu et al, 1995). En effet, dans ces tumeurs, le système MMR est inactivé principalement par une méthylation des cytosines des îlots CpG du promoteur du gène *MLH1*, et rarement par un événement mutationnel (Halling et al, 1999; Herman et al, 1998; Kane et al, 1997; Simpkins et al, 1999; Veigl et al, 1998). Cette méthylation aberrante, qui est somatique et biallélique, conduit à la répression transcriptionnelle (*silencing*) du gène dans le tissu tumoral et par conséquent, à l'absence d'expression de la protéine. L'inactivation du gène *MLH1* est responsable de 90% des cancers sporadiques du colon. Plus rarement, il s'agit d'une mutation inactivatrice associée à une perte d'hétérozygotie.

2. Cancers MSI iatrogènes

Dans cette sous-partie, nous nous intéresserons à un phénotype de cancers MSI d'identification récente survenant dans des contextes cliniques particuliers d'immunosuppression ou d'inflammation. Deux hypothèses principales sous-tendent l'émergence de cancers MSI dans ces contextes cliniques, d'une part l'immunosuppression *per se*, car les tumeurs MSI sont connues pour être très immunogènes et une levée de l'immunosurveillance pourrait favoriser leur émergence. En effet, le processus oncogénique MSI génère dans les cellules tumorales de nombreux peptides néo-antigéniques présentant une extrémité C-terminale aberrante aux propriétés néo-antigéniques (nouvelles séquences peptidiques). Ces peptides néo-antigéniques sont susceptibles d'être à l'origine du déclenchement d'une réponse immunitaire spécifique de l'hôte contre les cellules tumorales MSI (Ishikawa et al, 2003; Saeterdal et al, 2001; Schwitalle et al, 2008). Par ailleurs, il a été montré *in vitro* que des cellules T issues de patients ayant une tumeur MSI étaient capables de reconnaître des néo-antigènes tumoraux spécifiques du phénotype MSI sans aucune stimulation préalable (Schwitalle et al, 2008). L'infiltration massive des tumeurs MSI par des cellules immunes témoigne d'une immunité anti-tumorale active (Kim

et al, 1994; Lothe et al, 1993; Smyrk et al, 2001), et il est reconnu que l'intensité de ce processus immun déclenché par l'hôte contre la tumeur joue un rôle important pour contrôler la progression de ces cancers (Nosho et al, 2010). L'hypothèse alternative qui sous tend l'émergence de cancers MSI dans ces contextes cliniques étant que certaines molécules immunosuppressives telles que les thiopurines, puissent favoriser la sélection de clones cellulaires MMR déficients par un phénomène de tolérance aux thiopurines. Dans la suite de ce manuscrit, j'ai donc cherché à documenter les différents types de cancers iatrogènes MSI pouvant survenir dans divers contextes cliniques, en tentant de faire le lien avec le traitement par une thiopurine en particulier, l'Aza, quand cela a été possible.

2. a. Leucémies aiguës myéloblastiques

Les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) sont une forme de cancers secondaires le plus fréquents, rencontrée dans différents contextes cliniques. Les LAM représentent notamment une complication fréquente chez les patients transplantés d'organe ayant reçu un traitement immunosuppresseur pour prévenir un rejet de la greffe. Contrairement aux cancers qui sont connus pour impliquer des virus, les LAM montrent un retard dans l'apparition, avec un délai d'environ 3 à 5 ans après la transplantation. Dans une étude portant sur une petite série de LAM du patient transplanté d'organe, 7/7 des LAM analysées étaient de phénotype MSI contre 0/28 des LAM survenues *de novo*. De plus, une relation a été montrée entre la prise d'Aza dans le traitement immunosuppresseur et la survenue des LAM de phénotype MSI (Offman et al, 2004).

Les LAM sont également fréquentes chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Les MICI, qui regroupent la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH), sont des lésions inflammatoires chroniques atteignant le tractus digestif (Hanauer, 1996; Modigliani, 2000; Moum et al, 1997). Le diagnostic d'une MICI est posé sur la base des données cliniques et familiales. En général, ces données suffisent à distinguer la MC de la RCH, mais dans environ 10% des cas, ce n'est pas possible et les patients sont classés comme atteints d'une colite chronique dite indéterminée (Podolsky, 2002a; Podolsky, 2002b). Ces lésions sont associées à une réponse anormale du système immunitaire intestinal, et des facteurs environnementaux (alimentaires, infectieux, tabac, médicamenteux) et

génétiques (gènes de susceptibilité) sont de plus en plus incriminés comme étant des facteurs étiologiques. La première description de LAM secondaires survenant dans un contexte de MICI date de 1980 et rapporte 5 cas de LAM parmi 400 patients atteints de MICI traités sur une période de 8 ans (Fabry et al, 1980). Depuis, de nombreux autres cas ont été décrits dont certains associés à un traitement par les thiopurines mais aucune de ces études n'a investigué le statut microsatellite des tumeurs (Das et al, 2010; Kallel et al, 2010). Chez les patients atteints de MICI, le temps d'exposition passée aux thiopurines (Aza et 6-MP) augmente le risque de survenue de LAM d'un facteur 7, alors que chez ces mêmes patients, un traitement en cours par ces thiopurines n'augmente pas le risque de LAM secondaire (Lopez et al, 2014).

Enfin, les LAM sont fréquemment rencontrées chez les patients traités pour un cancer primitif. Il est particulièrement intéressant de noter que la fréquence du phénotype MSI est sur-représentée dans les LAM secondaires consécutives à un traitement pour un cancer primitif par rapport aux LAM *de novo* (50% Vs 5%). La plupart de ces patients ont reçu un traitement par chimio ou radiothérapie mais les traitements sont variés et souvent non précisés ce qui rend difficile une association entre le phénotype MSI et un traitement particulier. Il a également été rapporté que les LAM secondaires constituent une complication potentielle du traitement des leucémies lymphoblastiques aiguës après traitement par les thiopurines, cependant dans cette étude la question du phénotype MSI n'a pas été investiguée (Relling et al, 1998).

Quel que soit le contexte clinique d'immunosuppression ou d'inflammation, la contribution des thiopurines dans la survenue de LAM iatrogènes de phénotype MSI, peut s'expliquer par un avantage sélectif des précurseurs myéloïdes présentant une déficience MMR, ce qui mime les expériences *in vitro* conçues pour sélectionner les rares cellules MMR-déficientes au sein d'une population cellulaire (Aquilina et al, 1990; Branch et al, 1993; Offman et al, 2004).

2. b. Lymphomes non-Hodgkiniens

Le syndrome lymphoprolifératif post-transplantation (PTLD, *post transplant lymphoproliferative disorders*) comprend toutes les lymphoprolifération qui surviennent après une greffe d'organe dont les lymphomes non-Hodgkiniens (LNH). Une proportion conséquente des patients transplantés d'organe développe un LNH après un traitement immunosuppresseur au long

cours. La majorité des PTLD est EBV positive (80% des cas) (Wistinghausen et al, 2013; Young & Murray, 2003; Young & Rickinson, 2004). Cependant, des cas de PTLD EBV négatifs ont aussi été décris et sont de survienue plus tardive que ceux EBV positifs (Leblond et al, 2001). Les LNH du sujet immunodéprimé sont également majoritairement (entre 50 et 70%) liés à une infection par le virus EBV qui a un tropisme pour les lymphocytes B. On considère que plus de 90% de la population générale est infectée par EBV, mais ce virus reste latent dans la majorité des cas. Néanmoins, chez le sujet immunodéprimé, des réactivations virales sont possibles et peuvent évoluer vers des lymphoprolifération malignes de type B essentiellement. La plupart des PTLD surviennent l'année suivant la greffe, lorsque l'immunosuppression thérapeutique est la plus importante. Parmi les patients atteints du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA ou HIV, *human immunodeficiency virus*), l'incidence de LNH est estimée à 10%.

Les résultats cumulés de plusieurs études montrent que le phénotype MSI est très rare (<5%) dans les hémopathies malignes survenant dans la population générale (Gamberi et al, 1997; Hodges et al, 1999; Takeuchi et al, 1997; Tasaka et al, 1997; Volpe et al, 1996). En 2004, une étude menée au laboratoire portant sur 603 cas de LNH a mis en évidence 12 cas MSI (2%) confirmant la rareté de ce phénotype dans ce type de tumeurs (Duval et al, 2004). De manière intéressante, ce phénotype était exclusivement observé chez des patients immunodéprimés (0 MSI/364 LNH du sujet immunocompétent), soit au cours d'une infection par le HIV (3/128 ; 2,3%), soit suite à une greffe d'organe associée à un traitement immunosuppresseur au long cours (9/111 ; 8,1%) (Duval et al, 2004; Borie et al, 2004). Ces études ont suggéré l'importance d'un contexte d'immunosuppression dans l'émergence de ce phénotype MSI. Diverses études ont rapporté la survenue de lymphomes de phénotype MSI (Gaidano et al, 1997; Larson et al, 1996; Offman et al, 2004; Zhu et al, 1999). Par ailleurs, un lien (P=0,05) a été établi entre la survenue de LNH de type MSI et un traitement par l'Aza (Borie et al, 2009). Toutefois, cette association n'est pas absolue car parmi les patients transplantés ayant développé un lymphome MSI, 2 n'ont pas reçu d'Aza. Les LNH de type MSI sont plus fréquemment d'origine T que B (33% Vs 4,7%) et ils surviennent significativement plus longtemps après la greffe (84 mois Vs 10,5 mois pour les LNH non MSI). En 1995, il avait déjà été rapporté sur une petite série que 4/6 des LNH survenant chez des patients infectés par le HIV, étaient de phénotype MSI, suggérant que ce

phénotype est une caractéristique singulière des LNH associés à ce contexte particulier d'immunosuppression (Bedi et al, 1995).

Le risque accru de développer une LPD ne concerne pas seulement les patients transplantés d'organe, d'autres contextes d'immunodéficience iatrogénique comme la polyarthrite rhumatoïde, étant également associés à une augmentation de l'incidence de LNH. Ainsi, le risque relatif de développer un LNH est de 2,5 chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde qui n'ont pas été traités par un immunosuppresseur alors qu'il passe à 10 chez les patients traités notamment par l'Aza (Kinlen, 1992; Pinals, 1976; Silman et al, 1988). La fréquence du phénotype MSI dans ce contexte n'est pas documentée. Par ailleurs, les patients atteints de MICI ont un risque accru de développer un LPD lorsqu'ils sont traités avec une thiopurine (Beaugerie et al, 2009). Dans notre étude, nous avons criblé une série restreinte de LPD chez des patients MICI et mis en évidence 1 cas sur 13 avec un phénotype MSI chez un patient ayant reçu de l'Aza (cf. Article 2).

2. c. Cancers cutanés

Parmi les cancers développés chez les patients transplantés d'organe, les cancers cutanés sont les plus représentés 10 ans après la greffe (Bordea et al, 2004; Euvrard et al, 1995; Hartevelt et al, 1990). Plusieurs études ont rapporté l'absence de phénotype MSI dans les cancers cutanés iatrogènes liés à une immunodéficience. L'analyse d'une grande série de cancers cutanés survenant dans un contexte d'immunosuppression, comprenant 63 sarcomes de Kaposi (dont 47 liés au HIV et 16 post-transplantation) et 30 cancers spinocellulaires, n'a pas montré de phénotype MSI (Borie et al, 2010). Une autre étude portant sur 20 cancers spinocellulaires issus de patients transplantés d'organe tous traités avec de l'Aza et 7 carcinomes basocellulaires dont 5 issus de patients transplantés d'organe traités avec de l'Aza, n'a pas non plus mis en évidence de phénotype MSI (Wisgerhof et al, 2009). Une troisième étude portant sur 52 cancers spinocellulaires issus de patients transplantés d'organe tous traités avec de l'Aza ne montre pas de différence avec une série de 34 cancers spinocellulaires issus de patients immunocompétents (aucun phénotype MSI) (Perrett et al, 2010).

Il semble donc que dans les cancers cutanés iatrogènes, le mode de transformation soit indépendant d'un *pathway* MSI. Il a été proposé que les thiopurines participent à l'oncogenèse non pas *via* une pression de sélection des cellules MMR-déficientes, mais en induisant une hyper sensibilisation de l'ADN contenant les thiobases aux radiations ultraviolettes (UV). En effet, l'exposition aux UV est la principale cause de cancers cutanés. Il a été suggéré que la réaction photochimique entre les 6-TG incorporées dans l'ADN des kératinocytes après traitement par l'Aza et les UVA, génère des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*) mutagènes (Hemmens & Moore, 1986; O'Donovan et al, 2005). Il a été montré que chez les patients transplantés d'organe, l'immunosuppression systémique à long terme avec de l'Aza conduit à un taux détectable de 6-TG dans l'ADN des cellules de la peau et des lymphocytes (Cuffari et al, 2004; O'Donovan et al, 2005; Warren et al, 1995). Ce taux de 6-TG ne devrait pas être suffisant pour générer un taux de Me6-TG permettant de déclencher une toxicité liée au système MMR, mais il pourrait conférer une sensibilité cellulaire aux UVA (320-400nm). En effet, la peau des patients traités par de l'Aza est hypersensible à la lumière UV. Les bases canoniques des acides nucléiques (ADN et ARN) ont une absorbance maximale autour de 260nm ce qui correspond au spectre des UVC (190-290nm) ; ainsi la suppression des lésions induites par les UVC réduit considérablement la menace de destruction de l'ADN par des dommages photochimiques. Les thiopurines (6-TG et 6-MP) ont une absorbance maximale dans le spectre des UVA autour de 340 nm (**Figure 8**) or les UVA représentent 90% des radiations ultraviolettes solaires. En raison de sa longueur d'onde, le rayonnement UVA pénètre beaucoup plus profondément dans la peau. On estime que 20 à 30% des UVA à la surface de la peau pénètrent les couches inférieures qui contiennent les cellules souches responsables du renouvellement de la peau. Les dommages de l'ADN produits par les ROS générés à partir de la 6-TG sont possiblement en cause dans la très haute incidence de cancers cutanés chez les patients transplantés d'organe traités avec de l'Aza en comparaison avec les mêmes types de patients traités avec d'autres molécules immunosuppressives (Crespo-Leiro et al, 2008; Ulrich & Stockfleth, 2007).

2. d. Néoplasies intestinales compliquant une MICI

Bien que les CCR compliquant une MICI ne représentent qu'un pourcent des CCR, ils sont considérés comme appartenant à un groupe de sujets à risque. Le phénotype MSI a été précédemment signalé comme étant une caractéristique de certains CCR associés à des MICI, avec des fréquences variables allant de 1% à 45% (Aust et al, 2005; Brentnall et al, 1996; Cawkwell et al, 2000; Fleisher et al, 2000; Lyda et al, 2000; Schulmann et al, 2005; Suzuki et al, 1994; Willenbucher et al, 1999). Les CCR MSI survenant dans un contexte de MICI sont principalement dus à un *silencing* induit par la méthylation du promoteur du gène *MLH1* (Aust et al, 2005; Fleisher et al, 2000; Schulmann et al, 2005). Schulmann et al. ont montré des différences significatives dans le répertoire des gènes cibles de l'instabilité des microsatellites entre les CCR MSI survenant dans un contexte MICI et ceux qui sont sporadiques (Schulmann et al, 2005). Une étude de notre groupe a décrit une série de 27 néoplasies intestinales MSI dont 20 CCR et 7 lésions dysplasiques issues de 17 patients MICI (17/205 soit 8,3%) dont 10 avec une colite ulcérative et 7 avec une maladie de Crohn. Dans cette étude ainsi que dans une série élargie, il n'y a pas d'association entre la survenue d'un phénotype MSI et un traitement par l'Aza. Les lésions sont caractérisées par la perte de n'importe quelle protéine MMR indépendamment du statut de méthylation du promoteur du gène *MLH1.* Ces CCR de phénotype MSI compliquant une MICI ont fréquemment des mutations du gène *BRAF* et sont de survenue plus précoce que ceux du contexte sporadique (Svrcek et al, 2007).

Les immunomodulateurs et notamment l'Aza, la 6-MP, le methotrexate et la ciclosporine sont utilisés comme traitement d'entretien des MICI (Atreya & Neurath, 2008a; Atreya & Neurath, 2008b). La susceptibilité de la 6-TG à l'oxydation chimique suggère que les patients atteints de MICI traités par l'Aza présentent un risque accru de développer des tumeurs. Or l'Aza reste le traitement le plus courant et la 6-TG est le métabolite final du métabolisme de l'Aza (cf. Partie I. B.) (Frei et al, 2013). Il y a de nombreux arguments en faveur de l'utilisation des thiopurines dans le traitement des MICI ; en effet il s'agit d'un traitement peu onéreux, et bien décrit car prescrit depuis plusieurs années (Louis et al, 2014). Par ailleurs, une étude récente a été menée afin d'optimiser le traitement par l'Aza des patients atteints de MICI (Curkovic et al, 2013).

Bien que le mécanisme sous-jacent soit encore mal compris, l'augmentation du risque de CCR dans la rectocolite hémorragique semble être en partie lié à MSI (Brentnall et al, 1996; O'Sullivan et al, 2002). Il a été démontré que des ROS peuvent conduire à une instabilité microsatellite (Jackson et al, 1998). L'hypothèse qui prévaut est que la surproduction de radicaux libres sature la capacité de la cellule à réparer les dommages oxydatifs de l'ADN (Agoff et al, 2000; Brentnall et al, 1996). Des expériences *in vitro* ont montré que le stress oxydant peut inactiver le système MMR et être ainsi à l'origine d'un phénotype MSI. Une autre hypothèse est que les dommages oxydatifs prolongés et répétés soient directement responsables d'une inactivation d'un des gènes du système MMR (Chang et al, 2002).

Chez des patients atteints de RCH, il a été observé une augmentation de l'activité des enzymes 3-méthyladénine ADN glycosylase et endonucléase apurinique, liée à une réponse adaptative survenant dans les régions de côlon subissant une inflammation. De manière intéressante, ce déséquilibre enzymatique pourrait être associé à un phénotype MSI par des mécanismes encore mal définis (Hofseth et al, 2003). Une hyperméthylation des promoteurs de différents gènes est fréquemment retrouvée dans les CCR compliquant une MICI et pourrait être une conséquence directe de l'état d'inflammation chronique. Une hyperméthylation des îlots CpG est décrite également dans de nombreuses muqueuses coliques qui, bien qu'adjacentes à des lésions cancéreuses, sont d'apparence saine (Giovannucci & Ogino, 2005). En particulier, l'hyperméthylation du promoteur du gène MGMT est fréquente dans les CCR compliquant une MICI (environ 50%) et dans la muqueuse saine adjacente. Il a été rapporté que la déficience en MGMT était un évènement initiateur de la tumorigenèse colorectale (Chai & Brown, 2009; Shen et al, 2005). L'hypothèse est qu'une déficience en MGMT favoriserait l'émergence de clones cellulaires MMR déficients, par un phénomène de tolérance à la méthylation (Svrcek et al, 2010).

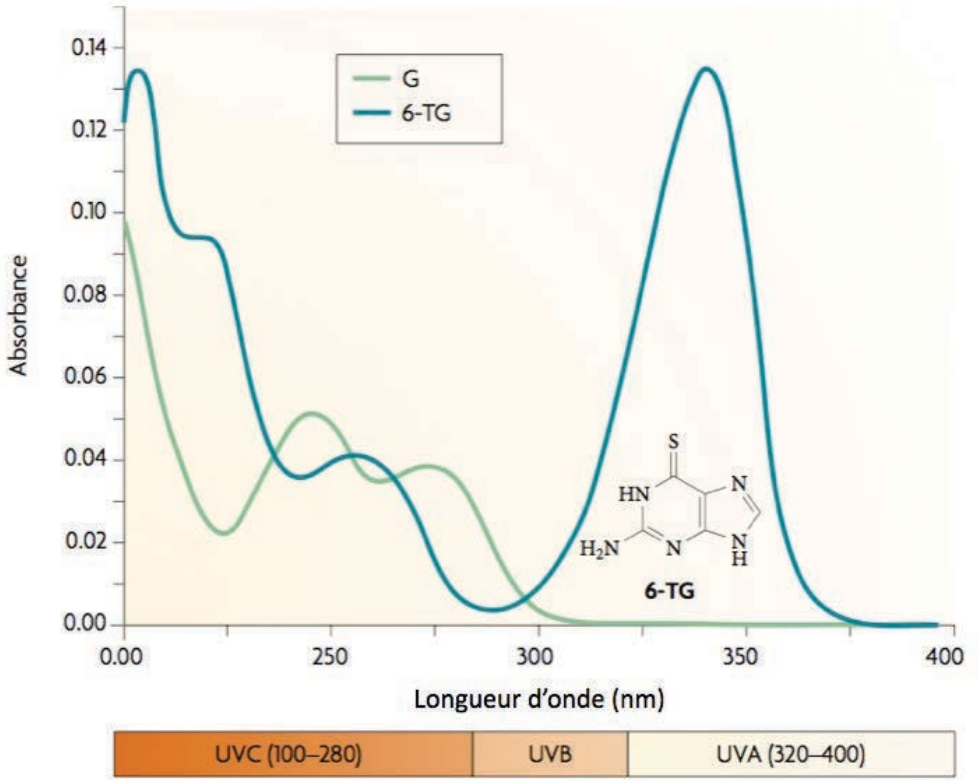


Figure 8. Spectres d'absorbance de la 6-thioguanine (6-TG) et de la guanine (G)**.** Les bases canoniques, telles que les purines, par exemple la guanine n'ont pas d'absorbance significative dans le rayonnement ultraviolet (UV) de longueur d'onde supérieur à 300 nm. Le remplacement de l'atome d'oxygène en positions 6 de la guanine par le groupement thio (S) modifie le spectre d'absorbance qui atteint son maximum dans la région des UVA (340 nm) (d'après Karran & Attard, 2008).

Partie III. Syndromes héréditaires de prédisposition aux cancers MSI

Depuis une vingtaine d'années, la déficience du système MMR est connue pour contribuer à l'instabilité génomique et au développement de cancers de phénotype MSI. Historiquement, l'implication des gènes MMR dans le développement de cancers MSI a été mise en évidence dans un contexte de prédisposition génétique au cancer, à savoir le syndrome de Lynch (LS pour Lynch Syndrome). Dans la troisième partie de cette revue bibliographique, je commencerai par présenter le syndrome de Lynch qui est la prédisposition héréditaire aux cancers MSI la mieux décrite; puis, je détaillerai la seconde prédisposition héréditaire aux cancers MSI, qui est beaucoup plus rare certes, mais aussi nettement plus sévère, le syndrome CMMRD, auquel je me suis intéressée dans l'un des axes de mes travaux de recherche.

A. Le syndrome de Lynch, une prédisposition fréquente aux cancers MSI

1. Définition du syndrome de Lynch (LS)

Jusqu'à la fin des années 1970, les familles recensées par le Dr H. T. Lynch étaient décrites du point de vue clinique comme des « syndromes de cancers familiaux » et ce, jusqu'à ce que le terme de « syndrome de Lynch » soit employé par les Dr Boland et Troncale en 1984 (Boland & Troncale, 1984). Le LS est l'un des syndromes héréditaires de prédisposition au cancer les plus fréquents, il représente 2 à 7% de l'ensemble des cancers colorectaux, et sa prévalence est estimée entre 1/500 et 1/1000 dans la population générale (Chen et al, 2005; Umar, 2006). Par le passé, le LS a aussi été nommé HNPCC (hereditary non polyposis colorectal cancer), mais cette appellation est aujourd'hui moins utilisée, car elle se limite au spectre tumoral restreint (ou syndrome de Lynch de type I), caractérisé principalement par les tumeurs coliques, alors que le syndrome de Lynch de type II, recouvre également d'autres localisations tumorales (ovaire, …) (Aaltonen et al, 1993). De nos jours, la définition du LS est moléculaire et non plus clinique (Boland & Lynch, 2013; Lynch & Lynch, 2013).

1. a. Caractéristiques moléculaires et génétiques du LS

Brièvement, le syndrome de Lynch se transmet selon un mode autosomique dominant. Les patients atteints du LS sont porteurs d'une mutation monoallélique germinale d'un gène du système MMR, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* ou *PMS2*, qui les prédispose au cancer. Une altération somatique de l'allèle sauvage suffit à inactiver le système MMR selon le modèle des « two hits » de Knudson et peut conduire à la transformation cellulaire par un processus d'instabilité nucléotidique. Cette inactivation somatique de l'allèle sauvage peut résulter d'une délétion, d'une mutation ponctuelle ou d'une méthylation du promoteur du gène (Potocnik et al, 2001).

La méthylation du promoteur du gène *MLH1*, déjà évoquée dans les CCR MSI sporadiques, ne permet cependant pas d'exclure formellement un LS, notamment chez les patients présentant des antécédents familiaux et une tumeur survenant à un âge précoce, ces deux éléments évoquant un LS. En effet, dans le LS, la méthylation du gène *MLH1* peut constituer le second hit chez un patient porteur d'une mutation germinale (Bellizzi & Frankel, 2009; Niessen et al, 2009). De plus, il existe des cas de méthylation constitutionnelle du promoteur du gène *MLH1*, responsable d'un LS (Goel et al, 2011). Par ailleurs, une méthylation somatique de *MSH2* a été décrite comme étant le second hit chez 24% des patients présentant une mutation germinale de *MSH2*, mais n'a jamais été rapportée dans les CCR sporadiques (Nagasaka et al, 2010).

La répartition des altérations des gènes MMR est la suivante : 50% des mutations affectent le gène *MLH1*, 40% *MSH2*, 7 à 10% *MSH6* et moins de 5% *PMS2*. Les gènes *MLH3* et *PMS1* sont exceptionnellement mutés (moins de 2% des cas) (Berends et al, 2002; Goel et al, 2011; Kuiper et al, 2009; Miyaki et al, 1997; Niessen et al, 2009; Peltomaki, 2003; Senter et al, 2008) (**Figure 11A**). Certaines familles présentent un phénotype de syndrome de Lynch typique avec un phénotype MSI associé à une perte d'expression de la protéine MSH2, mais sans aucune mutation germinale identifiée sur les gènes du système MMR. Dans ces familles, il a été montré que la délétion germinale du gène *EpCAM* (*epithelial cell adhesion molecule*) (Ligtenberg et al, 2009), provoque une fusion des transcrits EpCAM-MSH2 conduisant à de l'inactivation de la protéine MSH2, et qui serait responsable d'environ 1 à 3% des LS (Niessen et al, 2009).

1. b. Spectre clinique du LS et corrélation génotype – phénotype

Les tumeurs associées au spectre clinique du syndrome de Lynch surviennent en moyenne au cours de la quatrième décade de vie. Dans le LS, on peut distinguer d'une part, le spectre restreint: côlon, endomètre, vessie, voies urinaires (bassinet et uretère), intestin grêle, et d'autre part, le spectre large: estomac, voies biliaires, ovaires (Vasen et al, 1999). L'hétérogénéité dans l'expression clinique du syndrome de Lynch est une observation ancienne et différentes études ont permis d'établir une relation entre le gène muté et le phénotype clinique. Ainsi, il est désormais établi que les mutations constitutionnelles du gène *MSH6* sont associées à un moindre risque de cancers colorectaux et à un risque majoré de cancers de l'endomètre (Akiyama et al, 1997; Kolodner et al, 1999; Watson et al, 2008; Wijnen et al, 1999). Il est également probable que le risque de cancers «extra-colorectaux», et notamment de cancers des voies excrétrices urinaires, soit plus élevé en cas de mutation constitutionnelle du gène *MSH2* qu'en cas de mutation du gène *MLH1*. L'étude de Senter et al. qui a porté sur 39 familles, montre que la mutation du gène *PMS2* conduit à un phénotype atténué avec un risque réduit de cancer et un âge moyen au diagnostic tardif (Senter et al, 2008).

2. Identification des patients atteints du syndrome de Lynch

2. a. Critères d'identification des patients à risque pour le LS

Les critères d'identification dits d'Amsterdam permettent de détecter les individus présentant un risque accru de développer un cancer à un âge précoce. Les critères d'Amsterdam I définissaient cliniquement le LS mais ils ne tenaient compte que des CCR. En 1998, les critères d'Amsterdam II (**Tableau 2**) prennent également en compte d'autres localisations tumorales (endomètre, intestin grêle, voies urinaires) (Vasen et al, 1999). Ces critères d'Amsterdam sont très spécifiques mais peu sensibles (Vasen et al, 2007), d'où la nécessité d'une révision qui a conduit aux critères de Bethesda (Rodriguez-Bigas et al, 1997) eux-mêmes réévalués en 2002 (critères de Bethesda révisés) (**Tableau 3**) (Umar et al, 2004). Néanmoins, ces critères n'ont qu'une sensibilité de 40 à 80% dans une population sélectionnée (Gologan & Sepulveda, 2005; Lynch & de la Chapelle, 2003; Wolf et al, 2006). Ils permettent d'orienter une personne à risque pour le LS dans le cadre du dispositif national d'oncogénétique (**Figure 9**). Les patients

remplissant ces critères sont suspectés d'être atteints du LS et une recherche de mutation constitutionnelle est nécessaire pour poser de manière définitive le diagnostic.

2. b. Variantes du syndrome de Lynch

Le syndrome de Muir-Torre est considéré comme une variante rare du syndrome de Lynch (Lynch et al, 1981) caracterisée par l'association de lésions sébacées (adénomes sébacés, sébacéomes et carcinomes sébacés) avec des cancers, le plus souvent des CCR (Muir et al, 1967; Torre, 1968). Les mutations des gènes *MSH2* et *MSH6* sont les plus fréquentes (90% des patients atteints du syndrome de Muir-Torre) et 10% des patients sont porteurs d'une mutation germinale de *MLH1* (Mercader, 2010). Une autre variante du LS est le syndrome de Turcot, caractérisé par une association de tumeurs cérébrales et de CCR dans une même famille (Turcot et al, 1959). Ce syndrome est dû à des mutations constitutionnelles soit du gène *APC (adenomatous polyposis coli)*, soit des gènes MMR et il sera détaillé plus loin (cf. Partie III. B. 2. b.).

Critères d'Amsterdam II préconisant l'orientation vers une consultation d'oncogénétique
au moins trois cas de cancers colorectaux ou de cancers du spectre du syndrome de Lynch
chez des apparentés au premier degré
sur au moins deux générations successives
dont au moins un cas diagnostiqué avant 50 ans
une polypose adénomateuse familiale ayant été exclue

Tableau 2. Critères d'Amsterdam II préconisant l'orientation vers une consultation d'oncogénétique dans le cadre du syndrome de Lynch (d'après Umar et al, 2004).

Critères de Bethesda révisés préconisant la mise en œuvre préalable d'un pré-criblage somatique
cancer colorectal diagnostiqué avant 50 ans
cancer colorectal diagnostiqué entre 50 ans et 60 ans, avec histologie évocatrice
cancers multiples (synchrones ou métachrones) du spectre du syndrome de Lynch chez un même patient, quel que soit son âge
cancer colorectal chez un patient avec antécédents familiaux de cancers du spectre du syndrome de Lynch chez au moins 1 apparenté au premier degré diagnostiqué avant 50ans ou chez au moins 2 apparentés, au premier ou second degré, quels que soient les âges

Tableau 3. Critères de Bethesda révisés préconisant la mise en œuvre préalable d'un pré-criblage somatique dans le cadre du syndrome de Lynch (d'après Umar et al, 2004).

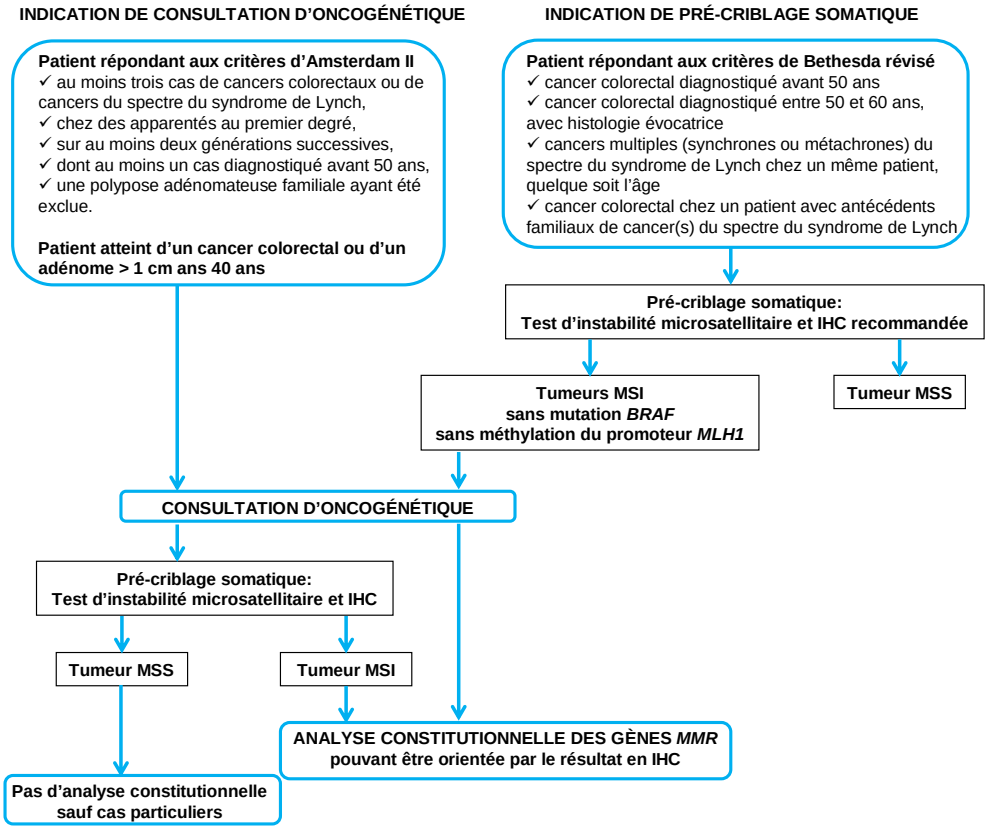


Figure 9. Dispositif national d'oncogénétique. Indications de consultation d'oncogénétique dédiée au syndrome de Lynch et d'analyse constitutionnelle des gènes MMR faisant appel à des critères cliniques et biologiques (d'après la synthèse d'activité d'oncogénétique de l'INCa institut national du cancer en 2011).

3. Analyse constitutionnelle des gènes MMR pour le diagnostic du LS

Le diagnostic de syndrome de Lynch est définitivement posé lorsqu'une mutation délétère germinale d'un des gènes MMR est identifiée chez le patient. Cette recherche peut être longue et coûteuse d'où la nécessité d'un criblage en amont des patients présentant une tumeur de phénotype MSI. La détermination du statut MSI des tumeurs peut être réalisée soit en utilisant des marqueurs microsatellites pour évaluer le taux d'instabilité dans ces séquences génomiques par allélotypage, soit en étudiant l'expression des protéines du système MMR par IHC. En France, une quinzaine de laboratoires sont habilités à réaliser l'analyse constitutionnelle des gènes *MLH1*, *MSH2* et *MSH6* et seulement trois pour le gène *PMS2*. Les laboratoires adaptent leur stratégie d'analyse en fonction du résultat du pré-criblage somatique pour les patients dont la tumeur est de type MSI (**Figure 9**). L'analyse constitutionnelle comprend une recherche de mutations ponctuelles et de réarrangements de grande taille, orientée par les résultats de l'IHC ou d'emblée sur les quatre gènes MMR selon les techniques utilisées.

Une proportion significative des altérations identifiées (20 à 30%) est considérée comme étant des variants de signification inconnue (VSI) (**Figure 10**) (Sijmons et al, 2013). Les VSI peuvent être des mutations faux-sens, des mutations introniques, des délétions ou insertions en phase. L'ensemble de ces VSI ont pour point commun de ne pas générer de codon stop prématuré ce qui ne permet pas de déterminer la pathogénicité de la mutation. Ces VSI ne peuvent pas être utilisés dans la prise en charge des patients et sont source d'anxiété dans les familles (O'Neill et al, 2009). D'après la base de données de mutations MMR constitutionnelles InSiGHT (*international society for gastrointestinal hereditary tumors*) (Plazzer et al, 2013) qui existe depuis 1994 et regroupe les mutations délétères, les VSI et les polymorphismes, près de 2 950 VSI ont été rapportés jusqu'à présent (1 181 pour *MLH1*, 1 002 pour *MSH2*, 533 pour *MSH6* et 234 pour *PMS2*). Afin d'aider à déterminer la pathogenicité des VSI (Chao et al, 2008; Doss & Sethumadhavan, 2009; Pastrello et al, 2011; Thompson et al, 2013; Wielders et al, 2014), il est possible de tenir compte du degré de conservation de l'acide aminé muté, de la différence physicochimique entre l'acide aminé d'origine et l'acide aminé résultant de la mutation, de la position de cet acide aminé dans les domaines protéiques importants pour la fonction de la protéine. Ces données sont regroupées et hiérarchisées dans des logiciels de prédiction *in silico*.

Il en existe plusieurs (Align Grantham Variation Grantham Deviation (Align-GVGD) (Tavtigian et al, 2008; Tavtigian et al, 2006); Multivariate analysis of protein polymorphisms (MAPP) (Stone & Sidow, 2005); PolyPhen-2.1 (Adzhubei et al, 2010); MutPred (Li et al, 2009); SIFT (Kumar et al, 2009; Ng & Henikoff, 2002); Mutation Assessor (Xvar) (Reva et al, 2011)), et il n'est pas rare que ces logiciels donnent des résultats contradictoires.

En plus des prédictions *in silico*, le clinicien s'intéresse à la co-ségrégation entre le VSI et la maladie au sein d'une même famille. Tous ces éléments sont des arguments indirects en faveur d'une pathogénicité d'un VSI mais seul un test fonctionnel montrant une baisse significative, voir une abolition totale d'activité de la protéine en question permettrait de valider le caractère pathogène d'un VSI. En France, il est recommandé de ne pas tenir compte des VSI pour le conseil génétique dans la famille en l'absence de validation fonctionnelle (Heinen & Juel Rasmussen, 2012).

4. Surveillance clinique des patients atteints du syndrome de Lynch

Les recommandations et la surveillance gastro-intestinale dans le syndrome de Lynch ont été basées sur des études prospectives impliquant de grandes séries de patients. Ces recommandations sont spécifiques de l'atteinte ou localisation tumorale. La surveillance par endoscopie colorectale réduit le risque de CCR, et diminue de 65% la mortalité (Jarvinen et al, 2009). En France, cette surveillance débute à l'âge de 20 ans et est renouvelée tous les 2 ans. La chirurgie prophylactique colorectale sur côlon sain n'est pas recommandée. Concernant les recommandations de dépistage du cancer gynécologique, elles impliquent des échographies endovaginales annuelles à partir de l'âge de 30 ans. De plus, il est préconisé que le gynécologue réalise un prélèvement endométrial. En cas de dysplasie avérée, l'hystérectomie doit être envisagée. Il est préconisé de surveiller les ovaires lors de l'échographie endovaginale. L'hystérectomie avec ovariectomie prophylactique peut être envisagée chez les femmes après accomplissement du projet parental. En ce qui concerne le risque de développer d'autres types de tumeurs chez les patients atteints du syndrome Lynch (voies urinaires et biliaires, intestin grêle), compte tenu des niveaux de risque et de l'absence de modalités consensuelles de surveillance, aucune prise en charge n'est actuellement recommandée par l'INCa.

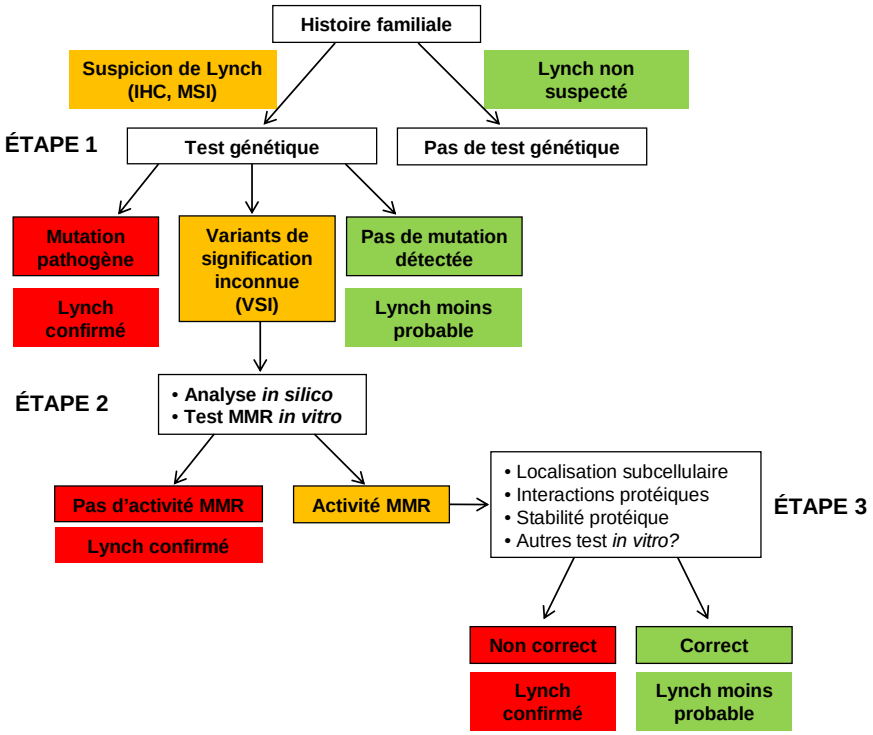


Figure 10. Arbre décisionnel d'analyse des variants des gènes MMR dans le cadre du syndrome de Lynch.VSI, variant de signification inconnue (d'après Couch et al, 2008).

B. Le syndrome de déficience constitutionnelle du système MMR

1. Définition du syndrome CMMRD

Le syndrome de déficience constitutionnelle du système MMR (*constitutional mismatch repair deficiency*, CMMRD) a porté bien des noms par le passé, notamment CCS pour *Childhood Cancer Syndrome* (Kruger et al, 2008), syndrome de Lynch III (Felton et al, 2007), ou encore CoLoN pour « Colon tumours or/and Leukaemia/Lymphoma or/and Neurofibromatosis » (Bandipalliam, 2005). De nos jours, il est appelé CMMRD, ce terme s'inscrivant dans la continuité de l'appellation donnée par Scott et al., de syndrome MMR-D (*mismatch repair-deficiency*) (Scott et al, 2007b), cette dénomination ayant l'avantage de se référer au défaut sous-jacent. Historiquement, la première description du syndrome CMMRD fut faite par le Dr. J. Turcot en 1959, lorsqu'il rapporta le cas de deux patients issus d'une même fratrie, avec de nombreux polypes adénomateux coliques, un cancer colorectal et des tumeurs cérébrales (Turcot et al, 1959). Depuis, plus d'une centaine de cas de cancers pédiatriques ou du jeune adulte ont été rapportés chez des patients porteurs de mutations germinales délétères bialléliques à l'état homozygote ou hétérozygote composite affectant un des gènes MMR.

1. a. Caractéristiques moléculaires et génétiques du syndrome CMMRD

Le syndrome CMMRD est une prédisposition majeure aux cancers pédiatriques qui concerne à ce jour 146 patients CMMRD issus de 91 familles différentes. Plus de la majorité de ces patients (60%) sont porteurs de mutations germinales bialléliques de *PMS2*, alors que 40% des patients sont répartis plus ou moins équitablement entre *MSH6* d'une part et *MLH1*/*MSH2* d'autre part (**Figure 11B**) (Wimmer et al, 2014). Cette répartition des gènes mutés contraste avec celle observée dans le syndrome de Lynch dans lequel la plupart des patients sont porteurs de mutation germinale monoallélique des gènes *MLH1* ou *MSH2*, et seule une minorité implique le gène *PMS2*. Cette différence de répartition des gènes mutés peut s'expliquer en partie par la pénétrance réduite des mutations hétérozygotes *PMS2*, qui entraîne une sous-estimation de la fréquence de patients atteints du syndrome de Lynch mutés sur le gène *PMS2*. En effet, les études sur des cohortes non-sélectionnées de patients avec un cancer colorectal montrent que la prévalence des mutations du gène *PMS2* dans le syndrome de Lynch est plus grande que

précédemment rapportée (Senter et al, 2008; Truninger et al, 2005). Par ailleurs, l'hypothèse selon laquelle les mutations bialléliques des gènes *MLH1* et *MSH2* sont possiblement létales à l'état embryonnaire a été avancée (Wimmer & Etzler, 2008) bien qu'il n'y ait pas plus de fausses couches rapportées dans les familles atteintes sur *MLH1* et *MSH2*.

1. b. Spectre clinique du syndrome CMMRD et corrélation génotype – phénotype

Chez la quasi-totalité des patients atteints du syndrome CMMRD (145/146), des cancers ou des lésions précancéreuses affectant le tractus digestif ont été rapportées, il s'agit donc d'une prédisposition très sévère. Les localisations tumorales sont très diverses et incluent principalement: (i) des hémopathies (lymphomes et leucémies) (48 hémopathies chez 45 patients parmi les 1456 soit 30,8% des patients CMMRD), (ii) des tumeurs cérébrales ou du système nerveux central (81 tumeurs chez 78 patients parmi les 146 soit 53,4% des patients CMMRD), (iii) des tumeurs digestives ainsi que toutes les tumeurs typiquement associées au syndrome de Lynch (88 tumeurs chez 59 patients parmi les 146 soit 40,4% des patients CMMRD) (Bougeard et al, 2014; Wimmer et al, 2014). Des sarcomes ont également été décrits. Ces tumeurs, dont le pronostic est réservé, surviennent dès l'enfance, à l'âge moyen de 6 ans (4-17) pour les hémopathies, 9 ans (2-40) pour les tumeurs cérébrales et 16,4 ans (8-28) pour les tumeurs typiquement associées au syndrome de Lynch (Vasen et al, 2014; Wimmer et al, 2014).

De manière intéressante, à l'instar de ce qui est observé dans le LS, on observe une corrélation entre le gène MMR impliqué et le spectre tumoral des patients atteints du syndrome CMMRD (**Figure 11C**). En effet, les tumeurs cérébrales sont significativement plus fréquentes chez les porteurs de mutations bialléliques du gène *PMS2* que chez les patients mutés sur les gènes *MLH1*/*MSH2* (P=0,01; test de Khi2). Les hémopathies sont significativement plus fréquentes chez les porteurs de mutations bialléliques *MLH1*/*MSH2* que chez les patients mutés sur *PMS2* (P=0,04; test de Khi2). Cependant, il n'y a pas de différence de fréquence de survenue dans les tumeurs associées au LS en fonction du gène impliqué.

1. c. Manifestations non tumorales dans le syndrome CMMRD

Alors que la présence d'une seule tâche café-au-lait (TCL ou CALM pour café-au-lait macule) est une manifestation courante qui touche un tiers des enfants sains (Landau & Krafchik, 1999),

l'observation de multiples CALM (N>5) est un événement rare. De nombreux patients atteints du syndrome CMMRD présentent ces signes cutanés qui sont également retrouvés dans la neurofibromatose de type 1 (NF1) (Jasperson et al, 2010; Ostergaard et al, 2005). Ces CALM constituent donc un élément de confusion avec le syndrome NF1, mais aussi avec le syndrome de Legius (cf. Partie III. B. 2. b.). Néanmoins, les CALM survenant dans le syndrome CMMRD ne semblent pas totalement comparables à celles rapportées dans la NF1 ou le syndrome de Legius, car elles présentent des variations de pigmentation et des bords irréguliers (De Vos et al, 2006; Kruger et al, 2008; Scott et al, 2007a; Scott et al, 2007b). De plus, elles peuvent également être associées à des tâches hypochromes (Etzler et al, 2008; Scott et al, 2007a; Scott et al, 2007b) qui ne sont pas observées dans la NF1, ni dans le syndrome de Legius, il est donc capital de les rechercher. Il existe plusieurs hypothèses concernant le lien entre les manifestations cutanées du syndrome CMMRD et des altérations somatiques du gène *NF1*, car ce gène de grande taille contient de nombreuses séquences microsatellites. Il se pourrait que le gène *NF1* soit un gène cible de l'instabilité due à la déficience du système MMR. Une étude a rapporté deux mutations MMR en plus d'une mutation constitutionnelle du gène NF1 chez trois patients (Alotaibi et al, 2008; Gallinger et al, 2004; Raevaara et al, 2004; Ricciardone et al, 1999).

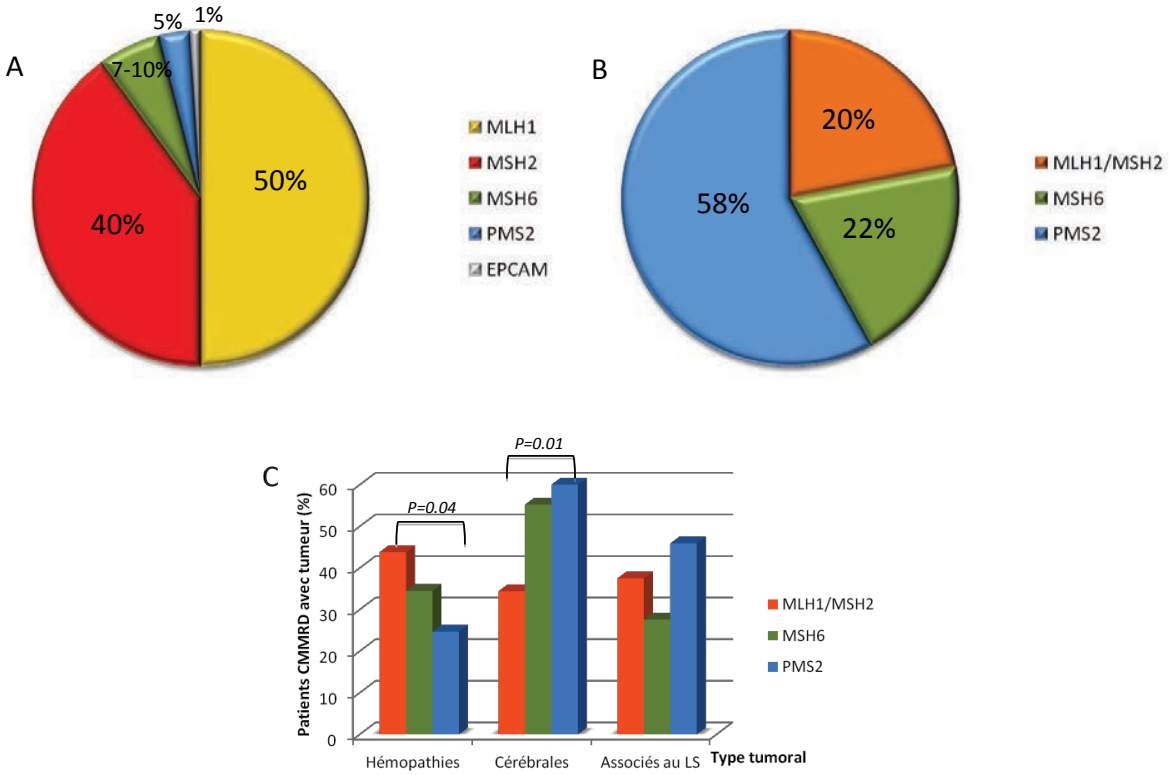


Figure 11. Mutations germinales des gènes MMR dans les syndromes héréditaires de prédisposition aux cancers MSI. (A) Fréquence de mutations dans le syndrome de Lynch (d'après (Berends et al, 2002; Goel et al, 2011; Kuiper et al, 2009; Miyaki et al, 1997; Niessen et al, 2009; Peltomaki, 2003; Senter et al, 2008). **(B)** Fréquence de mutations dans le syndrome CMMRD (d'après (Wimmer et al, 2014). **(C)** Prévalence des 3 principaux types tumoraux dans le syndrome CMMRD en fonction du gène MMR impliqué (d'après Wimmer et al, 2014).

2. Identification des patients atteints du syndrome CMMRD

2. a. Critères cliniques d'identification des patients à risque pour le syndrome CMMRD

Dans le cadre du consortium Européen C4CMMRD, des critères cliniques préconisant la recherche d'un syndrome CMMRD chez un patient d'âge pédiatrique ou chez un jeune adulte atteint de cancer ont été proposés sous la forme d'un système de notation (**Tableau 4**). Les patients présentant un score ≥ 3 points sont suspectés d'être atteints du syndrome en question. Il a été attribué un score de 3 points aux tumeurs hautement spécifiques du syndrome CMMRD, 2 points aux tumeurs très représentées, et 1 point aux tumeurs occasionnelles. Pour les manifestations non tumorales, il a été attribué un score de 1 ou 2 points en fonction de leur spécificité vis-à-vis du syndrome CMMRD et de leur fréquence dans la population générale (CALM, malformations cérébrales et pilomatricomes). Les autres critères également pris en compte sont la survenue d'un second cancer à un âge pédiatrique, d'une tumeur associée au spectre du syndrome de Lynch chez un apparenté, et la consanguinité parentale.

Cependant, il faut noter qu'il existe un biais de sélection dans la cohorte de patients atteints du syndrome CMMRD ayant servi à l'établissement de ces critères de sélection, car les patients ont été identifiés parce qu'ils avaient de multiples tumeurs malignes et/ou des frères et sœurs atteints de tumeurs malignes. Par conséquent, une étude prospective est nécessaire afin d'évaluer la spécificité ainsi que la sensibilité de ces critères (Wimmer et al, 2014).

Cancer: un cancer est nécessaire, s'il y a plus d'un cancer présent chez le patient, additionner les points	
Cancer associé au spectre du LS* survenant avant l'âge de 25 ans	3 points
Multiple adénomes intestinaux avant l'âge de 25 ans et absence de mutation APC / MUTYH ou un seul adénome dysplasique de haut grade avant l'âge de 25 ans	3 points
Gliome (OMS grade III ou IV) avant l'âge de 25 ans	2 points
LNH de type T ou sPNET avant l'âge de 18 ans	2 points
N'importe quel cancer avant l'âge de 18 ans	1 point
Autres caractéristiques: en option; si plus d'une des conditions suivantes est présente, additionner les points	
Signe clinique de NF1 et/ou ≥ 2 tâches cutanées hyperpigmentées et/ou hypopigmentées de diamètre > 1cm chez le patient	2 points
Diagnostic de LS chez un apparenté au premier ou second degré	2 points
Cancer associé au spectre du LS* survenant avant l'âge de 60 ans chez un apparenté du premier, deuxième ou troisième degré	1 point
Frère ou soeur avec cancer associé au spectre du LS*, gliome de haut grade, sPNET ou LNH	2 points
Frère ou soeur avec n'importe quel type de cancer dans l'enfance	1 point
Multiples pilomatricomes chez le patient	2 points
Un pilomatricome chez le patient	1 point
Agénésie du corps calleux ou cavernome non-induit par un traitement chez le patient	1 point
Parents consanguins	1 point
Déficience / taux réduit en IgG2/4 et/ou IgA	1 point

Tableau 4. Critères cliniques préconisant la recherche d'un syndrome CMMRD chez les patients atteints de cancer. Si le score est ≥ 3 points, la recherche d'un syndrome CMMRD est préconisée. *Cancers colorectaux, de l'endomètre, de l'intestin grêle, de l'uretère, bassinet du rein, du tractus biliaire, gastriques, de la vessie. LS, syndrome de Lynch; LNH, lymphome non-Hodgkinien; sPNET, tumeur primitive neuro-ectodermique supra tentorielle (d'après Wimmer et al, 2014).

2. b. Diagnostics différentiels du syndrome CMMRD

Comme nous l'avons vu précédemment, le spectre clinique du syndrome CMMRD est très large et il existe un recouvrement avec les spectres cliniques d'autres pathologies, ce qui participe aux difficultés de détection des patients à risque pour ce syndrome. La neurofibromatose de type 1 (NF1) lié au gène *NF1*, dont l'incidence est d'une naissance sur 3000 (Huson et al, 1989) fait partie des phénocopies du syndrome CMMRD. Les stigmates de la NF1 sont de multiples CALM, des nodules de Lisch, des lentigines et parfois des neurofibromes. La NF1 est une pathologie autosomique dominante avec 50% de cas sporadiques dus à des mutations survenant *de novo*. Deux critères parmi les 7 suivants sont nécessaires pour poser le diagnostic de NF1 et ils ne sont habituellement pas réunis chez les patients CMMRD: 6 CALM ou plus, des lentigines axillaires ou inguinales, 2 neurofibromes ou 1 neurofibrome plexiforme, 2 nodules de Lisch, une lésion squelettique spécifique, un gliome des voies optiques ou un apparenté au premier degré atteint (Boyd et al, 2009).

Parmi les syndromes pouvant évoquer le CMMRD, il y a notamment le syndrome de Legius, lié aux mutations constitutionnelles à l'état hétérozygote du gène *SPRED1* (*sprouty-related, EVH1 domain containing 1*) (Brems & Legius, 2013). Dans ce très rare syndrome connu aussi sous le nom de NF1-like, les patients présentent des troubles de la pigmentation de la peau caractérisés par de multiples CALM avec ou sans lentigos au niveau des aisselles ou de la région inguinale. Etant donné que dans le syndrome de Legius, on observe uniquement des CALM sans autre signe de NF1, cela le rend plus difficile à différencier du syndrome CMMRD que la NF1.

Le syndrome de Li Fraumeni, lié aux mutations constitutionnelles du gène *TP53* (*tumor protein 53*), peut également faire penser à un syndrome CMMRD, puisqu'il consiste en une association de tumeurs cérébrales et d'hémopathies survenant à un âge pédiatrique. Par contre, le mode de transmission diffère de celui du CMMRD, puisque le syndrome de Li Fraumeni se transmet de façon autosomique dominante. Cependant, la pénétrance incomplète de ce syndrome, en plus des mutations *de novo* sans antécédents familiaux miment le mode de transmission du syndrome CMMRD. L'absence de CALM dans le syndrome de Li Fraumeni est un élément discriminant. Distinguer ces deux syndromes de prédisposition aux tumeurs est essentiel car de ce diagnostic découle le conseil génétique dans la famille et la prise en charge du patient en

termes de décisions de traitement et de surveillance clinique. Il n'y a classiquement pas d'atteinte digestive dans le syndrome de Li Fraumeni, il n'est donc pas nécessaire de mettre en place une surveillance endoscopique, alors qu'elle recommandée dans le cadre du syndrome CMMRD.

La polypose adénomateuse familiale (PAF) liée aux gènes *APC*, est une pathologie de transmission autosomique dominante avec une pénétrance de 100%. Elle est caractérisée par le développement de centaines voire de milliers de polypes dans la paroi interne du côlon et du rectum dès l'adolescence. Ils apparaissent vers l'âge de 10-12 ans, la survenue de ces polypes ne constitue donc pas un élément discriminant avec le syndrome CMMRD. Individuellement, ces polypes ne sont pas plus susceptibles de devenir cancéreux que les polypes observés chez une personne non atteinte de polypose adénomateuse familiale. Cependant, en raison de leur nombre élevé, le risque que l'un d'entre eux devienne cancéreux augmente vers l'âge de 35-40ans.

Enfin, il faut évoquer le syndrome de Turcot qui est une entité clinique hétérogène associant des tumeurs cérébrales et des CCR dans une même famille (Turcot et al, 1959). Ce syndrome est lié à des mutations constitutionnelles du gène *APC*, ou bien des gènes MMR. Le type de tumeur cérébrale dépend du gène en cause. Les mutations d'APC sont généralement associées à des médulloblastomes alors que les mutations des gènes MMR sont associées à des glioblastomes (Hamilton et al, 1995; Turcot et al, 1959). Les patients porteurs de mutations du gène *APC* ont habituellement de nombreux polypes adénomateux alors que les patients porteurs de mutations d'un gène MMR en ont en moins grand nombre. En présence d'un diagnostic de syndrome de Turcot lié aux gènes MMR, le diagnostic de CMMRD doit donc être systématiquement évoqué (Felton et al, 2007) et la recherche de mutations biallélіques sur les 4 gènes MMR doit être envisagée car la prise en charge du patient et de sa famille sera alors différente de celle proposée en cas de mutation monoallélique d'un des gènes MMR.

3. Techniques diagnostiques du syndrome CMMRD

3. a. Analyse constitutionnelle des gènes MMR

Comme dans le syndrome de Lynch, la technique de référence pour le diagnostic du syndrome CMMRD est l'analyse constitutionnelle des gènes MMR qui comprend une recherche de mutations délétères germinales et de réarrangements de grande taille. Cependant, il faut noter que l'analyse du gène *PMS2* principalement impliqué dans le syndrome CMMRD (60%), est particulièrement compliquée et elle n'est pratiquée que par trois laboratoires en France. Pour cette raison, elle est limitée aux tumeurs MSI qui présentent une perte exclusive de PMS2 en IHC. Les altérations génomiques de *PMS2* sont difficiles à identifier car ce gène partage de nombreuses séquences avec 15 pseudogènes inactifs (De Vos et al, 2004; Nakagawa et al, 2004; Vaughn et al, 2010). L'un de ces pseudogènes *PMS2CL* se trouve très proche (0,7Mb) du gène *PMS2* fonctionnel, et en raison des nombreux échanges de séquences, les régions 3' du gène et du pseudogène ne peuvent pas être distinguées de manière fiable (Ganster et al, 2010; Wernstedt et al, 2012). Par ailleurs, les réarrangements de grande taille ne sont pas rares, une étude montrant jusqu'à 15% de réarrangements de grande taille (Charbonnier et al, 2000; Kohonen-Corish et al, 1996; van der Klift et al, 2005). Pour les détecter, deux techniques de quantification génique basées sur l'amplification d'oligonucléotides peuvent être utilisées, la technique MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) ou la technique QMPSF (*quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragment*). Enfin, certains laboratoires d'oncogénétique sont habilités à effectuer des études complémentaires à visée diagnostique telles que l'analyse des transcrits *MMR*, l'étude de l'épissage par la technique de minigène, ou la mise en oeuvre de modélisation des variants susceptibles d'avoir un retentissement délétère sur l'épissage ou sur la protéine.

3. b. Immunohistochimie sur tissu sain

En 2014, une étude a proposé l'utilisation de l'IHC sur tissu sain comme une méthode complémentaire d'aide au diagnostic du syndrome CMMRD (Bakry et al, 2014). En raison de la déficience constitutionnelle MMR, les patients CMMRD doivent présenter une absence d'expression des protéines MMR (ou marquage IHC négatif), dans tous les tissus. En effet, la

perte d'expression d'une des 4 protéines MMR dans les tissus non transformés signale un défaut constitutionnel MMR. Nous avons déjà cité les nombreux atouts de l'IHC (facilité de mise en œuvre, rapidité, moindre coût). Par ailleurs, l'IHC est susceptible d'orienter l'analyse génétique constitutionnelle vers le gène MMR muté. Cependant, une telle méthode présente un risque de faux-négatif (exclure à tort le diagnostic de syndrome CMMRD) non négligeable, notamment en cas de mutations faux-sens, quand la protéine détectée est non fonctionnelle. Ce dernier cas de figure a d'ailleurs été rapporté dans notre étude (cf. Article 2). À cette limitation, se surajoutent les difficultés d'interprétation de l'IHC dues à l'absence de contrôle positif interne, surtout dans les tumeurs colorées négativement. Par ailleurs, il faut disposer de tissu sain issu du patient, il peut s'agir de la muqueuse adjacente à la tumeur, de cellules saines intratumorales, ou encore d'une biopsie cutanée. Dans les deux premières situations, l'IHC sur tissu sain n'est envisageable que de manière rétrospective pour les patients ayant déjà développé une tumeur, et ne peut pas être appliqué aux apparentés de manière prospective. Dans le cas d'une biopsie cutanée, l'étude prospective est envisageable, cependant il s'agit d'un geste invasif notamment pour de jeunes enfants. Par ailleurs, d'autres études relatent que l'IHC a une faible sensibilité dans l'identification des mutations du gène *MSH6* (Okkels et al, 2012) et de certaines mutations du gène *PMS2* (Grindedal et al, 2014), or il s'agit des deux gènes principalement impliqués dans le syndrome CMMRD.

3. c. Phénotype d'instabilité des microsatellites dans le tissu sain

Selon certains auteurs, il existerait chez les patients atteints du syndrome de Lynch, des évènements mutationnels préalables à la progression tumorale, avant même l'inactivation somatique entraînant la déficience du système MMR, et donc observables dans les tissus non transformés c'est-à-dire avant l'apparition de tumeurs (Calabrese et al, 2004). Une instabilité des microsatellites est retrouvée de façon inconstante dans les adénomes des patients atteints du LS mais il s'agit déjà de lésions pré-néoplasiques (Pino et al, 2009). Dans les tissus sains, un certain degré d'instabilité a été rapporté. En effet, dès 1995, Parsons et al. décrivent une instabilité constitutionnelle chez trois patients initialement décrits comme étant atteints du LS mais qui étaient en fait atteints du syndrome CMMRD, en utilisant une technique de *small pool* PCR (SP-PCR) (Parsons et al, 1995). Cette technique consiste à réaliser des réactions de PCR sur des

dilutions d'ADN germinal afin d'arriver à 1 à 3 génomes amplifiés par PCR (Monckton & Jeffreys, 1991). Le phénotype MSI étant lié au nombre de divisions cellulaires et les lymphocytes étant un tissu peu prolifératif, il est probable que la technique SP-PCR permet de détecter une déficience du système MMR qui doit représenter un événement très rare indétectable à l'échelle de l'ensemble de la population lymphocytaire. Des niveaux d'instabilité ont également été détectés dans l'ADN constitutif de patients atteints du LS, suggérant des applications à la fois mécanistiques et cliniques de la procédure (Coolbaugh-Murphy et al, 2004). La technique SP-PCR est une méthode sensible pour la détection d 'un phénotype MSI dans les cellules somatiques. Cependant, elle est laborieuse et d'interprétation difficile. De l'avis même des auteurs, la lourdeur des techniques utilisées et le caractère inconstant de l'instabilité ne permettent pas d'en faire une méthode diagnostique (Coolbaugh-Murphy et al, 2010).

Chez les patients atteints du syndrome CMMRD, l'inactivation du système MMR étant constitutionnelle, on s'attend à observer une instabilité des microsatellites non seulement dans le tissu tumoral mais également dans les tissus sains. La recherche d'un phénotype MSI dans le tissu sain n'a été décrite que pour 13 patients, sur des lymphocytes, de la salive ou d'autres tissus normaux et elle s'est avérée être négative avec les techniques de PCR de routine (Auclair et al, 2007; De Rosa et al, 2000; Etzler et al, 2008; Gallinger et al, 2004; Hegde et al, 2005; Toledano et al, 2009; Vilkki et al, 2001; Wang et al, 1999a; Whiteside et al, 2002; Will et al, 2007). Un faible degré d'instabilité a été observé chez 8 patients sur 9 en utilisant la technique de SP-PCR (Gallinger et al, 2004; Hegde et al, 2005; Vilkki et al, 2001; Wang et al, 1999a). Comme expliqué précédemment, cette technique de dilution ne peut pas être utilisée en routine. De la même façon que dans le syndrome de Lynch, il n'est donc pas possible de faire le diagnostic de CMMRD de façon fiable sur tissu sain par la détermination du phénotype MSI en utilisant la technique de SP-PCR.

Récemment, une étude portant sur la recherche d'un phénotype MSI dans le tissu sain montre des résultats très intéressants pour la détection des patients atteints du syndrome CMMRD. En utilisant trois marqueurs dinucléotidiques, Ingham et al. déterminent un ratio nommé gMSI (*germline* MSI) par une analyse morphométrique des profils microsatellites (Ingham et al, 2013). Seuls les patients atteints du syndrome CMMRD ont montré au moins deux des trois

marqueurs positifs, c'est-à-dire supérieurs à un seuil défini. Cette technique présente de nombreux avantages ; elle est facile à mettre en oeuvre, rapide, et peu onéreuse. Les résultats ne sont établis que sur 4 familles différentes (soit 10 patients) avec mutations du gène *PMS2* (n=2), *MSH2* (n=1) ou *MSH6* (n=1). La principale limitation de cette technique est qu'elle ne permet pas de détecter les patients mutés sur le gène *MSH6*, qui est le deuxième gène le plus impliqué dans le syndrome CMMRD. De la même manière, les tumeurs MSI dues à une altération du gène *MSH6* sont indétectables avec les marqueurs dinucléotidiques (Goel et al, 2010) alors que l'utilisation de marqueurs mononucléotidiques permet de détecter les CRC déficients pour *MSH6.* Cette observation s'explique par le rôle du complexe MSH2-MSH6, qui intervient préférentiellement dans la reconnaissance des mésappariements base-base et les boucles d'insertions/délétions de une ou deux bases et n'intervient pas dans la réparation des boucles d'insertions/délétions de plus d'une paire de bases (Modrich, 2006). Par conséquent, la déficience du complexe MutSα consécutive à une perte de fonction de MSH6, favorise une instabilité dans les séquences microsatellites mononucléotidiques (Verma et al, 1999). Une autre limite de cette étude est la proportion non négligeable (10%) de cas non contributifs (situation où les 3 marqueurs sont hétérozygotes car ils présentent des allèles distants de moins de 6 paires de bases ou 2 marqueurs seulement sont interprétables mais donnent des résultats contradictoires (l'un positif et l'autre négatif)).

4. Propositions de prise en charge des patients atteints du syndrome CMMRD

4. a. Surveillance clinique des patients atteints du syndrome CMMRD

Des stratégies de surveillance clinique pour la détection précoce de diverses tumeurs ont été mises en œuvre avec succès pour d'autres syndromes de prédisposition au cancer. Un diagnostic précoce du syndrome CMMRD pourrait augmenter la probabilité de détecter des tumeurs colorectales ou cérébrales à un stade opérable, et par conséquent cela permettrait d'améliorer grandement le pronostic vital des patients. Les travaux de Durno ont montré qu'un suivi comprenant une imagerie à résonance magnétique (IRM) sur corps entier avec endoscopie des voies haute et basse tous les ans (ainsi qu'une numération hématologique tous les 6 mois), qui a été réalisé pendant 10 ans sur deux sœurs porteuses d'une mutation homozygote du gène *MLH1*, a permis de détecter 15 tumeurs à un stade asymptomatique dont un astrocytome qui a

pu être complètement réséqué (Durno et al, 2012). Dans une autre étude, sur une période de 26 ans, la surveillance clinique (par IRM et endoscopie à intervalles réguliers) a permis de réséquer 6 adénocarcinomes chez un patient CMMRD porteur d'une mutation germinale du gène *PMS2*. (Sjursen et al, 2009). Compte tenu de ces 2 études et des connaissances actuellement disponibles sur le syndrome CMMRD, une surveillance prophylactique a été proposée qui doit inclure des examens à intervalles réguliers, tels que (i) examen clinique, (ii) IRM cérébrale voire corps entier, (iii) endoscopies des voies haute et basse (Vasen et al, 2014). Le rythme et l'âge de début de cette surveillance restent à déterminer. L'IRM est une méthode de criblage de tumeurs plus judicieuse que le scanner (ou tomodensitométrie) car cette dernière peut induire des tumeurs consécutives à l'exposition répétée aux radiations. Cependant l'IRM et l'endoscopie requièrent une anesthésie, or chez les enfants, il existe de potentielles complications liées à la sédation. Enfin, un tel protocole de surveillance peut s'avérer stressant et anxiogène, c'est pourquoi un suivi psychologique devrait être proposé aux patients et aux familles.

4. b. Stratégie thérapeutique adaptée aux patients atteints du syndrome CMMRD

Les cellules déficientes pour le système MMR sont résistantes à certains agents génotoxiques tels que les thiopurines et agents méthylants, qui sont utilisés comme traitement de chimiothérapie pour certains cancers du spectre CMMRD. Le témodal qui contient du témozolomide (un agent alkylant de type SN1) fait partie du traitement de référence des glioblastomes qui sont des tumeurs fréquentes dans le syndrome CMMRD (Yoshimoto et al, 2012). Or les lignées cellulaires MMR-déficientes sont résistantes à ce type d'agents (Fedier & Fink, 2004). Une résistance a été également décrite *in vivo* pour les tumeurs cérébrales des patients CMMRD associée à un phénomène de mutagenèse et de progression tumorale accélérée (la déficience MMR permet la réplication de l'ADN sans réparation des lésions et donc un taux de mutations augmenté) (Hunter et al, 2006). Cela a été décrit chez deux patients CMMRD qui ont présenté une progression rapide du glioblastome sous traitement par témozolomide, avec une survie très diminuée, de l'ordre de 4 mois alors qu'elle est de 12 à 24 mois habituellement pour ce type de tumeurs (Ilencikova et al, 2011). La question du choix de stratégies thérapeutiques adaptées aux patients atteints du syndrome CMMRD, que se soit le

témozolomide ou d'autres molécules telles que le cisplatine ou le busulfan, ou leur éventuelle contre-indication est actuellement controversée et nécessite des études complémentaires.

Partie IV. Modèles d'étude de la déficience du système MMR

La déficience du système MMR conduit à une instabilité nucléotidique de l'ADN affectant les microsatellites. Chez l'homme les cancers de phénotype MSI sont fréquents et l'étude du processus carcinogène peut se faire à travers divers modèles. Dans la quatrième et dernière partie de cette revue bibliographique consacrée aux modèles d'étude de la déficience du système MMR, nous passerons en revue les différents modèles murins, avant d'aborder les modèles cellulaires.

A. Les modèles murins de déficience du système MMR

Le développement de lignées murines, porteuses de mutations ciblées inactivant les gènes du système MMR, a permis de déterminer la manière dont la perte de fonction de l'un des gènes MMR contribue à l'initiation tumorale de type MSI (Edelmann & Edelmann, 2004; Hegan et al, 2006; Heyer et al, 1999; Klausner, 1999; Taketo & Edelmann, 2009).

1. Souris invalidées pour le gène *Msh2*

En raison du rôle central de la protéine Msh2 dans les complexes MutSα et MutSβ, le phénotype des lignées murines déficientes pour le gène *Msh2* est beaucoup plus sévère que celui des lignées murines déficientes pour les gènes *Msh3* ou *Msh6* (Reitmair et al, 1995). Le modèle de souris invalidées pour *Msh2* sera particulièrement détaillé du fait de son utilisation au cours de mes travaux de recherche (cf. Article 1).

Deux méthodes d'invalidation du gène *Msh2* peuvent être utilisées, la recombinaison homologue qui entraîne une perte d'expression grâce à l'insertion une cassette de résistance à un antibiotique (hygromycine ou néomycine) dans la séquence codante, ou la mutagenèse dirigée, qui se traduit au niveau protéique par la substitution d'un acide aminé par un autre et donc aboutit à la production d'une protéine Msh2 aberrante. Quatre types de constructions de souris inactivées sur les deux allèles du gène *Msh2* (*knockout* noté *Msh2*$^{-/-}$ ou *Msh2*^{ko}) ont été réalisés (de Wind et al, 1995; Lin et al, 2004; Reitmair et al, 1995; Smits et al, 2000).

Le modèle de souris *Msh2*^{ko} de De Wind sera particulièrement détaillé du fait de son utilisation au cours de ma thèse (cf. Article 1). Dans ce modèle, le gène de résistance à l'hygromycine (marqueur Hyg) a été inséré par recombinaison homologue dans l'exon 12 du gène *Msh2*. Pour éviter que les éléments contrôlant la transcription du gène *Msh2* n'interfèrent avec la transcription du gène de résistance à l'hygromycine, la cassette de sélection comprenant le marqueur Hyg a été placée en orientation inverse par rapport au sens de transcription du gène d'intérêt. Cette méthode d'invalidation de gène permet d'obtenir des souris hétérozygotes *Msh2*$^{+/-}$, et par croisement de ces dernières, des souris homozygotes *Msh2*^{ko} ont été générées. Les souris *Msh2*^{ko} ne présentent pas de défaut de développement embryonnaire, sont viables et les femelles comme les mâles sont fertiles.

Quel que soit le mode d'inactivation du gène *Msh2*, les souris *Msh2*^{ko} ont une survie significativement diminuée en comparaison des souris de génotype sauvage (*wild-type* noté *Msh2*$^{+/+}$ ou *Msh2*^{wt}) et hétérozygote (*Msh2*$^{+/-}$). Cinquante pourcent des souris *Msh2*^{ko} meurent avant l'âge de 6 mois (**Tableau 5**) et le reste des animaux meurent avant l'âge de 12 mois (Reitmair et al, 1996). La diminution de la durée de vie des souris *Msh2*^{ko} est associée à un fort phénotype de prédisposition aux lymphomes se traduisant par une organomégalie, c'est-à-dire une augmentation de la taille des organes lymphoïdes sur le fonds génétique FVB/NJ (FVB) (Reitmair et al, 1996). Les souris *Msh2*^{ko} qui survivent au-delà de l'âge de 6 mois peuvent également développer des adénomes et adénocarcinomes de l'intestin grêle sur le fonds génétique C57BL/6J (B6). Les souris *Msh2*$^{+/-}$ ont une survie comparable à celle des souris de génotype sauvage (*Msh2*^{wt}) et elles ne développent que très rarement des tumeurs. Les cellules *Msh2*^{ko} sont incapables de réparer les mésappariements d'une seule base ou les boucles insertions/délétions de un à quatre nucléotides, par conséquent, les tissus sains et tumoraux des souris *Msh2*^{ko} montrent des fréquences de mutation élevées, ainsi qu'un phénotype MSI (Lin et al, 2004; Reitmair et al, 1996).

Comme chez l'homme, deux méthodes permettent de déterminer le statut MSI des tumeurs murines, l'allélotypage et l'IHC. L'allélotypage nécessite d'autres marqueurs microsatellitaires que ceux utilisés chez l'homme car ils ne sont pas conservés chez la souris. Nous avons donc

utilisé les trois marqueurs mononucléotidiques A22, A24 et T40 précédemment rapportés (Chalastanis et al, 2010). Les marqueurs utilisés pour déterminer le statut MSI des tumeurs murines ne sont pas quasi-monomorphes, contrairement à ceux utilisés chez l'homme, d'où la nécessité d'une comparaison avec l'ADN germinal de la souris. La deuxième méthode est l'IHC qui permet de déterminer une perte d'expression chez la souris à l'aide des anticorps dirigés contre les protéines humaines du système MMR (conservation des épitopes entre l'homme et la souris).

Par ailleurs, un modèle de souris dans lequel le gène *Msh2* est invalidé spécifiquement dans les cellules de l'épithélium intestinal (ko conditionnel), a été construit (*Msh2*^{loxP} x *Villin-Cre*). Ces animaux présentent un phénotype comparable à celui des patients atteints du syndrome de Lynch et développent un à deux adénomes ou adénocarcinomes de phénotype MSI, au cours de leur première année de vie (Kucherlapati et al, 2010). Plus récemment, un nouveau modèle de souris invalidées pour le gène *Msh2* spécifiquement dans les cryptes intestinales (*Lgr5-CreERT2;Msh2*$^{flox/-}$) a été développé, ces souris développent plus d'adénomes et d'adénocarcinomes tous Msh2 déficients (Wojciechowicz et al, 2014). Ce qui en fait également un modèle plus pertinent du syndrome de Lynch que les souris hétérozygotes pour le gène *Msh2*.

2. Souris invalidées pour les homologues de MutS

2. a. Souris invalidées pour *Msh6* et *Msh3*

L'analyse des souris déficientes pour le gène *Msh6* a permis la première description de *Msh6* comme un gène de prédisposition au cancer (Edelmann et al, 1997). Les souris *Msh6*^{ko} ont une survie significativement diminuée comparée à celle des souris de génotype sauvage (*Msh6*^{wt}) et hétérozygote (*Msh6*$^{+/-}$). Cinquante pourcents des souris *Msh6*^{ko} meurent avant l'âge de 9 mois et le reste des animaux meurent avant l'âge de 16 mois (Edelmann et al, 1997). L'inactivation du gène *Msh6* chez la souris conduit à l'apparition de cancers avec un spectre de tumeurs semblable à celui des souris déficientes pour le gène *Msh2*, mais de survenue plus tardive (**Tableau 5**). Ces souris sont aussi sujettes aux tumeurs de l'endomètre (de Wind et al, 1998; Edelmann et al, 1997) comme chez l'homme où une forte prédisposition aux cancers de

l'endomètre dans les familles Lynch mutées sur le gène *MSH6* est bien connue (Wijnen et al, 1999). L'analyse moléculaire des cellules *Msh6*^{ko} révèle que la survie prolongée des souris *Msh6*^{ko} en comparaison aux souris *Msh2*^{ko}, est le résultat d'une activité résiduelle de réparation. En effet, la protéine Msh6 appartient au complexe MutS α (Msh2-Msh6) qui prend en charge les mésappariements de bases ainsi que les boucles d'insertions/délétions de un ou deux nucléotides, alors que la protéine Msh3 appartient au complexe MutS β (Msh2-Msh3) qui répare les boucles d'insertions/délétions allant jusqu'à une dizaine de nucléotides. Par conséquent, le phénotype de mutation dans les tissus des souris *Msh6*^{ko} est principalement dû à l'accumulation des substitutions de bases, plutôt que des mutations par décalage du cadre de lecture, qui se produisent fréquemment dans les cellules *Msh2*^{ko}.

L'inactivation du gène *Msh3* n'aboutit pas à une réduction de la survie, ni à un phénotype tumoral majeur, ainsi les souris *Msh3*^{ko} sont quasi asymptomatiques. Lorsqu'elles développent des tumeurs, ces dernières sont de survenue tardive (14 à 16 mois) avec une incidence tumorale similaire à celles des souris de génotype sauvage (**Tableau 5**). Cependant, certaines souris développent également des tumeurs gastro-intestinales fréquemment MSI, ce qui n'est jamais observé chez les souris de génotype sauvage (de Wind et al, 1995; Edelmann et al, 2000). Par conséquent, le phénotype tumoral modéré des souris *Msh3*^{ko} va dans le sens du manque d'implication de mutations du gène *MSH3* dans le syndrome de Lynch, et il est probablement causé par les défauts de réparation modérés conférés par la déficience pour MSH3. Chez l'homme, l'analyse biochimique des cellules *MSH3*^{ko} a montré que, bien que la réparation des boucles d'insertions/délétions de une à quatre bases était diminuée, les substitutions d'une base unique sont encore efficacement réparées en raison de la présence de complexe MSH2-MSH6 fonctionnel.

L'inactivation à la fois de *Msh6* et *Msh3* chez la souris (*Msh6*^{ko} x *Msh3*^{ko}) conduit à une perte complète de l'activité de réparation et un phénotype tumoral semblable à celui des souris déficientes pour le gène *Msh2* (Edelmann et al, 2000). Des études ont montré que chez l'homme, des mutations du gène *MSH3* ne sont pas impliquées dans le syndrome de Lynch en raison de

la redondance fonctionnelle entre les complexes MSH2-MSH6 et MSH2-MSH3 dans la réparation des erreurs de réplication.

2. b. Souris invalidées pour *Msh4* et *Msh5*

Les souris *Msh4*^{ko} et *Msh5*^{ko} ont une survie comparable à celle des souris de génotype sauvage, et à l'instar de ces dernières, elles ne développent pas de tumeurs (**Tableau 5**) (Edelmann et al, 1999a; Kneitz et al, 2000). Elles sont viables mais stériles, car les protéines *Msh4* et *Msh5* jouent un rôle dans la recombinaison méiotique.

3. Souris invalidées pour les homologues de MutL

L'analyse des lignées murines avec des mutations qui inactivent les quatre homologues de MutL indique que seule l'inactivation du complexe MutLα (Mlh1-Pms2) est nécessaire pour le fonctionnement du système MMR, causant une forte prédisposition au cancer, ce qui n'est pas le cas des deux autres complexes, Mlh1-Pms1 (MutLβ) et Mlh1-Mlh3 (MutLγ).

3. a. Souris invalidées pour *Mlh1*

La protéine Mlh1 joue un rôle central dans la formation des différents homologues du complexe MutL de manière analogue à la protéine Msh2 dans la formation des différents homologues du complexe MutS. En conséquence, l'inactivation du gène *Mlh1* entraîne une survie réduite et un fort phénotype tumoral similaire à celui des souris *Msh2*^{ko}, 50% de ces souris mourant à l'âge de 7 mois et le reste à l'âge de 18 mois (Edelmann et al, 1999b). Le spectre tumoral des souris *Mlh1*^{ko} inclut des lymphomes T, des adénocarcinomes intestinaux et des tumeurs de la peau (Baker et al, 1996; Edelmann et al, 1996; Edelmann et al, 1999a; Prolla et al, 1998). Conformément à son rôle central dans le système MMR, la déficience *Mlh1* entraîne une perte complète de réparation et un fort phénotype mutateur dans les tissus des souris déficientes et des tumeurs MSI (**Tableau 5**). Les souris *Mlh1*$^{+/-}$ développent des tumeurs du même spectre que les *Mlh1*^{ko} dans 30% des cas (Edelmann et al, 1999b). Les femelles comme les mâles *Mlh1*^{ko} sont stériles, avec un arrêt au cours de la première division méiotique dans les spermatocytes dù à l'implication de la protéine Mlh1 dans la division méiotique (Baker et al, 1996).

3. b. Souris invalidées pour *Pms2, Pms1* et *Mlh3*

L'inactivation de *Pms2* chez les souris entraîne également une augmentation de la prédisposition au cancer, mais le phénotype est moins sévère et le spectre tumoral différent de celui observé chez les souris déficientes pour les gènes *Mlh1, Msh2* ou *Msh6*. Les souris *Pms2*^{ko} ont une survie significativement réduite comparée aux souris de génotype sauvage et hétérozygote (*Pms2*$^{+/-}$). Bien que les souris déficientes pour le gène *Pms2* développent des lymphomes et des sarcomes, elles ne développent pas de tumeurs intestinales (Baker et al, 1995; Prolla et al, 1998). Le phénotype tumoral atténué des souris *Pms2*^{ko} comparé à celui des souris *Mlh1*^{ko} (Yao et al, 1999), peut s'expliquer par la redondance fonctionnelle de la protéine Pms2 dans le processus de réparation des erreurs de réplication (Baker et al, 1995). L'analyse du phénotype MSI dans les souris déficientes pour *Pms2* a montré que la fréquence des mutations était trois fois plus faible que celle des souris déficientes pour le gène *Mlh1*. Cette différence dans le phénotype mutateur pourrait expliquer le retard d'apparition de cancer chez les souris *Pms2*^{ko}. Ces données sont en accord avec le phénotype observé chez les patients atteints du syndrome de Lynch mutés pour le gène *PMS2*.

L'inactivation du gène *Pms1* n'aboutit pas à des défauts de réparation détectables, et les souris *Pms1*^{ko} ont une survie comparable à celle des souris de génotype sauvage, aucune prédisposition au cancer n'ayant été observée (Prolla et al, 1998). Dans cette situation également, la redondance fonctionnelle, dans les fonctions de réparation entre les différents complexes de MutL, permet d'expliquer ces observations. Chez les souris *Mlh3*^{ko}, il a été rapporté l'émergence de lymphomes et de tumeurs gastro-intestinales (Chen et al, 2005) (**Tableau 5**).

4. Souris invalidées pour les protéines accessoires du système MMR

Les mutations dans les gènes homologues MutS et MutL représentent la grande majorité des mutations impliquées dans le syndrome de Lynch. Néanmoins, il est possible que des mutations dans des gènes qui participent aux événements en aval de la réparation par le système MMR, comme l'excision de mésappariements de bases, puissent être responsables d'une minorité de mutations impliquées dans le syndrome de Lynch. EXO1 est une exonucléase

5’-3' qui interagit avec MSH2 et MLH1 dans les cellules humaines, et elle est connue pour participer à l'excision des mésappariements de bases. Des mutations dans le gène *EXO1* ont été trouvées chez des patients ayant un phénotype clinique évocateur d’un syndrome de Lynch, avec notamment des tumeurs de type MSI (Wu et al, 2001). Cependant, l’implication d’EXO1 dans l'étiologie de ces cas de cancers reste controversée (perte de l’allèle mutant plutôt que de l’allèle sauvage du gène *EXO1* dans les tumeurs). Chez les souris, l'inactivation du gène *Exo1* altère la réparation des mésappariements d'une seule base et des petites boucles insertions/délétions, mais pas celle des altérations dinucléotidiques (Wei et al, 2003). Par conséquent, les tissus des souris *Exo1*^{ko} montrent un phénotype MSI seulement sur les marqueurs mononucléotidiques. En outre, l'inactivation du gène *Exo1* entraîne une prédisposition accrue au cancer, les souris développant des lymphomes en fin de vie. La comparaison avec les souris déficientes pour les gènes *Msh2*, *Msh6*, *ou Mlh1*, qui non seulement développent des lymphomes, mais aussi des tumeurs intestinales à un plus jeune âge, indique que les mutations du gène *Exo1* ne jouent pas un rôle important dans la formation de tumeurs gastro-intestinales (**Tableau 5**) ce qui est en accord avec le manque de preuve en faveur de l’implication des mutations de ce gène dans le syndrome de Lynch (Jagmohan-Changur et al, 2003).

Plusieurs autres protéines sont connues pour participer à la réparation médiée par le système MMR, en particulier dans les derniers stades de la réparation. Parmi celles-ci, figurent des protéines liées à la réplication de l'ADN, tels que PCNA, RFC et la polymérase δ. Cependant, l'inactivation de ces gènes, en raison de leur rôle essentiel dans la cellule, entraîne des phénotypes cellulaires létaux, ce qui doit également se traduire par une létalité dans les cellules tumorales (Edelmann & Edelmann, 2004).

Génotype	Survie moy. (en mois)	Fertilité (M / F)	*Mono-nucléotides	*Di-nucléotides	Incidence tumorale	Spectre tumoral
Homologues de MutS						
Msh2 ko	6	+/+	élevée	élevée	forte	Lymphomes, GI, tumeurs cutanées et autres
Msh3 ko	18	+/+	modérée	élevée	faible	GI et autres
Msh6 ko	9	+/+	pas détectée	faible	forte	Lymphomes, GI, tumeurs cutanées et autres
Msh6 ko *Msh3* ko	6	+/+	élevée	élevée	forte	Lymphomes, GI, tumeurs cutanées et autres
Msh4 ko	20	-/-	sans objet	sans objet	sans objet	sans objet
Msh5 ko	20	-/-	sans objet	sans objet	sans objet	sans objet
Homologues de MutL						
Mlh1 ko	7	-/-	élevée	élevée	forte	Lymphomes, GI, tumeurs cutanées et autres
Pms1 ko	18	+/+	sans objet	sans objet	sans objet	sans objet
Pms2 ko	9	-/+	élevée	élevée	forte	Lymphomes, GI, sarcomes, tumeurs cutanées et autres
Mlh3 ko	NR	-/-	faible ou modérée	modérée	forte	Lymphomes, GI, tumeurs cutanées et autres
Pms2 ko *Mlh3* ko	7	NR	élevée	NR	forte	Lymphomes et GI
Exonucléase						
Exo1 ko	NR	-/-	élevée	faible	modérée	Lymphomes

Tableau 5. Phénotype des souris invalidées pour les gènes du système MMR. M, mâle; F, femelle; *incidence du phénotype MSI. Spectre tumoral comprenant des lymphomes B et T; des tumeurs gastro-intestinales (GI) (adénomes, adénocarcinomes); des tumeurs cutanées (cancers spino cellulaires) ; et autres tumeurs (utérus, cérébrale, pulmonaire, hépatique, des glandes mammaires et sarcomes). NR non renseigné (d'après Edelmann & Edelmann, 2004; Taketo & Edelmann, 2009).

5. Pertinence des modèles murins pour l'étude de l'oncogenèse MSI

Les souris déficientes pour ces gènes MMR ont grandement amélioré la compréhension du rôle physiologique de ces gènes dans l'évitement de mutation et la suppression de la tumorigenèse (Edelmann & Edelmann, 2004). La majorité des souris invalidées pour les deux allèles de l'un des gènes du système MMR (à l'exception de *Pms1*) développent des tumeurs à un âge précoce, et dans certains cas, le spectre tumoral est évocateur du syndrome CMMRD. En général, on observe une bonne corrélation entre les phénotypes des souris déficientes dans l'un des gènes du système MMR, les défauts de réparation observés et les résultats des analyses de mutation chez les patients atteints du syndrome de Lynch. La différence de phénotype tumoral observé entre l'homme et la souris, peut s'expliquer par la différence des gènes cibles de l'instabilité des microsatellites. En effet, les microsatellites présents dans les gènes cibles humains, sont rarement conservés dans les gènes murins équivalents. Le phénotype tumoral quasi-asymptomatique des souris MMR hétérozygotes comparé à celui des patients atteints du syndrome de Lynch est probablement dû à la durée de vie réduite des souris (2 à 3 ans), qui rend la perte somatique de l'allèle sauvage et par conséquent l'oncogenèse peu probable (Edelmann & Edelmann, 2004; Hegan et al, 2006; Heyer et al, 1999; Klausner, 1999).

B. Les modèles cellulaires humains de déficience du système MMR

La première lignée cellulaire immortelle d'origine humaine fut la lignée cancéreuse HeLa établie par le Dr Georges Grey. Ces cellules proviennent d'un prélèvement de métastase effectué sur une patiente Henrietta Lacks, atteinte d'un cancer du col de l'utérus et décédée en 1951. Elles sont aujourd'hui encore d'un usage extrêmement courant (Callaway, 2013).

1. Lignées épithéliales cancéreuses

A l'instar de la lignée HeLa, d'autres lignées cellulaires épithéliales cancéreuses ont été établies à partir de prélèvements de tumeurs humaines mais de phénotype MSI cette fois. Le phénotype MSI étant une signature de la déficience du système MMR, ces lignées sont déficientes pour l'un des gènes MMR (*MLH1, MHS2, MSH6*). Ces lignées cancéreuses MSI proviennent principalement des trois types de tissus tumoraux connus, l'estomac (par exemple la lignée SNU1), l'endomètre (HEC59, RL95-2) et le colon (HCT116, HCT15, RKO, LS411, TC7, LoVo, KM12, Lim2405, LS174T, …). Elles présentent l'avantage de proliférer indéfiniment en culture, sont une source inépuisable de matériel biologique à tester et permettent d'obtenir des résultats reproductibles, à faible coût. Cependant, les lignées cellulaires ne permettent pas d'étudier les interactions entre les différents types cellulaires qui constituent un tissu ou un organe.

2. Lignées lymphoblastoïdes

2. a. Généralités sur le virus d'Epstein-Barr

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) appartient à la famille des *Herpesviridaes*. Une des particularités de ces virus est qu'ils sont responsables d'infections dites latentes, qui persistent tout au long de la vie de l'individu infecté (Young & Rickinson, 2004). On estime que plus de 90% de la population adulte mondiale est infectée par EBV avec une persistance asymptomatique chez la majorité des sujets infectés (Henle & Henle, 1969). En 1958, Denis Burkitt, un chirurgien anglais travaillant en Ouganda, a décrit pour la première fois un cancer affectant des enfants en Afrique équatoriale (Burkitt, 1958). La distribution géographique du lymphome de Burkitt et les conditions climatiques associées suggèrent qu'un agent infectieux pourrait en être responsable (Burkitt, 1962). En 1964, Epstein, Achong et Barr ont identifié des particules virales dans des

lignées cellulaires provenant d'une biopsie de lymphome de Burkitt. Ces particules virales de la famille des herpès virus, ont été dénommées virus d'Epstein-Barr (EBV) (Epstein et al, 1964). Par la suite, des études ont montré que les sérums des patients atteints de lymphome de Burkitt avaient des taux sériques plus élevés d'anticorps dirigés contre les antigènes de l'EBV que les sérums de sujets contrôles (Henle & Henle, 1966). Ces analyses sérologiques ont également identifié l'EBV comme agent étiologique de la mononucléose infectieuse (Henle & Henle, 1969), ainsi qu'associé à une autre maladie maligne, le carcinome indifférencié du nasopharynx (Henle et al, 1968,zur Hausen, 1970 #361), confirmant la relation de ce virus à des cancers chez l'homme (Henle & Henle, 1970).

L'EBV possède une structure comprenant du centre vers la périphérie : le nucléoïde contenant le génome viral, la nucléocapside de forme icosahédrique (20 faces, 12 sommets), le tégument composé de nombreuses protéines virales et cellulaires, et enfin, l'enveloppe lipidique composée d'une double couche lipidique. Le tégument correspond à une partie de membrane plasmique de la cellule hôte au niveau de laquelle le virus a exprimé ses antigènes de membrane, qu'il a intégré et revêtu lors de sa libération. Chaque cellule infectée par l'EBV comporte de multiples copies extrachromosomiques du virus. La capacité de transformation de l'EBV a été confortée par la potentialité du virus à transformer efficacement *in vitro* des lymphocytes B et d'induire des tumeurs chez les primates non humains (Henle et al, 1967; Miller, 1974; Pope et al, 1968). L'EBV est un puissant inducteur *in vitro* de l'immortalisation et de la transformation des lymphocytes B, et il permet ainsi l'établissement de lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCL) (**Figure 12**). Les lymphocytes B des LCL sont très peu permissifs à la réplication virale (cycle lytique). Le virus peut s'y maintenir dans un état dit « de latence ». Ce statut de latence virale repose sur deux phénomènes interdépendants. Le premier est la répression du cycle lytique, ainsi que le maintien du génome viral en situation intranucléaire sous forme épisomale circularisée. Le deuxième, essentiel au maintien de la latence virale, est l'expression des gènes dits de latence. Ces gènes codent pour des protéines qui ont des fonctions diverses. Certaines d'entre elles auront la propriété d'immortaliser les lymphocytes B infectés. L'expression des protéines de latence contribue aux propriétés d'immortalisation et/ou de transformation d'EBV en influençant la «machinerie» cellulaire afin de contrôler la croissance et/ou la survie des cellules infectées.

2. b. La physiopathologie de l'infection des cellules lymphoïdes par le virus EBV

Les différentes étapes de l'infection des lymphocytes B par l'EBV ont été étudiées et mises en évidence *in vitro*. L'infection débute tout d'abord par l'ancrage et la fixation de l'EBV à la surface du lymphocyte B (Fingeroth et al, 1984; Nemerow et al, 1989; Nemerow et al, 1987). Après fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique du lymphocyte B de la vésicule d'endocytose, la nucléocapside rentre dans le cytosol (Borza & Hutt-Fletcher, 2002; Miller & Hutt-Fletcher, 1988; Molesworth et al, 2000; Wang & Hutt-Fletcher, 1998; Wang et al, 1998). Dans l'étape d'internalisation des virions, la nucléocapside migre dans le cytoplasme jusqu'à la membrane nucléaire, et elle est dégradée. Après décapsidation, le génome viral linéaire est transporté dans le noyau. Environ 4 heures après le début de l'infection, on observe la transcription de certains gènes viraux, puis l'expression de protéines essentielles à l'initiation de la prolifération autonome des lymphocytes B (Krauer et al, 1999; Lin et al, 2002). Vingt heures après le début de l'infection, les lymphocytes B contiennent chacun quelques génomes viraux linéaires qui ne seront pas répliqués, et qui disparaîtront suite aux nombreuses divisions cellulaires, alors que seul l'exemplaire de l'ADN viral circularisé présent dans chaque cellule, sera répliqué en même temps que les chromosomes cellulaires au cours de la phase S. On observe alors l'expression de protéines et de petits ARN viraux, marquant l'établissement complet de la latence virale de type III et l'obtention d'une LCL immortalisée capable de proliférer indéfiniment. Le nombre d'épisomes viraux est en moyenne de 10 à 100 copies par cellule infectée et reste stable. Chaque épisome viral est répliqué lors de la réplication cellulaire, et il est transmis à la cellule fille au cours de la division cellulaire.

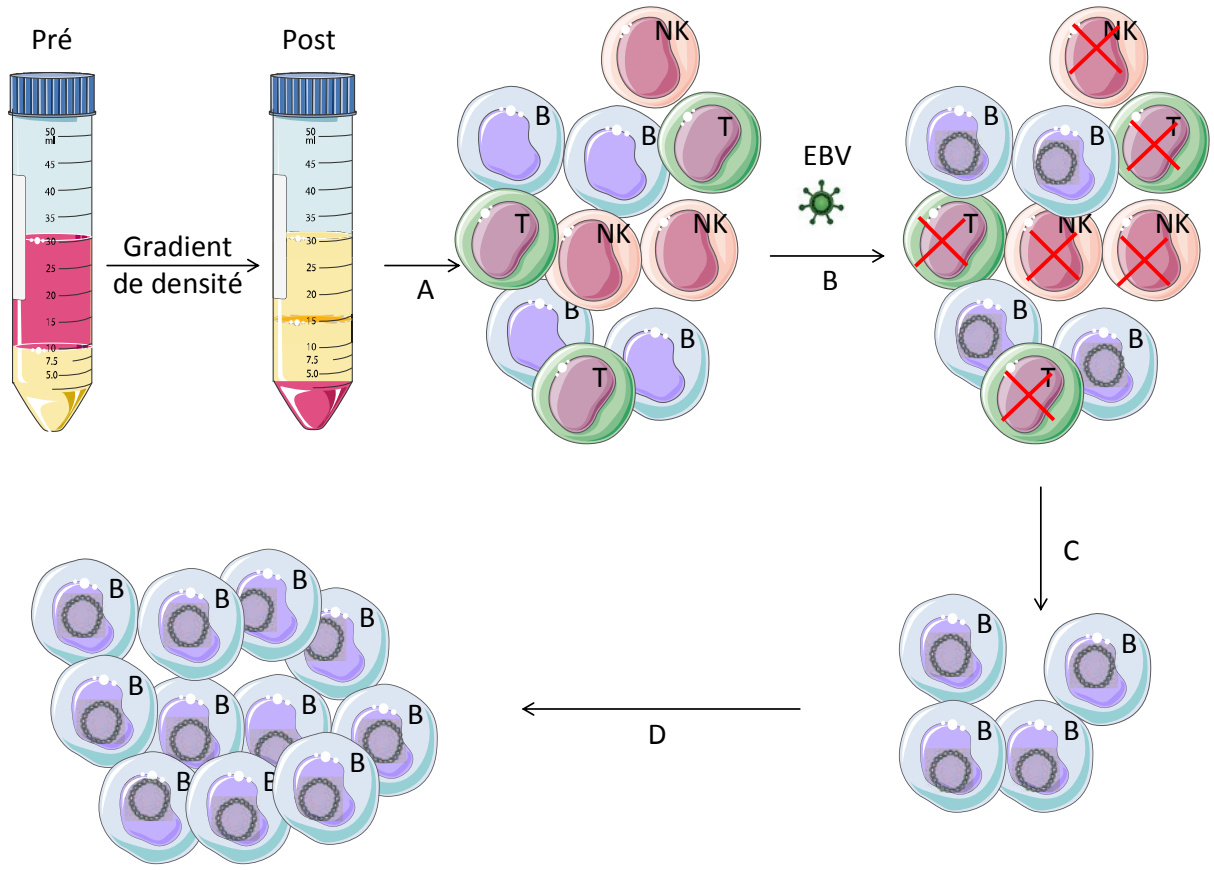


Figure 12. Etablissement d'une lignée cellulaire lymphoblastoïde (LCL) lors de l'infection par le virus d'Epstein-Barr (EBV). (A) Isolement des lymphocytes humains à partir d'un prélèvement de sang périphérique par centrifugation dans un gradient de densité constitué de Ficoll; **(B)** Infection des lymphocytes humains du sang périphérique (B, T et cytotoxiques) par le virus EBV; **(C)** Infection spécifique des lymphocytes B; **(D)** Le génome viral d'EBV reste à l'intérieur des lymphocytes B sous forme de multiples copies épisomales, et l'expression de quelques gènes viraux provoque la prolifération infinie des cellules (d'après Hussain & Mulherkar, 2012).

3. Pertinence de l'utilisation des lignées cellulaires lymphoblastoïdes

Les méthodes d'études *in vitro* permettent l'exploration de mécanismes d'action et le criblage d'un nombre important de composés, de manière rapide et peu onéreuse dans des conditions contrôlées. Cependant, l'obtention d'une source illimitée de cellules normales ou non transformées, issues d'un seul et même individu a toujours été une limite à l'avancée de la recherche biomédicale, jusqu'à l'obtention des LCL. Leur utilisation, depuis plus de 20 ans, illustre les nombreux avantages des LCL. En effet, en plus d'être facile à maintenir en culture, elles ont un faible taux de mutations somatiques de l'ordre 0,3% (Mohyuddin et al, 2004). Ainsi, les LCL constituent une méthode privilégiée de stockage du matériel biologique issus de patients (cellules, ADN, ARN, protéines) en évitant les prélèvements multiples, et permettent ainsi de générer des banques de matériel biologique afin de mener des études génomiques ou des études épidémiologiques (Amoli et al, 2008; Sie et al, 2009). Les possibles modifications générées par l'intégration du génome viral EBV constituent une question importante concernant la pertinence de l'utilisation des LCL dans les études de pharmacogénétique. Il a été rapporté que le nombre de copies d'EBV, le niveau d'expression de certaines d'enzymes virales et le taux de prolifération sont tous des facteurs non-génétiques de la réponse de certains médicaments, y compris le 5-fluorouracile (5-FU), le méthotrexate et la 6-MP (Choy et al, 2008; Welsh et al, 2009). De plus, il n'y a pas de relation entre le nombre de copies d'EBV intégrées dans la cellule et la sensibilité aux drogues (Stark et al, 2010). Les LCL sont considérées comme un bon modèle *in vitro* pour les études de criblage génétique, une variété de tests moléculaires et fonctionnels (Bernacki et al, 2005; Bleibel et al, 2009; Duan et al, 2007; Huang et al, 2007; Shukla et al, 2008; Sie et al, 2009; Wen et al, 2011; Zijno et al, 2010).

Travaux de recherche

Article 1

« Azathioprine induction of tumors with microsatellite instability: risk evaluation using a mouse model »

Sahra Bodo, Magali Svrcek, Isabelle Sourrouille, Peggy Cuillières-Dartigues, Tatiana Ledent, Sylvie Dumont, Laetitia Dinard, Philippe Lafitte, Camille Capel, Ada Collura, Olivier Buhard, Kristell Wanherdrick, Alexandra Chalastanis, Virginie Penard-Lacronique, Bettina Fabiani, Jean-François Fléjou, Nicole Brousse, Laurent Beaugerie, Alex Duval, Martine Muleris

Soumis

Evaluation du risque d'émergence de cancers MSI induits par l'azathioprine dans un modèle murin

Introduction

Des données de la littérature, dont certaines issues du laboratoire, ont permis de détecter un phénotype MSI dans une proportion significative de cancers (lymphomes, leucémies aiguës myéloïdes) développés dans un contexte d'immunosuppression alors que ce phénotype n'est jamais retrouvé dans ces mêmes types tumoraux lorsqu'ils sont observés chez des patients immunocompétents. D'autres travaux ont notamment suggéré que les thiopurines telles que l'azathioprine (Aza), molécules fréquemment utilisées comme immunosuppresseurs au long cours dans différents contextes cliniques, constituaient un facteur de risque pour l'émergence de lymphomes ou leucémies MSI de survenue tardive. De manière intéressante, une déficience du système MMR a également été observée *in vitro* dans des cultures cellulaires traitées avec ces thiopurines. Par conséquent, il a été proposé que dans ce contexte particulier d'exposition aux thiopurines, la déficience MMR confère un avantage sélectif aux cellules, cette survie s'accompagnant alors d'une accumulation de lésions non réparées dans l'ADN. Les thiopurines pourraient ainsi conduire à un mécanisme de cancérogenèse en favorisant l'émergence de cellules MMR-déficientes. Dans une étude précédemment menée au laboratoire, l'induction massive d'un phénotype tumoral MSI par un traitement avec l'Aza avait été rapporté chez des souris génétiquement prédisposées (*Msh2*$^{+/-}$) (Chalastanis et al, 2010). Cependant, cette étude n'avait pas permis de statuer sur le risque oncogénique lié à l'utilisation de thiopurines chez les souris de génotype sauvage à cause de la grande toxicité de l'Aza, à la dose utilisée (50mg/L).

Dans le but de déterminer l'impact oncogénique de l'Aza en dehors d'un contexte de prédisposition génétique, nous avons mène une étude dose-réponse. Dès le sevrage, à l'âge de 6 semaines, de l'Aza (50, 30 et 10 mg/L) ou de la ciclosporin A, CsA (300 mg/L) ont été administrées, *ad libitum* par voie orale, à des souris de génotype sauvage (*Msh2*^{wt}; n=149) ou invalidées pour l'une (*Msh2*$^{+/-}$; n=110) ou les deux copies (*Msh2*^{ko}; n=74) du gène *Msh2*. Puis, nous avons évalué l'impact de l'Aza et de la CsA sur la survie (courbes de Kaplan-Meier) et sur

l'incidence de lymphomes notamment de phénotype MSI chez les souris en comparaison avec un groupe contrôle de chaque génotype n'ayant reçu aucun traitement. Dans le cadre de ce protocole point limite, les souris asthéniques ont été autopsiées et des échantillons de tissus ont été prélevés pour les analyses histologiques et moléculaires.

Résultats

Toutes les souris *Msh2*^{ko} (non traitées ou traitées par l'Aza ou la CsA) ont développé des lymphomes MSI diffus très agressifs. Les traitements n'ont eu aucun impact sur l'incidence de lymphomes, ou la survie des animaux. Par contre, chez les souris de génotype sauvage, nous avons observé une relation dose-réponse entre le traitement par l'Aza et la survie (médianes de survie respectives de 78, 123, et 568 jours; P<0,0001; test log-rank). La dose la plus faible (10mg/L), permet la survie prolongée des souris et est associée à l'émergence de lymphomes diffus dans une fraction significative de souris (7/23 ; 30,5%), et une souris (1/7) a développé un lymphome de type MSI. Nous n'avons pas trouvé de phénotype MSI parmi les 6 lymphomes (6/21 ; 28%) observés chez les souris de génotype sauvage traitées par la CsA. De manière analogue à ce qui est observé chez les souris *Msh2*^{wt}, on observe une relation dose-réponse entre le traitement à l'Aza et la survie chez des souris *Msh2*$^{+/-}$ (médianes de survie respectives de 164, 220, et 602 jours; P<0,0001; test log-rank). L'Aza induit des lymphomes MSI dont l'incidence et le délai de survenue dépendent de la dose (respectivement 22/22, 21/23, et 4/13 pour l'Aza50, Aza30 et Aza10; P<0,0001; test exact de Fisher) alors que la CsA n'entraîne pas d'augmentation significative de l'induction de lymphomes MSI (respectivement 3/10 et 1/7 pour les souris traitées par la CsA et contrôles; P=0,60; test exact de Fisher).

Conclusion

L'Aza, contrairement à la CsA, conduit à un processus oncogénique MSI chez la souris.

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

Sahra Bodo[1,2], Magali Svrcek[1,2,3], Isabelle Sourrouille[1,2], Peggy Cuillières-Dartigues[4], Tatiana Ledent[1,2], Sylvie Dumont[2,5], Laetitia Dinard[1,2], Philippe Lafitte[1,2], Camille Capel[1,2], Ada Collura[1,2], Olivier Buhard[1,2], Kristell Wanherdrick[1,2], Alexandra Chalastanis[1,2], Virginie Penard-Lacronique[6], Bettina Fabiani[3], Jean-François Fléjou[1,2,3], Nicole Brousse[7], Laurent Beaugerie[2,8], Alex Duval[1,2], and Martine Muleris[1,2] (*)

[1] INSERM, UMR_S 938, CDR Saint-Antoine, F-75012 Paris, France
[2] Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR_S 938, CDR Saint-Antoine, F-75012 Paris, France
[3] AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Service d'Anatomie Pathologique, F-75012 Paris, France
[4] AP-HP, Institut Gustave Roussy, Service d'Anatomie Pathologique, F-94805 Villejuif, France
[5] IFR 65, F-75012 Paris, France
[6] INSERM, U985, Institut Gustave Roussy, F-94805 Villejuif, France
[7] AP-HP, Hôpital Necker-Enfants Malades, Service d'Anatomie Pathologique, F-75015 Paris, France
[8] AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Service de Gastroentérologie, F-75012 Paris, France

(*) Corresponding author
Martine Muleris, email: martine.muleris@inserm.fr, tel: 33 (0)1 49 28 66 67
INSERM UMRS 938, Equipe « Instabilité des Microsatellites et Cancer » Hôpital Saint-Antoine
184 rue du Faubourg Saint-Antoine, F75571 Paris cedex 12, France
Conflict of interest: the authors have declared that no conflict of interest exists

Abbreviations used in this paper: MMR, mismatch repair ; MSI, microsatellite instability ; Aza, azathioprine ; CsA, ciclosporin A ; LPD, lymphoproliferative disorders ; IBD, inflammatory bowel disease.

ABSTRACT

Background: Mismatch-repair (MMR)-deficient cells show increased in vitro tolerance to thiopurine because they are able to escape apoptosis resulting from MMR-dependent signaling of drug-induced DNA damage. The microsatellite instability (MSI) phenotype caused by MMR-deficiency has been reported in late onset leukemias and lymphomas following prolonged treatment with immunosuppressants including azathioprine (Aza), a thiopurine prodrug. Here we performed a dose effect study in mice to investigate the development of MSI cancers associated with long term Aza treatment.

Methods: Over two years, Aza (50, 30 or 10 mg/L) or the immunosuppressant ciclosporin A (CsA 300 mg/L) were administered in drinking water to mice that were wild type (*Msh2*^{wt}; n=149), null (*Msh2*^{ko}; n=74) or heterozygous (*Msh2*$^{+/-}$; n=110) for the MMR gene *Msh2*. Survival was evaluated using Kaplan–Meier analysis and log-rank test. The presence of tumor was evaluated both macroscopically and histologically, while their MSI status was determined by polymerase chain reaction analysis.

Results: Tolerance to Aza was highly dependent on the MMR status of mice. In *Msh2*^{wt} mice, Aza induced a high incidence of lymphoproliferation. Prolonged survival was only observed at a dose of 10 mg/L and was associated with the development of macroscopic lymphomas. However, one *Msh2*^{wt} mouse developed a tumor with the MSI phenotype. In *Msh2*$^{+/-}$ mice, Aza induced a high incidence of MSI lymphomas in a dose-dependent manner. In contrast, CsA treatment did not induce MSI tumors in *Msh2*^{wt} or *Msh2*$^{+/-}$ mice.

Conclusion: Aza but not CsA was found to trigger lymphomagenesis through an MSI-driven process in mice.

INTRODUCTION

Substantial clinical progress in immunosuppression and anticancer chemotherapy has improved the overall survival of patients. Unfortunately, the survival benefits conferred by some long-term treatments such as thiopurine are also associated with an increased risk of developing therapy-related cancers. Thiopurine drugs comprise azathioprine (Aza) and its metabolite 6-mercaptopurine. Aza is widely used as an immunosuppressive agent for the treatment of transplant graft rejection and for autoimmune diseases such as inflammatory bowel disease (IBD) and autoimmune hepatitis. 6-mercaptopurine is commonly used as part of maintenance therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. Aza is classified as a human carcinogen but the specific mechanisms that underlie its in vivo carcinogenicity following thiopurine therapy remain unclear (1).

Interestingly, several clinical studies have reported an association between the use of prolonged thiopurine regimens and the occurrence of tumors displaying MSI. The MSI tumor phenotype is the hallmark of a defective DNA mismatch repair (MMR) system, the major function of which is to edit errors produced during replication. Inactivation of the MMR system greatly increases spontaneous mutation rates. This is observed as microsatellite instability (MSI) and manifests as frequent deletion mutations in DNA regions comprising mostly of long mono- or dinucleotide tracts. In vitro studies have demonstrated that MMR also plays an important role in thiopurine-mediated cytotoxicity, as evidenced by the increased resistance of MMR-deficient cells to thiopurine exposure. The major cytotoxic effects of thiopurine drugs occur following incorporation of the active metabolite (thio-deoxyguanosine triphosphate, or TdGTP) into DNA and subsequent misincorporation of thymidine opposite TdGTP during DNA replication. Inability of the MMR system to correctly process the resultant mispairs ultimately leads to cell apoptosis. MMR–deficient cells cannot repair drug-induced DNA lesions and hence they escape cytotoxicity through a mechanism known as thiopurine tolerance (2, 3). This suggests that thiopurines may constitute a risk factor for development of human cancer via selection of MMR-defective cells that subsequently undergo neoplastic cell transformation following the accumulation of genetic mutations caused by MSI.

Despite functional evidence suggesting a putative causal role for thiopurine therapy in the development of MSI cancers, the clinical evidence to date is mixed and hence this remains to be established conclusively. An MSI phenotype was observed in acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndromes that developed after organ transplantation and were associated with immunosuppression by Aza therapy (4). Previous studies from our group (5, 6) also reported a low frequency of the MSI phenotype in immunodeficiency-related non-Hodgkin lymphomas arising in transplant patients who received Aza as part of their immunosuppressive regimen (13/143 vs 0/500 in immunocompetent patients). However, some patients with suspected iatrogenic MSI tumors did not receive thiopurine therapy (6). Interpretation of these findings is further complicated by the fact that immunosuppressive regimens in transplant patients often combine Aza with other drugs such as steroids and ciclosporine A (CsA). Additionally, the MSI phenotype was not detected in immunodeficiency-related skin cancers and no significant association was observed between Aza intake and MSI in intestinal neoplasias arising in patients with IBD (7-10). Thus, a possible clinical association between thiopurine treatment-related cancer and MMR defects remains uncertain and requires further investigation.

Here we describe results using an animal model to address whether thiopurine tolerance is the putative oncogenic mechanism that underlies the emergence of MSI tumors. In an earlier proof of concept study we demonstrated that Aza induced massive and early development of MSI lymphomas in *Msh2*$^{+/-}$ mice carrying a germline mutation in the MMR gene *Msh2* (11). In contrast, untreated *Msh2*$^{+/-}$ mice developed MSI lymphomas at a very low frequency. This work established the *Msh2* mouse model, the murine equivalent of Lynch syndrome in humans, as relevant for the investigation of thiopurine tolerance as a causal mechanism for MSI cancers. However, the substantial toxicity of Aza in *Msh2* wild type (*Msh2*^{wt}) mice prevented us from investigating the ability of this agent to induce MSI-driven malignancy in mice without a genetic predisposition to MMR defects. Moreover, we did not investigate other immunosuppressants whose action is independent of MMR. In the present work we have therefore performed a dose effect study using wild type, null or heterozygous mice for the *Msh2* gene and identified appropriate long-term treatment conditions for Aza, thus avoiding the major cytotoxic effects encountered previously. To evaluate whether the observed effects could

be attributed specifically to Aza, we also investigated another frequently prescribed immunosuppressant, ciclosporin A (CsA). This agent inhibits the transcription of cytokines, leading to reduced functional ability of effector T-cells.

MATERIAL AND METHODS

Mice and treatments. Mice with three different *Msh2* genotypes (null, heterozygous, or wild type) on an FVB background received water, Aza (50, 30 or 10 mg/L) or CsA (300 mg/L). All treatments were administered via the drinking water from the age of 6 weeks. Mice were kept in a pathogen-free environment and sacrificed when they displayed signs of poor health. The spleen, liver, thymus, lymph nodes, gut and muscle were removed for examination. All experiments were conducted in accordance with the regulations controlling procedures in live animals (approval Ce5/2010/065 of the Ethical Committee for Laboratory Animal Care « Charles Darwin », France).

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

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

MSI testing. Polymerase chain reaction analysis of three noncoding mononucleotide repeats (A22, A24, T40) was used to determine the MSI status of tumor tissues (11). Amplified PCR products were separated by capillary electrophoresis on an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer and analyzed using GeneMapper software (version 3.7, Aplera). Tumors were scored as MSI if the length of at least one mononucleotide repeat marker in tumor DNA differed from that observed in normal tissue DNA obtained from the same animal.

RESULTS

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

A dose-response relationship was observed between Aza treatment and the survival of *Msh2*^{wt} mice. The lowest Aza dose was associated with a significantly prolonged lifespan, with median survival of 78, 123 and 568 days for 50, 30, and 10 mg/L, respectively (P<.0001; Log-rank test) (Figure 1A). Although 10 mg/L Aza (Aza10) still had a significant impact upon lifespan (568 vs 652 days for untreated mice; P=.007; Log-rank test), this was the only dose compatible with prolonged survival of animals. A patent tumor syndrome displaying abnormal enlargement of the thymus, spleen or liver and massive and diffuse proliferation of lymphoma cells was observed in a substantial proportion of the Aza10 cohort (7/23, 30.5%) (Figures 1A to 1C). *Msh2*^{wt} mice exposed to higher Aza doses of 30 and 50 mg/L (Aza30 and Aza50, respectively) were sacrificed within several months of birth due to poor tolerance to therapy. Consistent with our previous results, micro-lymphoproliferations were frequently observed during histological examination of these animals (11). Microscopic foci comprised of medium-to-large neoplastic lymphoid cells were restricted to the spleen area located under the capsule (Figures 1A to 1C).

CsA-treated *Msh2*^{wt} mice also showed significantly shorter survival compared to untreated mice (345 vs 652 days, respectively; P=.002; Log-rank test) (Figure 1A). Aza10- and CsA- treated *Msh2*^{wt} mice showed comparable survival (median of 568 vs 345 days, respectively; P=.045; Log-rank test) and both groups showed the presence of lymphomas in about one third of cases (7/23 vs 6/21, respectively; P=1; Fisher's exact test) (Figures 1B, 1C).

As expected, all *Msh2*^{ko} mice, whether treated or not, were sacrificed before the age of 11 months because they developed patent tumor syndrome due to constitutive MMR-deficiency. The median survival of *Msh2*^{ko} mice was 117 days for untreated animals, 113 days with Aza30, 109 days with Aza10 and 119 days with CsA (P=.043; Log-rank test) (Figures 1A to 1C).

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

As expected, lymphomas that developed in *Msh2*^{ko} mice led to patent tumor syndrome that displayed MSI (Supplementary Table S1). In *Msh2*^{wt} mice, microsatellite genotyping was performed in all animals that developed patent tumor syndrome. As described above, these had mostly been treated with Aza10 or CsA. A diffuse, MMR-deficient lymphoma due to

proliferation of MSI tumor cells was found in 1/7 (14%) Aza10-treated *Msh2*^{wt} mice. All tumor DNAs from the 6 CsA-treated mice with patent lymphoma were non-MSI (Figure 1D). The two Aza30-treated mice that did not die young showed a late onset, patent lymphoma syndrome that was also non-MSI (Figure 1B). Tumor cells obtained by laser microdissection from splenic microproliferations in four Aza50-treated *Msh2*^{wt}mice also failed to show MSI.

The single *Msh2*^{wt}mouse that developed an MSI tumor syndrome was sacrificed at the age of 315 days because of posterior leg paralysis. At autopsy, it presented an enlarged spleen and lymph nodes. Histological examination revealed massive (>90%) infiltration of the spleen, thymus and lymph node tissues by medium to large size lymphoid cells. Examination of tumor DNA from the splenic tissue with three microsatellite markers revealed a change in length of all three loci compared with normal tissue DNA from the same mouse (Figures 2A and 2B).

Impacts of azathioprine and ciclosporin A on *Msh2*$^{+/-}$ mice

We next investigated whether CsA and Aza treatment could trigger MSI lymphomagenesis in the context of a genetic predisposition to MSI tumor development (i.e. *Msh2*$^{+/-}$). As previously reported (11), *Msh2*$^{+/-}$ mice were more tolerant to Aza than *Msh2*^{wt} animals, probably due to MMR haploinsufficiency (Supplementary Figure S1). Similar to *Msh2*^{wt} mice, a dose-response relationship was observed for *Msh2*$^{+/-}$ mice, with median survival of 164, 220 and 602 days for Aza50, Aza30 and Aza10 treatment, respectively (P<.0001; Log-rank test) (Figure 3A). Aza50-treated *Msh2*$^{+/-}$ mice systematically developed early onset, MSI lymphomas (22/22 vs 1/7 for untreated *Msh2*$^{+/-}$ animals, respectively; P=.00001; Fisher's exact test) (Figures 3B to 3D). The onset of tumors was significantly delayed at lower Aza doses, with a mean age of onset of 154, 255 and 341 days for Aza50, Aza30 and Aza10, respectively (P<.0001; ANOVA test). The incidence of the MSI phenotype was also significantly reduced with the lowest Aza dose (22/22, 21/23 and 4/13, respectively; P<.0001; Fisher's exact test). Compared to untreated *Msh2*$^{+/-}$ mice, Aza10-treated mice showed no difference in the incidence of lymphomas (13/17 vs 7/10; P=1; Fisher's exact test, respectively) or in their MSI phenotype status (4/13 vs 1/7; P=.6; Fisher's exact test, respectively). They did however show a slightly shorter median survival (575 vs 625 days, respectively; P=.020; Log-rank test) and an earlier median age of lymphoma onset (341 vs 519 days, respectively; P=.0042; Student's t test).

CsA-treated *Msh2*$^{+/-}$ mice showed reduced survival compared to untreated *Msh2*$^{+/-}$ mice (324 vs 625 days, respectively; P<.0001; Log-rank test) and an earlier median age of lymphoma onset (313 vs 519 days, respectively; P =.0116; Student's t test). Overall, 45.5% (10/22) of CsA-treated *Msh2*$^{+/-}$ mice showed evidence of lymphoma, which was not statistically different to untreated *Msh2*$^{+/-}$ mice (7/10; P=.26; Fisher's exact test). The incidence of MSI amongst lymphomas from these two groups was not significantly different (3/10 vs 1/7, respectively; P=.60; Fisher's exact test). No difference in onset between MSI and non-MSI tumors was observed for Aza30-, Aza10- and CsA-treated mice (248 vs 327 days, P=0.38; 371 vs 327 days, P=0.11; 279 vs 328 days, P=0.53; Student's t test, respectively).

Together with the results obtained in *Msh2*^{wt} mice, these data support a causal role for Aza treatment, but not CsA treatment, in triggering MSI-driven lymphomagenesis in *Msh2*$^{+/-}$ mice.

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

PCR-based genotyping was performed on all MSI tumors that developed in *Msh2*$^{+/-}$ mice following an immunosuppressive regimen (Aza30-treated, n=21; Aza10-treated, n=4; CsA-treated, n=3). In the majority of cases (23/28, including 19/21 Aza30-, 3/4 Aza10- and 1/3 CsA-treated *Msh2*$^{+/-}$ mice), inactivation of the MMR system resulted from somatic loss of the remaining wild type Msh2 allele (i.e. loss of heterozygosity), as previously reported (11). cDNA sequencing of Msh2 was performed in the tumor from the single *Msh2*^{wt} mouse that displayed an MSI lymphoma following Aza treatment, however no somatic mutation was detected. Immunohistochemical analysis of Msh2, Mlh1, Msh6 and Pms2 expression was then performed to further investigate the mechanism underlying loss of MMR function in the tumor from this *Msh2*^{wt} mouse. As shown in Figure 2C, the tumor cells stained positively for these four major MMR proteins.

DISCUSSION

In the present study we investigated the ability of Aza, an immunosuppressant from the thiopurine family, to trigger MSI lymphomagenesis in mice. A limitation of this work was the small number ofmice used to investigate a possible iatrogenic risk. This was expected to be low

based upon clinical observations in humans. However, our study allows an estimation of the clinical risk associated with prolonged Aza intake based upon the development of iatrogenic tumors with MSI in a mouse model. The results demonstrate that prolonged exposure of *Msh2*$^{+/-}$ and *Msh2*^{wt} mice to thiopurine places them at risk of developing iatrogenic cancers with an MSI phenotype. Previous evaluation by our group of human lymphoproliferative disorders (LPD) that developed in 13 IBD patients following Aza (imurel) therapy revealed one case with an MSI phenotype (Supplementary Table S2). As with the lymphoma that developed in the Aza10-treated Msh2^{wt} mouse, the tumor cells from this MSI case were shown by immunohistochemistry to retain expression of the 4 MMR proteins (Supplementary Figure S2). Interestingly, about one third (3/8) of immunodeficiency-related non-Hodgkin lymphomas with the MSI phenotype that develop in transplant patients treated with Aza do not show loss of MMR protein expression (6). This suggests the MMR-deficiency could arise because of missense mutations that allow expression of an immunologically reactive but nonfunctional MMR protein, or alternately that inactivating mutations occur in other MMR-related genes such as PMS1, PMS6 or EXO1.

Aza induces apoptosis of MMR-proficient cells via the MMR–dependent signaling of Aza-induced DNA damage. Aza also has immunosuppressive properties due to induction of apoptosis in T cells (12) and inhibition of *de novo* purine biosynthesis. This hampers cell division, especially in lymphocytes which unlike other cell types cannot use the salvage pathway of purine synthesis (13). Importantly, the two latter effects are not dependent on MMR status. We previously observed considerably more toxicity at the higher dose of Aza (50 mg/L) in *Msh2*^{wt} mice compared to *Msh2*$^{+/-}$ (11) and confirmed here that heterozygous mice are more tolerant to the cytotoxic effects of Aza. These observations are consistent with an earlier report using another MMR murine model (*Mlh1*$^{+/-}$ mice) that showed *Mgmt*^{ko} x *Mlh1*$^{+/-}$ mice were less sensitive to the lethal effects of a methylating agent than *Mgmt*^{ko} x *Mlh1*^{wt} control mice (14). Thiopurines and methylating agents share a common MMR processing mechanism for converting damaged DNA bases into lethal lesions. Our results also concur with in vitro experiments showing that immortalized lymphoblasts from Lynch patients who are heterozygous at the MSH2 locus were more tolerant to the methylating agent temozolomide than MSH2^{wt} cells (15). Together, these observations suggest the overall clinical impact of Aza

results from a combination of factors such as *Msh2* genotype, drug dosage and the balance between the cytotoxic and oncogenic properties of this drug.

We propose the following explanations to account for the observed survival and tumor phenotypes in drug-treated mice with different *Msh2* genotype status. First, all *Msh2*^{ko} mice (untreated, Aza-treated and CsA-treated) exhibited the characteristic development of MSI diffuse lymphomas that ultimately resulted in their early death. In Aza-treated *Msh2*^{wt} mice, a balance was observed between the cytotoxic and oncogenic properties of this drug. Aza50-treated *Msh2*^{wt} mice had very short survival and most animals showed microscopic foci of lymphoma cells under the splenic capsule, but none developed diffuse lymphomas. We hypothesize that the microproliferations observed at autopsy did not lead to lymphoma because the mice died prematurely from organ failure related to drug cytotoxicity at this dosage. Progression of the microproliferations may also have been efficiently prevented by the immunosuppressive effects of Aza treatment. Reducing the dosage to 30 and 10 mg/L was associated with a decreased incidence of lymphoma microproliferations, however the longer median survival allowed the onset of diffuse lymphomas in some mice. Aza10 and CsA treatments resulted in similar survival times and induction of lymphomas in a substantial and comparable proportion of *Msh2*^{wt} mice. This mirrors the situation in humans where the development of lymphomas is a known adverse effect of immunosuppressive treatment. However, an MSI tumor phenotype was observed in only one *Msh2*^{wt} mouse following Aza10 treatment and in none of the CsA treated *Msh2*^{wt} mice. Since MMR deficiency in *Msh2*^{wt} mice requires inactivation of both *Msh2* alleles, this event was expected to be rare. Interestingly, the incidence of lymphomas with MSI in Aza10-treated *Msh2*^{wt} mice (1/7, 14%) is comparable to the frequency of 9% observed in post-transplant lymphoproliferative disorders in humans (5, 6).

In *Msh2*$^{+/-}$ mice, Aza50 and Aza30 treatments resulted in massive development of MSI lymphomas, whereas untreated *Msh2*$^{+/-}$ mice only rarely develop spontaneous MSI neoplasms (1/10 mice in this study). The high prevalence of the MSI phenotype in Aza-treated *Msh2*$^{+/-}$ mice is likely to be due to the heavy burden of induced thiopurine DNA lesions and the resulting strong selective pressures to escape cell apoptosis through MMR inactivation. In most *Msh2*$^{+/-}$ mice this inactivation occurs via somatic loss of the remaining wild type *Msh2* allele. At

the lowest Aza dose of 10 mg/L, we hypothesize that *Msh2*$^{+/-}$ mice efficiently convert damaged DNA bases into lethal lesions and that oncogenic mechanisms other than MSI were active, as also observed in untreated *Msh2*$^{+/-}$ mice. In contrast to Aza, CsA treatment did not lead to the induction of MSI tumors in *Msh2*$^{+/-}$ mice.

REFERENCES

1. Perrett CM, Walker SL, O'Donovan P, et al. Azathioprine treatment photosensitizes human skin to ultraviolet A radiation. Br J Dermatol. 2008;159(1):198-204.
2. Karran P. Thiopurines, DNA damage, DNA repair and therapy-related cancer. Br Med Bull. 2006;79-80:153-70.
3. Coulthard S, Hogarth L. The thiopurines: an update. Invest New Drugs. 2005;23(6):523-32.
4. Offman J, Opelz G, Doehler B, et al. Defective DNA mismatch repair in acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome after organ transplantation. Blood. 2004;104(3):822-8.
5. Duval A, Raphael M, Brennetot C, et al. The mutator pathway is a feature of immunodeficiency-related lymphomas. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(14):5002-7.
6. Borie C, Colas C, Dartigues P, et al. The mechanisms underlying MMR deficiency in immunodeficiency-related non-Hodgkin lymphomas are different from those in other sporadic microsatellite instable neoplasms. Int J Cancer. 2009;125(10):2360-6.
7. Borie C, Euvrard S, Verola O, et al. No evidence for microsatellite instability in immunodeficiency-related skin cancers. Am J Transplant. 2010;10(1):192-3.
8. Perrett CM, Harwood CA, McGregor JM, Warwick J, Cerio R, Karran P. Expression of DNA mismatch repair proteins and MSH2 polymorphisms in nonmelanoma skin cancers of organ transplant recipients. Br J Dermatol. 2010;162(4):732-42.
9. Wisgerhof HC, Hameetman L, Tensen CP, et al. Azathioprine-induced microsatellite instability is not observed in skin carcinomas of organ transplant recipients. J Invest Dermatol. 2009;129(5):1307-9.
10. Svrcek M, El-Bchiri J, Chalastanis A, et al. Specific clinical and biological features characterize inflammatory bowel disease associated colorectal cancers showing microsatellite instability. J Clin Oncol. 2007;25(27):4231-8.
11. Chalastanis A, Penard-Lacronique V, Svrcek M, et al. Azathioprine-induced carcinogenesis in mice according to Msh2 genotype. J Natl Cancer Inst. 2010;102(22):1731-40.
12. Tiede I, Fritz G, Strand S, et al. CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. J Clin Invest. 2003;111(8):1133-45.
13. Quemeneur L, Gerland LM, Flacher M, Ffrench M, Revillard JP, Genestier L. Differential control of cell cycle, proliferation, and survival of primary T lymphocytes by purine and pyrimidine nucleotides. J Immunol. 2003;170(10):4986-95.

14. Kawate H, Itoh R, Sakumi K, et al. A defect in a single allele of the Mlh1 gene causes dissociation of the killing and tumorigenic actions of an alkylating carcinogen in methyltransferase-deficient mice. Carcinogenesis. 2000;21(2):301-5.
15. Marra G, D'Atri S, Corti C, et al. Tolerance of human MSH2+/- lymphoblastoid cells to the methylating agent temozolomide. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(13):7164-9.

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

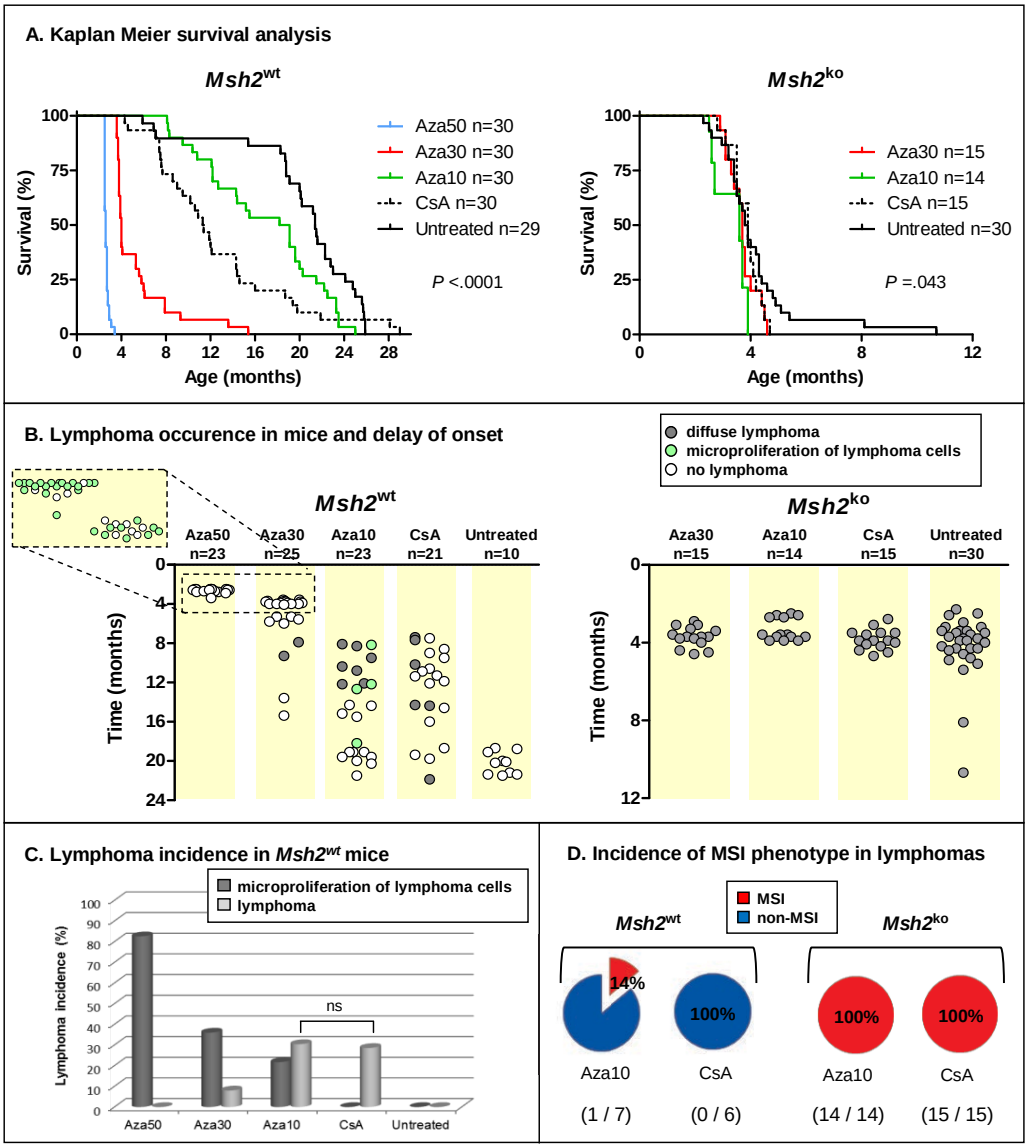


Figure 1: **Effect of immunosuppressive treatment on survival, lymphoma incidence and MSI tumor phenotype in *Msh2*^{wt} and *Msh2*^{ko} mice**. **A)** Evidence for a dose-response relationship between azathioprine treatment and the survival of *Msh2*^{wt} mice: Kaplan–Meier survival analysis of untreated, azathioprine- and ciclosporin A-treated *Msh2*^{wt} and *Msh2*^{ko} mice. Aza10=azathioprine 10mg/L; Aza30=azathioprine 30mg/L; Aza50= azathioprine 50mg/L; CsA=ciclosporin A 300mg/L. All P values are two-sided. Log-rank test. **B)** Lymphoma occurrence and delay of onset in the different mice cohorts according to *Msh2*^{wt} or *Msh2*^{ko} genotype. Animals that displayed signs of poor health were sacrificed and autopsied. The presence of lymphoma cells was evaluated using histopathological analysis. **C)** Lymphoma incidence in *Msh2*^{wt} mice. Fisher's exact test; ns=not significant. **D)** Incidence of MSI phenotype in lymphomas under conditions of Aza and CsA treatment that significantly induced iatrogenic lymphomas in *Msh2*^{wt} mice.

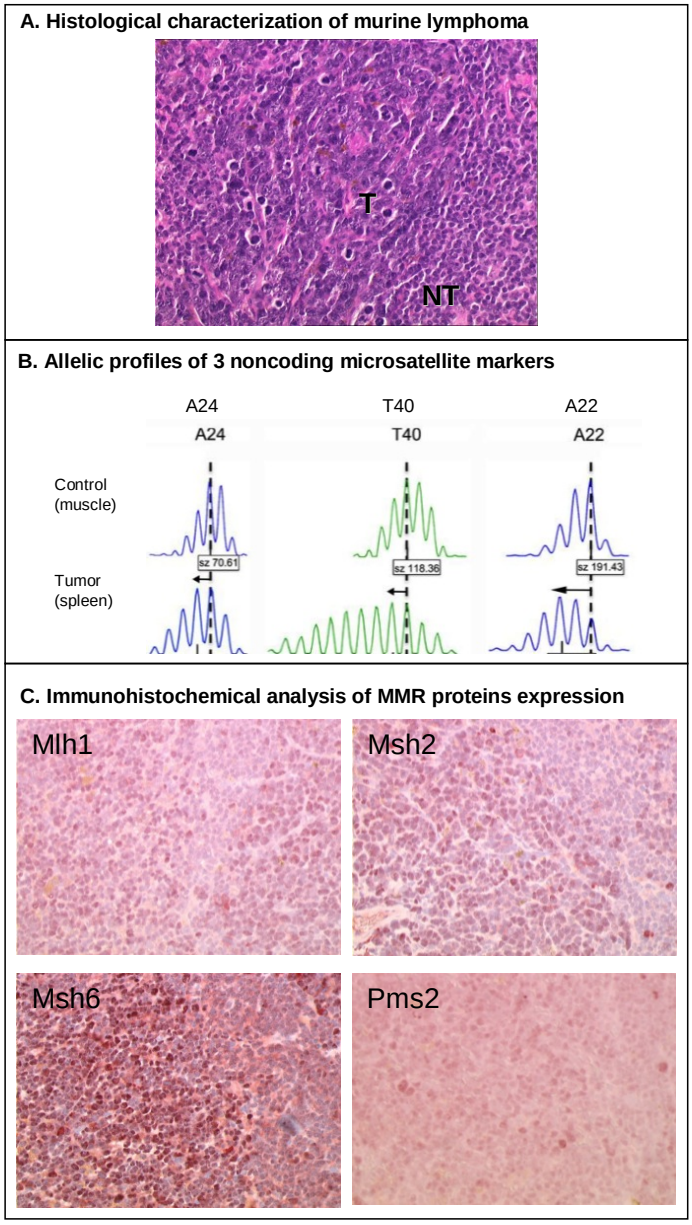


Figure 2: Characterization of the MSI lymphoma syndrome arising in Aza10-treated *Msh2*^{wt} mouse. A) Histological characterization showing hematoxylin–eosin staining of splenic lymphoma. T indicates tumor cells; NT indicates normal lymphocytes. **B)** Allelic profiles of the three noncoding microsatellite markers (A24, T40 and A22) displaying shorter alleles (arrows) for the three markers in tumor (spleen) compared to control (muscle) tissue. Dashed vertical lines indicate the predominant allele size observed in control DNA. Allele length (bp) is indicated in the box below each profile. **C)** Immunohistochemistry of spleen tissue sections. Tumor cells stained positively. Normal lymphocytes showed less pronounced staining of MMR proteins due to their lower proliferative rate.

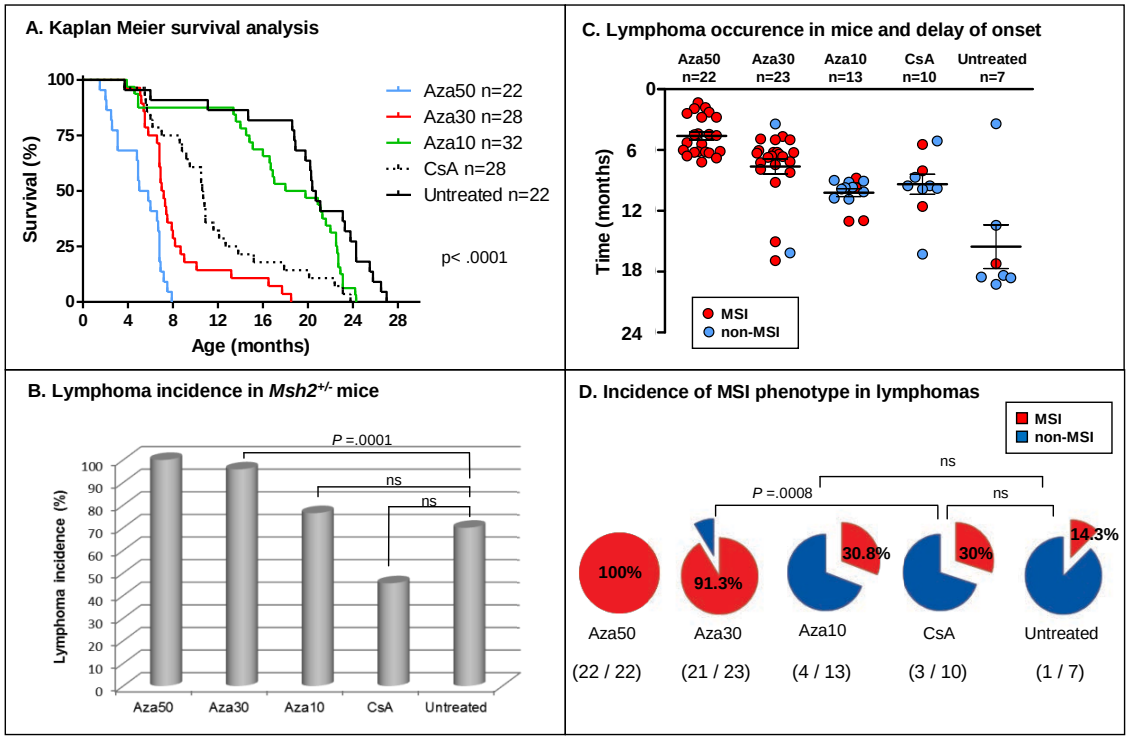
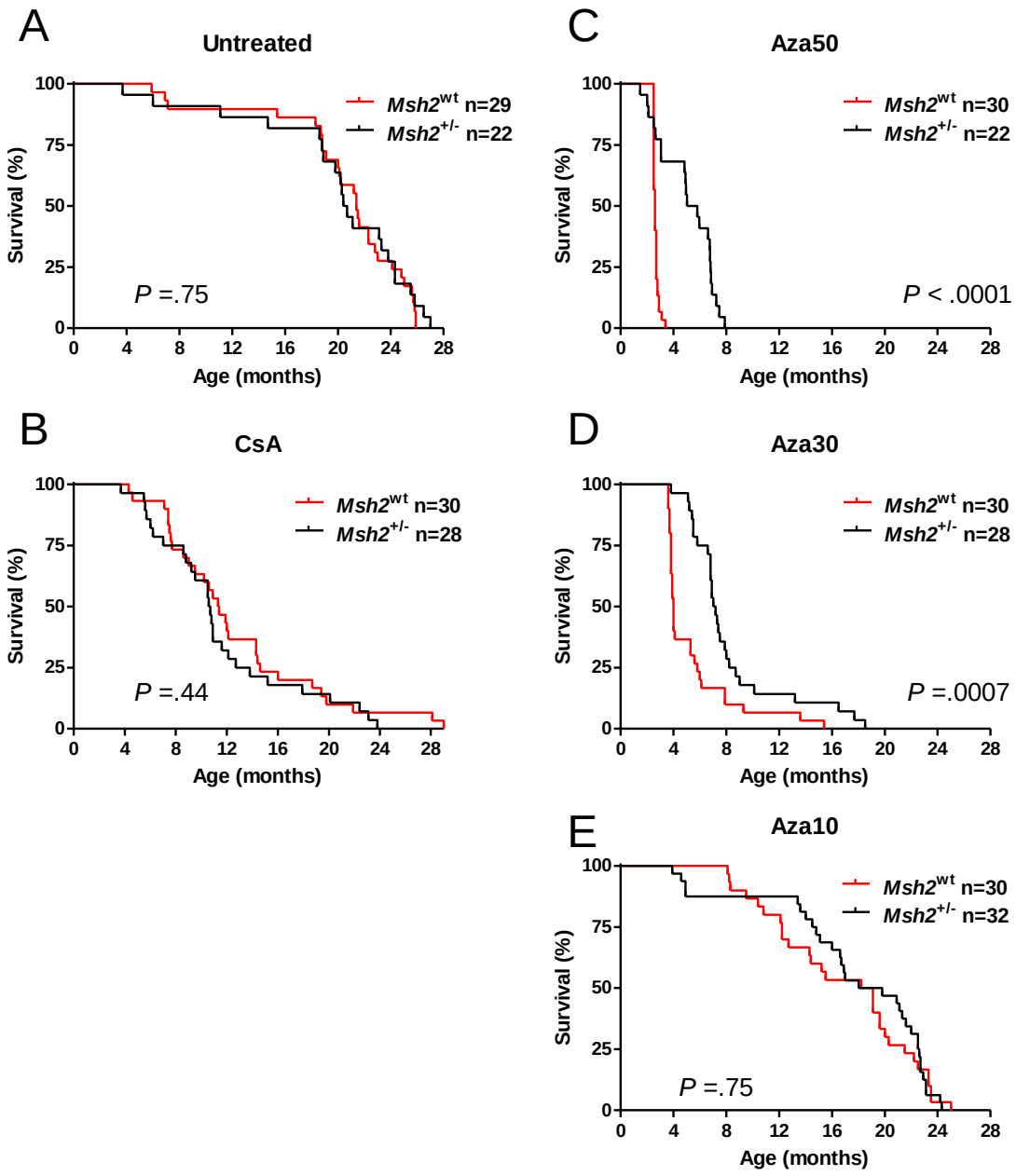
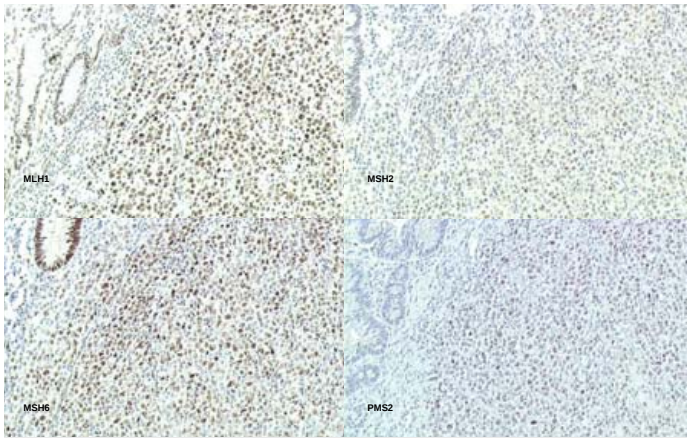


Figure 3: **Effect of immunosuppressive treatment on survival, lymphoma incidence and MSI tumor phenotype in *Msh2*$^{+/-}$ mice**. **A)** Evidence for a dose-response relationship between azathioprine treatment and the survival of *Msh2*$^{+/-}$ mice: Kaplan–Meier survival analysis of untreated, Aza- and CsA-treated *Msh2*$^{+/-}$ mice. Aza10=azathioprine 10mg/L; Aza30=azathioprine 30mg/L; Aza50=azathioprine 50mg/L; CsA=ciclosporin A 300mg/L. Survival curves for *Msh2*$^{+/-}$ mice after Aza50 treatment are from our previous study (11). All P values are two-sided. Log-rank test. **B)** Lymphoma incidence in mice. Fisher's exact test; ns=not significant. **C)** Lymphoma occurrence and delay of onset. **D)** Incidence of MSI phenotype in lymphomas. Fisher's exact test; ns=not significant.



Supplementary Figure S1. Effect of *Msh2*$^{+/-}$ and *Msh2*^{wt} genotypes on mouse survival (Kaplan-Meier analysis) according to treatment. As expected, no difference in survival was observed between untreated *Msh2*$^{+/-}$ and *Msh2*^{wt} mice **(A)**, consistent with the normal lifespan previously reported for *Msh2*$^{+/-}$ mice. Similarly, no survival difference was apparent between CsA-treated *Msh2*$^{+/-}$ and *Msh2*^{wt} mice **(B)** since the mode of action of CsA is unrelated to the MMR system. After Aza50 **(C)** or Aza30 **(D)** treatment, *Msh2*^{wt} mice showed significantly shorter survival than *Msh2*$^{+/-}$ mice. This was not seen at the lowest Aza dosage **(E)**, however, suggesting that Aza10 treatment allowed escape from toxicity in *Msh2*^{wt} mice. Aza10=azathioprine 10mg/L; Aza30=azathioprine 30mg/L; Aza50=azathioprine 50mg/L; CsA=ciclosporin A 300mg/L. All P values are two-sided. Log-rank test.



Supplementary Figure S2. Immunohistochemical analysis of MMR protein expression in tumor cells from a patient with inflammatory bowel disease that developed an iatrogenic lymphoproliferative disorder with an MSI phenotype. No loss of MMR protein expression was observed. The tumor was not EBV-driven and occurred in a patient treated by imurel (see **Supplementary Table S2**).

Supplementary Table S1. Microsatellite analysis in tumor samples from *Msh2*^{wt}, *Msh2*^{ko} and *Msh2*$^{+/-}$ mice.

Msh2^{wt} mice	Treatment	Tumor location	Change in allele size (bp) A22	A24	T40	Microsatellite status
110	CsA	spleen	0	0	0	non-MSI
164	CsA	spleen	0	0	0	non-MSI
		thymus	0	0	0	
		lymph node 1	0	0	0	
		lymph node 2	0	0	0	
182	CsA	spleen	0	0	0	non-MSI
		thymus	0	0	0	
		lymph node 1	0	0	0	
		lymph node 2	0	0	0	
183	CsA	thymus	0	0	0	non-MSI
190	CsA	spleen	0	0	0	non-MSI
		lymph node	0	0	0	
246	CsA	spleen	0	0	0	non-MSI
		thymus	0	0	0	
		lymph node 1	0	0	0	
B12	Aza30	spleen	0	0	0	non-MSI
B17	Aza30	spleen	0	0	0	non-MSI
C1	Aza10	spleen	0	0	0	non-MSI
		thymus	0	0	0	
C2	Aza10	spleen	0	0	0	non-MSI
		thymus	0	0	0	
C9	Aza10	spleen	0	0	0	non-MSI
		thymus	0	0	0	
C12	Aza10	spleen	0	0	0	non-MSI
		thymus	0	0	0	
C13	Aza10	liver	0	0	0	MSI
		spleen	-2	-1	-3	
		thymus	0	0	0	
		lymph node 1	0	0	0	
		lymph node 2	0	0	0	
C24	Aza10	spleen	0	0	0	non-MSI
		thymus	0	0	0	
C29	Aza10	spleen	0	0	0	non-MSI
		thymus	0	0	0	
Msh2^{ko} mice	Treatment	Tumor location	Change in allele size (bp) A22	A24	T40	Microsatellite status
104	Untreated	spleen	0	0	-1	MSI
		lymph node	-2	0	-5	
105	Untreated	spleen	-1	-1	0	MSI
		thymus	-1	-1	-3	
107	Untreated	spleen	-2	0	-2	MSI
		thymus	-2	0	-2	
118	Untreated	spleen	0	-1	-2	MSI
		thymus	0	-1	-2	
133	Untreated	spleen	-1	-1	-3	MSI
		thymus	0	0	0	
143	Untreated	spleen	0	-1	-1	MSI
		lymph node	0	0	-2	
144	Untreated	spleen	-2	-1	-3	MSI
		thymus	-3	-2	-3	
82	CsA	spleen	0	0	0	MSI
		thymus	-1	0	0	
84	CsA	spleen	-2	-1	-6	MSI
		thymus	-2	-1	-6	
85	CsA	spleen	0	0	0	MSI

		thymus	-2	-2	-1	
90	CsA	spleen	0	-1	0	MSI
		thymus	-3	0	0	
96	CsA	spleen	-1	-1	-2	MSI
97	CsA	spleen	0	0	-1	MSI
		thymus	0	0	-1	
100	CsA	spleen	-1	0	-1	MSI
		thymus	-1	0	0	
111	CsA	spleen	0	0	-2	MSI
		thymus	0	-1	-2	
115	CsA	spleen	0	-1	-3	MSI
		thymus	-2	0	-2	
119	CsA	spleen	-1	-1	-2	MSI
		thymus	0	0	-1	
120	CsA	spleen	0	-2	-3	MSI
		thymus	-1	-2	-3	
122	CsA	spleen	0	0	-1	MSI
		thymus	0	-1	-2	
126	CsA	spleen	0	0	-2	MSI
		thymus	0	0	+1	
130	CsA	spleen	-1	-1	-2	MSI
		thymus	-1	-1	-1	
132	CsA	spleen	0	0	-1	MSI
		thymus	0	0	-3	
376	Aza30	spleen	-1	-1	-1	MSI
		thymus	-1	-1	-2	
381	Aza30	spleen	-2	-1	-1	MSI
		thymus	0	0	0	
391	Aza30	spleen	-2	0	0	MSI
		thymus	0	0	-1	
392	Aza30	spleen	-1	-1	-2	MSI
		thymus	0	0	0	
395	Aza30	spleen	0	0	-1	MSI
		thymus	0	0	-1	
399	Aza30	spleen	-1	-1	-2	MSI
		thymus	0	0	0	
407	Aza30	spleen	-1	-1	-4	MSI
		thymus	0	0	-1	
408	Aza30	spleen	-1	0	-3	MSI
		thymus	-1	0	-3	
417	Aza30	spleen	0	0	-1	MSI
		thymus	0	+1	0	
424	Aza30	spleen	0	-1	-2	MSI
		thymus	0	0	0	
426	Aza30	spleen	0	-1	-2	MSI
		thymus	0	0	-1	
427	Aza30	spleen	-2	-1	-4	MSI
		thymus	0	0	0	
428	Aza30	spleen	-1	-1	-3	MSI
		thymus	-1	-1	-2	
445	Aza30	spleen	0	-2	-2	MSI
		thymus	0	0	0	
450	Aza30	spleen	-1	-1	-1	MSI
		thymus	0	0	0	
491	Aza10	spleen	-1	0	-2	MSI
		thymus	0	0	0	
494	Aza10	spleen	-1	-1	0	MSI
		thymus	-1	0	0	
498	Aza10	spleen	0	0	-1	MSI
		thymus	0	0	0	

499	Aza10	spleen	0	-1	-1	MSI	
		thymus	-1	-1	-2		
512	Aza10	spleen	-1	-1	0	MSI	
		thymus	-1	-2	-4		
521	Aza10	spleen	0	-1	-2	MSI	
		thymus	0	0	0		
522	Aza10	spleen	-1	-1	-5	MSI	
		lymph node	-1	-1	-5		
534	Aza10	spleen	-1	-1	-3	MSI	
		thymus	0	0	0		
538	Aza10	spleen	0	0	-1	MSI	
		thymus	-1	0	-2		
540	Aza10	spleen	0	-1	-7	MSI	
		thymus	0	0	0		
545	Aza10	spleen	0	0	0	MSI	
		thymus	-1	-1	-2		
557	Aza10	spleen	0	0	-1	MSI	
		thymus	0	0	0		
562	Aza10	spleen	0	0	0	MSI	
		thymus	-2	-1	-2		
564	Aza10	spleen	-1	-2	0	MSI	
		thymus	-1	-1	-3		

Msh2$^{+/-}$ mice	Treatment	Tumor location	Change A22	in allele A24	size (bp) T40	Microsatellite status	LOH
267	Untreated	spleen	0	0	0	non-MSI	NA
		thymus	0	0	0		
		lymph node	0	0	0		
272	Untreated	liver	0	0	0	non-MSI	NA
		spleen	0	0	0		
279	Untreated	spleen	0	0	-1	MSI	ND
		thymus	0	0	0		
282	Untreated	spleen	0	0	0	non-MSI	NA
287	Untreated	liver	0	0	0	non-MSI	NA
		spleen	0	0	0		
		thymus	0	0	0		
360	Untreated	liver	0	0	0	non-MSI	NA
		spleen	0	0	0		
		thymus	0	0	0		
364	Untreated	liver	0	0	0	non-MSI	NA
		spleen	0	0	0		
89	CsA	spleen	0	0	0	non-MSI	NA
		thymus	0	0	0		
		lymph node 1	0	0	0		
		lymph node 2	0	0	0		
91	CsA	spleen	0	0	0	non-MSI	NA
		thymus	0	0	0		
		lymph node 1	0	0	0		
		lymph node 2	0	0	0		
92	CsA	spleen	0	0	0	non-MSI	NA
		thymus	0	0	0		
		lymph node 1	0	0	0		
		lymph node 2	0	0	0		
93	CsA	spleen	0	0	0	non-MSI	NA
		lymph node	0	0	0		
106	CsA	spleen	0	0	0	non-MSI	NA
		lymph node	0	0	0		
116	CsA	spleen	-1	-1	-1	MSI	yes
		thymus	-1	-1	-2		
123	CsA	spleen	0	0	0	non-MSI	NA
138	CsA	liver	0	0	0	non-MSI	NA

		spleen	0	0	0		
140	CsA	spleen	-1	-1	-1	MSI	no
		lymph node 1	-1	0	0		
		lymph node 2	-1	0	0		
142	CsA	thymus	-1	0	0	MSI	no
145	Aza30	liver	-3	0	0	MSI	yes
		spleen	-2	0	-1		
146	Aza30	liver	-4	-1	-5	MSI	yes
		spleen	-3	-1	-3		
147	Aza30	liver	-1	-1	-2	MSI	no
		spleen	-1	-1	-2		
150	Aza30	lymph node	0	0	0	non-MSI	NA
151	Aza30	spleen	-1	-1	-3	MSI	yes
152	Aza30	liver	-2	0	0	MSI	yes
		spleen	-3	0	-2		
156	Aza30	liver	-1	-1	-3	MSI	yes
		spleen	-1	-1	-3		
		thymus	-1	-1	-1		
159	Aza30	thymus	0	0	-3	MSI	yes
162	Aza30	thymus	0	0	-3	MSI	yes
166	Aza30	liver	-2	0	-5	MSI	yes
		spleen	-1	0	-1		
168	Aza30	liver	0	0	0	MSI	no
		spleen	0	0	0		
170	Aza30	liver	0	0	-1	MSI	yes
		spleen	-2	0	-2		
		thymus	-1	0	-2		
171	Aza30	liver	0	0	-1	MSI	yes
		spleen	-1	-1	-5		
173	Aza30	spleen	-1	-1	-3	MSI	yes
176	Aza30	liver	-4	-3	-6	MSI	yes
		spleen	-2	-2	-6		
		thymus	-3	-1	0		
178	Aza30	liver	0	-3	-3	MSI	yes
		spleen	0	-2	-2		
		thymus	-3	-1	0		
186	Aza30	liver	-2	-3	0	MSI	yes
		spleen	-2	-1	-7		
		thymus	-2	-3	-4		
188	Aza30	spleen	-2	-3	-2	MSI	yes
191	Aza30	spleen	-1	0	-2	MSI	yes
193	Aza30	spleen	0	0	-1	MSI	yes
194	Aza30	liver	-1	0	-3	MSI	yes
		spleen	-1	0	-1		
		thymus	-1	0	-6		
197	Aza30	spleen	0	-1	0	non-MSI	NA
200	Aza30	liver	-2	0	-4	MSI	yes
		spleen	-2	0	-5		
		lymph node	-1	0	-2		
293	Aza10	lymph node	-3	0	-6	MSI	yes
300	Aza10	spleen	0	0	0	non-MSI	NA
		lymph node	0	0	0		
303	Aza10	liver	0	0	0	non-MSI	NA
		spleen	0	0	0		
		lymph node	0	0	0		
306	Aza10	liver	0	0	0	non-MSI	NA
		spleen	0	0	0		
		thymus	0	0	0		
		lymph node	0	0	0		

323	Aza10	lymph node	0	0	0	non-MSI	NA
324	Aza10	spleen	0	0	0	non-MSI	NA
325	Aza10	spleen	0	0	0	MSI	yes
		lymph node	-1	-1	-2		
329	Aza10	liver	0	0	0	non-MSI	NA
		spleen	0	0	0		
		thymus	0	0	0		
338	Aza10	spleen	0	0	0	non-MSI	NA
359	Aza10	spleen	0	0	0	non-MSI	NA
		thymus	0	0	0		
362	Aza10	spleen	0	0	0	non-MSI	NA
		lymph node	0	0	0		
433	Aza10	spleen	0	0	-1	MSI	no
435	Aza10	spleen	0	-1	-3	MSI	yes

Supplementary Table S1. Microsatellite analysis in tumor samples from *Msh2*^{wt}, *Msh2*^{ko} and *Msh2*$^{+/-}$ mice. MSI, microsatellite instability; LOH, loss of heterozygosity; Aza10=azathioprine 10mg/L; Aza30=azathioprine 30mg/L; Aza50=azathioprine 50mg/L; CsA=ciclosporin A 300mg/L; NA, not applicable; ND, not done.

Sex	IBD	Age	Extra nodal localization	Type	EBV status	Expression of the 4 MMR proteins	Microsatellite status	Imurel treatment
M	CD	68	-	FL	ND	+	non-MSI	-
M	UC	62	-	FL	-	+	non-MSI	-
F	IC	76	Skin	DLBCL	-	+	NE	-
M	CD	56	-	FL	+	+	NE	+
M	CD	54	GI	FL	-	+	non-MSI	-
F	UC	75	-	DLBCL	ND	+	NE	-
F	CD	37	GI	DLBCL	+	+	non-MSI	+
F	CD	54	-	p-LPD B	+	+	non-MSI	+
M	CD	20	GI	DLBCL	+	+	NE	+
M	CD	56	GI	DLBCL	-	+	**MSI**	+
F	CD	79	GI	DLBCL	-	+	non-MSI	+
M	CD	52	Liver	HD-like LPD B	+	+	non-MSI	+
M	CD	45	Bone marrow	NHL B (MCL?)	ND	+	NE	+

Supplementary Table S2. Clinical and biological data associated with lymphoproliferative disorders in inflammatory bowel disease. IBD, inflammatory bowel disease; CD, Crohn disease; UC, ulcerative colitis; IC, indeterminate colitis; +, present; -, absent; ND, not done; NE; not evaluable; GI, gastrointestinal; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; FL, follicular lymphoma; p-LPD B, polymorphous lymphoproliferative disorder B; MCL, Mantle cell lymphoma; NHL B, non-Hodgkin B-cell lymphoma; HD-like LPD B, Hodgkin disease-like lymphoproliferative disorder B; EBV, Epstein Barr virus; MSI, microsatellite instable.

SUPPLEMENTARY MATERIAL AND METHODS

Mice and treatments. $Msh2^{+/-}$ mice (1) were intercrossed to obtain mice that were null, heterozygous, or wild type for the Msh2 gene. Mice genotypes were determined by PCR analysis (2). Azathioprine (Aza) was given orally via the drinking water using Imurel 50 mg (GlaxoSmithKline, Marly-le-Roi, France) to prepare a 50 mg/L, 30 mg/L or 10 mg/L drinking water solution (further referred to as Aza50, Aza30 and Aza10 treatment). Food and drinking were ad libitum. The estimated dose of azathioprine in the Aza 50mg/L solution was 6-20 mg/kg body weight per day, given that a mouse weighs approximately 20-30 g and drinks approximately 4-8 mL of water per day. This dosage corresponds to a human dose equivalent of 0.5-1.6 mg/kg body weight per day (3), which lies within the therapeutic range (4, 5). Groups of mice received Aza10 (14 $Msh2^{ko}$, 32 $Msh2^{+/-}$ and 30 $Msh2^{wt}$) or Aza30 (15 $Msh2^{ko}$, 28 $Msh2^{+/-}$ and 30 $Msh2^{wt}$) and a group of 30 $Msh2^{wt}$mice also received Aza50. Control mice (30 $Msh2^{ko}$, 22 $Msh2^{+/-}$ and 29 $Msh2^{wt}$ mice) received only water to drink. Another group of mice (15 $Msh2^{ko}$, 28 $Msh2^{+/-}$ and 30 $Msh2^{wt}$ mice) received drinking water that contained 300mg/L ciclosporin A (CsA) (Neoral 100mg/mL, Novartis Pharma SAS, Rueil-Malmaison, France). The consumption of CsA solution was compared to that of water in untreated mice. Although lower at the beginning of treatment, it progressively increased to reach that of control mice after 3 months of treatment. Using the same method of calculation as above, the estimated dose of CsA was 80-120 mg/kg body weight per day i.e. a human dose equivalent of 6.48-9.72 mg/kg body weight per day, which corresponds to the upper limit of the maintenance treatment administered to human transplant patients (i.e. 2 to 6 mg/kg according to Novartis recommendations). Health was monitored daily and animals that displayed signs of poor health, including breath insufficiency and posterior leg paralysis were sacrificed by cervical dislocation. Since lymphomas of late onset were related to the propensity of untreated $Msh2^{wt}$ mice on FVB background to develop lymphomas of late occurrence, analysis of these lymphomas was not continued beyond 22 months.

Immunohistochemical study. Immunohistochemical staining for Mlh1, Msh2, Msh6 and Pms2 proteins was performed in lymphoma cells from the single $Msh2^{wt}$ mouse that displayed an MSI lymphoma following Aza treatment. Briefly, 4 μm sections were incubated with monoclonal antibodies against MLH1 (1/25 dilution, clone G168-728, Pharmingen, San Diego, CA), MSH2

(1/25 dilution, clone FE11, Calbiochem, Oncogene Research Products, Cambridge, MA), MSH6 (1/25 dilution, clone 44, Becton Dickinson, Lexington, NC) and PMS2 (1/20 dilution, clone A16-4, BD PharMingen, Le Pont de Claix, France).

Loss of heterozygosity (LOH) analysis. Normal (muscle) and tumor DNA were extracted for Msh2 genotype analysis (DNA extraction kit Qiagen, Courtaboeuf, France). PCR products were resolved on agarose gels to assess loss of heterozygosity of the Msh2 allele (6).

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

Msh2 gene sequencing. Total RNA from the single Aza-treated $Msh2^{wt}$ that displayed an MSI lymphoma tissue sample (two tumor sites and the corresponding normal tissue) was analyzed. Reverse transcription–PCR and sequencing were performed as previously reported (6), except that electrophoresis was performed for each amplified fragment and this was extracted specifically with a Gel Extraction Kit (Qiagen, Redwood City, USA). A second amplification was performed on these fragments according to the same PCR protocol in order to magnify the sequence signal and reduce noise.

Characterization of lymphoproliferative disorders (LPD) in patients with inflammatory bowel disease (IBD). A total of 19,486 patients were enrolled in the CESAME cohort, a French nationwide prospective observational cohort spanning May 2004 to June 2005 to assess the risk of LPD in patients with IBD treated with thiopurines (7). MSI status was evaluated in 13 cases of LPD from paraffin material using a fluorescent multiplex system comprising 5 quasimonomorphic mononucleotide repeats (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 and NR-27) (8) and expression of MMR proteins was evaluated by immunohistochemistry (9). LPD were classified according to the WHO classification 2001 and tested for Epstein Barr virus by immunohistochemistry or in situ hybridization.

SUPPLEMENTARY REFERENCES

1. de Wind N, Dekker M, Berns A, Radman M, te Riele H. Inactivation of the mouse Msh2 gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer. Cell. 1995;82(2):321-30.
2. Toft NJ, Winton DJ, Kelly J, et al. Msh2 status modulates both apoptosis and mutation frequency in the murine small intestine. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(7):3911-5.
3. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. Faseb J. 2008;22(3):659-61.
4. Yip JS, Woodward M, Abreu MT, Sparrow MP. How are Azathioprine and 6-mercaptopurine dosed by gastroenterologists? Results of a survey of clinical practice. Inflamm Bowel Dis. 2008;14(4):514-8.
5. Opelz G, Dohler B. Critical threshold of azathioprine dosage for maintenance immunosuppression in kidney graft recipients. Collaborative Transplant Study. Transplantation. 2000;69(5):818-21.
6. Chalastanis A, Penard-Lacronique V, Svrcek M, et al. Azathioprine-induced carcinogenesis in mice according to Msh2 genotype. J Natl Cancer Inst. 2010;102(22):1731-40.
7. Beaugerie L, Brousse N, Bouvier AM, et al. Lymphoproliferative disorders in patients receiving thiopurines for inflammatory bowel disease: a prospective observational cohort study. Lancet. 2009;374(9701):1617-25.
8. Suraweera N, Duval A, Reperant M, et al. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. Gastroenterology. 2002;123(6):1804-11.
9. Borie C, Colas C, Dartigues P, et al. The mechanisms underlying MMR deficiency in immunodeficiency-related non-Hodgkin lymphomas are different from those in other sporadic microsatellite instable neoplasms. Int J Cancer. 2009;125(10):2360-6.

Article 2

« Diagnosis of constitutional mismatch repair-deficiency syndrome by functional screening of blood lymphocytes »

Sahra Bodo*, Chrystelle Colas*, Olivier Buhard*, Ada Collura, Julie Tinat, Noémie Lavoine, Agathe Guilloux, Alexandra Chalastanis, Philippe Lafitte, Florence Coulet, Marie-Pierre Buisine, Denisa Ilencikova, Clara Ruiz Ponte, Miriam Kinzel, Sophie Grandjouan, Hilde Brems, Sophie Lejeune, Hélène Blanché, Qing Wang, Olivier Caron, Magali Svrcek, Dominique Vidaud, Béatrice Parfait, Alain Verloes, Ulrich J Knappe, Florent Soubrier, Isabelle Mortemousque, Alexander Leis, Jessie Auclair-Perrossier, Thierry Frébourg, Jean-François Fléjou, Natacha Entz-Werle, David Malka, Odile Cohen Haguenauer, Yael Goldberg, Anne Marie Gerdes, Faten Fedhila, Michèle Mathieu, Richard Hamelin, Badre Wafaa, Marie Gauthier-Villars, Eammon Sheridan, Hans Vasen, Laurence Brugières, Katharina Wimmer, Martine Muleris*, Alex Duval*, on behalf of the European Consortium Care for CMMRD (C4CMMRD)

* authors contributed equally to this work

En préparation

Diagnostic du syndrome CMMRD: une nouvelle approche exploitant les caractéristiques fonctionnelles des cellules MMR déficientes

Introduction

Les patients porteurs de mutations germinales biallélicques d'un gène MMR présentent un syndrome de prédisposition majeure au cancer, appelé CMMRD. Ce syndrome rare (146 patients décrits issus de 91 familles) est aujourd'hui sous-diagnostiqué notamment en raison de sa présentation clinique très variable d'un patient à l'autre (survenue de lymphomes, leucémies, tumeurs cérébrales et/ou colorectales, … chez l'enfant ou le jeune adulte). De ce fait, il est généralement suspecté tardivement, suite à l'émergence d'une ou plusieurs tumeurs chez le patient ou dans sa fratrie, et après exclusion d'autres syndromes (neurofibromatose de type 1, Li Fraumeni, polypose adénomateuse familiale, …). La technique diagnostique actuelle repose sur l'analyse génétique constitutionnelle, qui comprend le séquençage des régions exoniques et la recherche de réarrangements de grande taille dans les 4 principaux gènes MMR (*PMS2, MSH6, MSH2* et *MLH1*). Cette approche est longue et coûteuse, de ce fait, l'analyse génétique constitutionnelle n'est proposée que sur critères très restrictifs. A l'avenir, des améliorations techniques significatives telles que l'utilisation généralisée du séquençage de nouvelle génération (NGS, *next generation sequencing*) devrait permettre à un plus grand nombre de patients d'en profiter. Néanmoins, l'analyse génétique constitutionnelle du gène *PMS2*, gène MMR principalement impliqué dans ce syndrome, reste une technique dont la sensibilité n'est pas de 100% car compliquée par la présence de 15 pseudogènes de *PMS2*. Par ailleurs, l'analyse des gènes MMR s'avère non contributive dans 30% des cas, lorsqu'un variant de signification biologique inconnue (VSI) est décrit.

Notre objectif a été de mettre au point une approche fonctionnelle d'aide au diagnostic du syndrome CMMRD. Notre hypothèse de travail est que les caractéristiques fonctionnelles telles que le phénotype MSI et une tolérance à certains agents génotoxiques (agents méthylants et thiopurines) décrites dans les cellules tumorales MMR déficientes pourraient être détectées

dans le tissu sain des patients CMMRD, notamment les lymphocytes immortalisés par EBV (LCL, *lymphoblastoids cell lines*).

Résultats

Dans une étude preuve de concept, nous avons tout d'abord mis au point les conditions expérimentales permettant de montrer que les deux caractéristiques fonctionnelles étudiées, la tolérance au MNNG (agent méthylant) et la mise en évidence d'un phénotype MSI *ex vivo* appelé *ev*MSI (acquis par les LCL au cours du temps, mais non retrouvé dans les lymphocytes primaires) sont observées dans les LCL issues de 3 patients porteurs de mutations délétères germinales bilalléliques *PMS2*, *MSH6* ou *MLH1*, mais pas dans 5 LCL issues de patients contrôles. Puis, nous avons mené une étude cas témoins dans 14 LCL issues de patients CMMRD avérés compré à une grande série de LCL MMR-proficients. Cette étape nous a permis de nous assurer de la robustesse de cette approche fonctionnelle montrant une sensibilité de 100% (14/14) et une spécificité de 100% (23/23) pour le test evMSI et une sensibilité de 100% (14/14) et une spécificité de 98% (51/52) pour le test de tolérance au MNNG, avec 96,4% (54/56) de concordance entre les deux tests fonctionnels. Dans une troisième étape, nous avons testé 23 patients considérés comme étant à risque pour le syndrome CMMRD sur la base de critères cliniques, mais pour lesquel le diagnostic n'a pas pu être confirmé d'un point de vue moléculaire. Ce groupe comprend des patients avec des VSI (n=8), et des patients avec une seule (n=5) ou aucune (n=10) mutation délétère MMR identifiée. Nos tests nous ont permis de discriminer ces patients en deux catégories: les patients (n=6) avec un diagnostic CMMRD fortement probable (résultats aberrants aux deux tests fonctionnels) et les patients (n=15) pour qui le diagnostic CMMRD est fortement improbable (résultats normaux aux deux tests fonctionnels). Le diagnostic reste douteux pour deux patients qui présentent des résultats contradictoires aux tests fonctionnels.

Parallèlement, j'ai évalué une autre technique publiée pendant la mise au point de nos tests fonctionnels, et qui repose sur la détection d'un phénotype MSI dans le tissu sain des patients CMMRD (ADN germinal issu des lymphocytes primaires) en utilisant trois marqueurs microsatellitaires dinucléotiditiques permettant de déterminer un ratio nommé gMSI pour *germinal microsatellite instability* (Ingham et al, 2013). Dans notre série, le test gMSI s'avère non

contributif dans 16,5% (3/18 (16,7%) CMMRD avérés, 3/20 Lynch (15%) et 39/220 (17,7%) contrôles). Par ailleurs, ce test ne permet pas de détecter les patients porteurs de mutations bilalléliques *MSH6* et, nous avons observé un faux négatif (test gMSI normal pour un patient porteur d'altérations bilalléliques *PMS2*, et pour lequel d'autres éléments biologiques sont en faveur d'un syndrome CMMRD). Globalement, l'analyse génétique constitutionnelle a montré 67% de sensibilité et 99% de spécificité, alors que le test de tolérance à la méthylation est sensible à 95% et spécifique à 97%. Lorsque ce dernier est combiné à un autre test (*ev*MSI ou gMSI), la sensibilité est de 94% et la spécificité augmente jusqu'à 99%.

Conclusion

Les deux tests fonctionnels que nous avons mis au point sur les LCL, *ev*MSI et la tolérance à la méthylation, sont des outils à la fois sensibles et spécifiques qui peuvent contribuer à exclure ou confirmer le diagnostic du syndrome CMMRD, notamment dans les cas pour lesquels l'analyse génétique constitutionnelle est non contributive (VSI).

Diagnosis of constitutional mismatch repair-deficiency syndrome by functional screening of blood lymphocytes

Sahra Bodo*, Chrystelle Colas*, Olivier Buhard*, Ada Collura, Julie Tinat, Noémie Lavoine, Agathe Guilloux, Alexandra Chalastanis, Philippe Lafitte, Florence Coulet, Marie-Pierre Buisine, Denisa Ilencikova, Clara Ruiz Ponte, Miriam Kinzel, Sophie Grandjouan, Hilde Brems, Sophie Lejeune, Hélène Blanché, Qing Wang, Olivier Caron, Magali Svrcek, Dominique Vidaud, Béatrice Parfait, Alain Verloes, Ulrich J Knappe, Florent Soubrier, Isabelle Mortemousque, Alexander Leis, Jessie Auclair-Perrossier, Thierry Frébourg, Jean-François Fléjou, Natacha Entz-Werle, David Malka, Odile Cohen Haguenauer, Yael Goldberg, Anne Marie Gerdes, Faten Fedhila, Michèle Mathieu, Richard Hamelin, Badre Wafaa, Marie Gauthier-Villars, Eammon Sheridan, Hans Vasen, Laurence Brugières, Katharina Wimmer, Martine Muleris*, Alex Duval*, on behalf of the European Consortium "Care for CMMRD" (C4CMMRD)

* equal contribution

Abbreviations used in this paper : CMMRD, constitutional mismatch repair-deficiency ; *ev*-MSI, *ex vivo* microsatellite instability ; FAP, familial adenomatous polyposis ; LCL ; lymphoblastoid cell line ; MMR, mismatch repair ; MNNG, N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine ; MSI, microsatellite instability ; NF1, neurofibromatosis type 1 ; PBLs ; peripheral blood lymphocytes ; UV, variant of unknown significance ; 6-TG ; 6-Thioguanine.

Conflict of interest: the authors have declared that no conflict of interest exists

ABSTRACT

BACKGROUND & AIMS: Biallelic inheritance of mismatch repair (MMR) gene mutations causes the under-diagnosed childhood tumor syndrome called constitutional MMR-deficiency (CMMRD). The reference standard for CMMRD diagnosis involves extensive mutational screening of MMR genes, a method that is not 100% sensitive and is non-contributory in 30% of patients. Since MMR-deficiency is associated with microsatellite instability (MSI) and increased tolerance to methylating/thiopurine agents, we determined whether these phenotypic features could be used in a functional test using lymphoblastoid cells in order to improve CMMRD diagnosis. **METHODS:** We first determined experimental conditions that specifically allowed detection of *ex vivo* MSI (*ev*MSI) and drug tolerance in lymphoblastoid cell lines (LCLs) from three proven CMMRD patients. Then, we collected a larger number of definite CMMRD patients and patients suspected of this condition on the basis of evocative clinical criteria. Results of functional tests and of a recently rapported gMSI (germline MSI) assay were compared with those of genetic analysis. **RESULTS:** Both *ev*MSI and methylation tolerance were observed in all 14 patients with pathogenic biallelic *PMS2, MSH6* or *MLH1* defects, but not in 23/23 and 51/52 MMR-proficient LCLs analyzed for these features, respectively. In another 23 patients suspected of CMMRD, including patients with variants of unknown significance (n=8), with a single (n=5) or no (n=10) MMR alterations, diagnosis was not confirmed at the molecular level. Our methods allowed discriminate two main subsets: patients (n=6) with a highly probable CMMRD diagnosis (with two abnormal functional tests results) and patients (n=14) for whom this diagnosis was highly unlikely (with both normal functional tests results). Diagnosis remained doubtful for two patients. Overall, gMSI assay was non-contributory in 12.5% (5/40) patients, did not detect the patients with biallelic *MSH6* alterations and missed one patient with biallelic *PMS2* alterations. **CONCLUSIONS:** *Ev*MSI and methylation tolerance assays are sensitive and specific methods that may constitute valuable tools when diagnosis of CMMRD could not be confirmed by genetic testing.

Keywords: functional diagnostic test; pediatric cancer patients; cancer predisposition syndrome; MMR gene mutation, diagnostic accuracy

INTRODUCTION

Individuals with Lynch syndrome (formerly called Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer) harbor germline heterozygous mutations that affect one of the 4 major mismatch repair (MMR) genes (*i.e.*, *MLH1, MSH2, MSH6* or *PMS2*). Lynch individuals are at greatly increased risk of developing colorectal and other epithelial tumors [1]. Typically, Lynch subjects with germline *MLH1* and *MSH2* defects develop MMR-deficient cancers during their fourth or fifth decade, whereas those with *MSH6* or *PMS2* mutations are affected more inconsistently. Patients with biallelic germline mutations in MMR genes suffer from a recently described and distinct inherited cancer syndrome (OMIM #276300) called Constitutional MMR-Deficiency (CMMRD) [2, 3]. This syndrome is characterized by the development of childhood tumors, *e.g.* very early-onset lymphomas and/or leukemias, colorectal cancers, astrocyte-derived brain tumors, the clinical presentation being highly variable (see [4-6] for review). To date, CMMRD has been reported in 146 patients from 91 distinct families [7]. Of interest, compound MMR heterozygous carriers have frequently been reported (45/91 families), implying that CMMRD is often unrelated to consanguinity. Because CMMRD is due mainly to biallelic inheritance of *PMS2* or *MSH6* germline mutations, the epidemiology of this syndrome is characterized by a low incidence of Lynch syndrome-related cancers in first-degree relatives. Café-au-lait spots (CLS) are frequently observed in CMMRD together with early-onset colonic adenomas, leading to confusion of the diagnosis with neurofibromatosis type 1 (NF1) or familial adenomatous polyposis (FAP), respectively. For all of these reasons, CMMRD syndrome is frequently unrecognized by paediatric haematologists/oncologists and its incidence is certainly underestimated.

The current diagnosis of this condition requires both deletion/duplication analysis and extensive sequencing of exonic regions of MMR genes, a time- and cost-consuming process that often leads to non-contributory results when a variant of unknown functional significance (UV) is detected, *i.e.* in 30% of cases [4]. Moreover, the detection of *PMS2* alterations (60% of CMMRD families) is complicated by the presence of 15 pseudogenes on the same chromosome. One of these, known as *PMS2CL*, lies just 0.7 Mb centromeric to the functional *PMS2* and due to extensive sequence exchange, the 3′ regions of the gene and pseudogene cannot be reliably distinguished on the basis of sequence differences, which results in a lack of sensitivity of genetic analysis in detecting *PMS2* alterations. Another screening strategy complementary to genetic testing could include immunohistochemical (IHC) analysis of tumor as well as non-neoplastic tissues. This might reveal a loss of MMR protein expression in the normal tissue of CMMRD patients but the

absence of an internal positive control complicates interpretation of the staining result. Loss of MMR protein expression in tumor and/or normal tissue could also be used to guide germline MMR analysis to one of the four MMR genes. However, conflicting data exist regarding sensitivity of IHC as a screening tool [8,9].

Genetic testing remains the gold standard for the identification of CMMRD patients, but because of its acknowledged limitations, a complementary non-descriptive test would be desirable. For this purpose, we aimed to develop a functional assay assuming that distinctive functional properties of MMR-deficient tumor cells could also be present in immortalized lymphoid cells of CMMRD patients. At the cellular level, it is well documented that inactivation of MMR increases the resistance to specific genotoxic agents such as methylating and thiopurine drugs [10,11]. At the molecular level, MMR-deficient cancer cells specifically exhibit the microsatellite instability (MSI) phenotype due to the accumulation of replication errors in repetitive DNA sequences [12-15]. In tissues derived from clonally proliferating MMR-deficient cells, that is, neoplastic cells, MSI is easily detected by PCR amplification. At contrast, previous studies showed that MSI cannot be detected in non-neoplastic cells from CMMRD patients unless using the laborious technique of "small pool PCR" involving serial DNA dilution to approximately 1-3 genome equivalents per PCR-reaction [Parsons, 1995 #851;Wimmer, 2008 #555]. Another method for the detection of MSI in germline DNA (gMSI) based on the presence of stutter peaks flanking a dinucleotide repeat allele was recently proposed. However, it showed limited sensitivity (biallelic *MSH6* mutations were not detected) and remains to be validated on a larger series of CMMRD patients (only 3 distinct null MMR genotypes had been investigated) [16]. The design of the herein study involved three steps. First, in a proof of concept study, we demonstrated the specific detection of MSI and tolerance to MNNG (methylating agent) and 6-TG (thiopurine) in lymphoblastoid cell lines (LCLs) derived from 3 known CMMRD patients. Then, we validated these functional assays in a case-control study including a larger sample of CMMRD patients (n=19) as well as Lynch and MMR wild-type individuals as controls (n=63); we also evaluated the recently reported gMSI assay on the same patients. Finally, we investigated the contribution of the different methods for 23 possible CMMRD patients for whom diagnosis was not confirmed at the molecular level.

PATIENTS AND METHODS

Patients. At the 1st workshop of the newly established European consortium 'Care for CMMRD' (C4CMMRD) held at Saint-Antoine Hospital in Paris, on June 9 2013, a call for contribution was made to collect blood samples or LCLs from definite or possible CMMRD patients in order to validate our methods on a larger series of cases. Eligible subjects included both patients already diagnosed with CMMRD, i.e. with biallelic deleterious germline mutations in any of the 4 MMR genes (n=12), and patients clinically suspected of the condition (n=28), i.e. with a clinical score ≥3 according to the system recently proposed by the C4CMMRD consortium in order to identify which patients with cancer should undergo testing for CMMRD diagnosis [7]. Despite a clinical score equals to 1, one additional patient (C28) was also included because he displayed a very severe clinical history with 4 Lynch syndrome related tumors from 32 to 36 yr and osteosarcoma at the age of 11 (although not previously reported in CMMRD, osteosarcoma was found in the CMMRD patient C05 at the age of 24 years old). One asymptomatic sibling of a possible CMMRD patient (C29.2) was also included because he displayed CLS. Altogether, the study included 42 patients (37 families) from several European pediatric cancer centers. LCLs were already available (n=10) or could be established (n=27) for 37 out of 42 patients. Control MMR-proficient LCLs originated from 47 Lynch patients and 15 subjects considered free of MMR germline defects. The latter group included 5 FAP and 2 NF1 individuals with identified germline *APC* or *NF1* mutations, respectively. FAP and NF1 were chosen because they represent cancer predisposition syndromes showing clinical overlap with CMMRD. Another 8 control patients showed no familial cancer history but were diagnosed with sporadic colorectal cancer. These patients had developed microsatellite stable tumors (6 cases) or MSI tumors due to epigenetic silencing of MLH1 because of somatic methylation (2 cases) and thus were not suspected of having CMMRD syndrome. All patients gave their written informed consent.

Cell Lines. Cells were grown at 37°C with 5% CO_2. Human colorectal cancer cell lines were grown in DMEM with glutamax supplemented with 10% FCS, 100 IU/ml penicillin and 100mg/ml streptomycin (PAA). They included 6 microsatellite unstable (HCT116, LIM2405, LS174T, KM12 [17], HCT15 [18] and LoVo [19]) and 5 microsatellite stable (LS513, SW620, Caco-2, FET and HCT116 mlh1-2 (HCT116 transfected with an MLH1-expression vector [20] kindly provided

by Françoise Praz)) cell lines. LCLs obtained following standard EBV infection were grown in RPMI 1640 with stable glutamine supplemented with 20% FCS, 100 IU/ml penicillin and 100mg/ml streptomycin (PAA). Only LCLs with comparable growth rates and with viability greater than 85% were included.

Chemicals. All chemicals were obtained from Sigma unless otherwise indicated. Cells were exposed to 6-Thioguanine (6-TG) and N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine (MNNG) (TCI Europe). To exclude differences in MNNG cytotoxicity due to variations in O^6-methylguanine methyltransferase enzyme activity, the latter was abrogated by exposure to O^6-benzylguanine (20μM final concentration) during the entire experiment. All chemicals were dissolved in DMSO to a concentration of 20mM, protected from light and stored at -20°C until used.

Ex vivo **microsatellite instability analysis.** To detect *ev*MSI, products from BAT26, NR21 and NR27 amplification were separated by capillary electrophoresis on an ABI 3100 genetic analyzer and quantified using Gene Mapper software v3.7. In order to confidently detect allelic shifts of as little as 1 base pair in size, DNA from immortalized and peripheral lymphocytes were analyzed concurrently in octoplicate. For 2 of the 3 previously confirmed CMMRD patients, DNA was also amplified by PCR at 40 coding microsatellite sequences (sequences available upon request).

Treatment of colorectal cell lines. Cells in the exponential growth phase were counted by trypan blue exclusion and seeded into 24-well plates (Falcon) at a density of 0.2-5×10^5 cells/well in complete medium. After 24-h incubation, 6-TG (1, 5, 15, 20μM final concentrations) or extemporaneously reconstituted MNNG (0.1, 1, 5, 20μM final concentrations) was added. Medium was removed and replaced with fresh medium after 24-h or 1-h incubation, respectively. Cell growth was evaluated after a total incubation period of 7 to 9 days. All samples were tested in quadruplicate.

Treatment of lymphoblastoid cell lines. For MNNG treatment, exponentially growing cells were seeded into 96-well round-bottom plates (Falcon) at a density of 0.15-1×10^4 cells/well in 100μL of complete medium. After 24-h incubation, treatment was started by adding 10μL of increasing concentrations of extemporaneously reconstituted MNNG solution (1.25, 2.5 and 5μM final concentration). Because of the short half-life of MNNG in aqueous solution (1 hour), the medium was not replaced after drug treatment and 1, 2 or 3 rounds of treatment separated

by 24-h were performed. Cell growth was evaluated after a total incubation time of 10 days and all samples were tested in triplicate. Each experiment was conducted at least in duplicate. For 6-TG treatment, cells suspended in complete medium ($3x10^5$ cell/mL) were distributed into 5 microtubes with increasing concentrations of 6-TG (0.15, 0.3, 0.6, 1.25 and 2.5μM final concentrations) into 4 of them. After 24-h incubation, all microtubes were centrifuged, the cells were rinsed with fresh medium and then seeded in 100μL aliquots into 96-well round-bottom plates (0.6×10^4 cells/well). Cell growth was evaluated after a total incubation time of 7 days and all samples were tested in sextuplicate.

***In vitro* drug sensitivity assay**. The cytotoxic effect of each chemical was examined by the WST1 (water soluble salt tetrazolium) kit according to the supplier's recommendations (Roche). Absorbance was read at 450nm using a microplate reader Tecan Infinite F500 and analyzed using Xfluor4GENiosPro software. Percent survival was represented as the absorbance of treated sample relative to control. Each experiment was conducted at least twice.

Determining the gMSI ratio. Multiplex PCR amplification in triplicate (denaturation of 95°C for 2 min, followed by 35 cycles of 95°C for 30sec, 55°C for 30sec, and 72°C for 60sec, with a final extension at 72°C for 10min) of the dinucleotide microsatellite markers D17S791, D2S123 and D17S250 was developed using the fluorescently labeled primers previously described [16], and using 10ng of patient germinal DNA. PCR products were separated by capillary electrophoresis on an ABI 3100 genetic analyser and quantified using Gene Mapper software v3.7. In brief, the gMSI ratio was determined by dividing the height of an allele's trailing "stutter" peak (n + 1) by the height of the allele's major peak (n). Interpretation required that the size difference between alleles in heterozygous individuals was ≥6 bp [16].

Germline gene analysis. The 4 MMR genes were PCR-amplified from genomic DNA. *MLH1*, *MSH2*, and *MSH6* genes were analyzed by direct sequencing and screening for large rearrangements was performed through Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) for *MLH1*/*MSH2* and Quantitative Multiplex PCR of Short fluorescence Fragments (QMPSF) for *MSH2*/*MSH6* [21]. Considering the numerous *PMS2* pseudogenes complicating the screening for *PMS2* alterations, the PCR-amplification was optimized by exon-specific long-range amplification. Sequencing analyses were performed on both strands using the ABI PRISM Kit (Applied Biosystems) and sequences were analyzed on an automated sequencer (ABI

3130XL Genetic Analyzer, Applied Biosystems) using Sequencing Analysis Software v5.2 (Applied Biosystems). Large deletions were analysed by quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments method for specific *PMS2* exons (6, 7, 8 and 10). For some patients, additional *PMS2* testing was performed by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) using the SALSA MLPA kit P008 (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) that allows detection of deletions of *PMS2* exons 12-15. Genetic analysis of *MLH1*, *MSH2* and *MSH6* genes was performed across different laboratories whereas analysis of *PMS2* was conducted either in Rouen, Lille or Innsbruck laboratories. Screening of the *NF1* gene was performed using a variety of methodologies that included DNA and RNA sequencing for small lesions, polymorphic microsatellite marker analysis and MLPA or real-time PCR-based gene dosage analysis to permit microdeletion assessment, as previously described [22]. Mutation analysis of the *APC* gene was performed by direct sequencing and the screening of large rearrangements by MLPA [23].

Statistical analysis. We estimated the diagnostic accuracy of the three tests, or combination of tests, the CMMRD status being confirmed only in a proportion of patients (i.e. with pathogenic biallelic MMR mutations) *via* a latent class model formulation. In the saturated model, the joint distribution of the three tests or combination of tests was assumed to be multinomial with 16 categories, corresponding to all possible observations. The multinomial parameters were expressed as the true proportion of CMMRD patients, sensitivity and specificity of the three tests. We assumed conditional independence of the tests to ensure identifiability in the unsaturated model. An Hastings-Metropolis algorithm was run on the data to estimate the seven parameters and two-sided confidence intervals.

RESULTS

THE PROOF OF CONCEPT STUDY. Three CMMRD patients with biallelic deleterious mutations in *MSH6*, *PMS2* or *MLH1* were tested for MSI and drug sensitivity as compared to 8 controls including 4 Lynch patients and 4 patients with wild-type MMR status.

MSI screening. As expected, we were unable to detect MSI at 3 non-coding mononucleotide microsatellite markers (BAT26, NR21 and NR27) in peripheral blood lymphocytes (PBLs) from

CMMRD patients (Figure 1A). Since the presence of somatic mutations at DNA repeats in MMR-deficient cells is related to cell division, we hypothesized that immortalized lymphoblasts from CMMRD patients might show MSI due to their increased proliferation in culture. Indeed, we observed a clear MSI phenotype with characteristic, aberrant alleles in immortalized lymphocytes from the 3 CMMRD patients, when compared with their respective PBLs (Figure 1A). In contrast, the 8 control LCLs displayed stable allelic profiles, even after a prolonged period of culture (Figure 1B and Suppl Table S1). This acquisition of an MSI phenotype in cells from CMMRD patients occurred only *ex vivo* in immortalized lymphoblasts and was thus termed *ev*MSI to distinguish it from the *in vivo* MSI phenotype detected in MMR-deficient cancer cells. The cut-off value to define a cell line as positive for *ev*MSI was set at 1 base pair deletion for all 3 markers. E*v*MSI was shown to increase progressively with the duration of culture. In an attempt to improve the detection of MSI, we also screened CMMRD LCLs for instability in microsatellite markers located within the coding region of known target genes for mutation in MSI tumors [Duval, 2002 #383] but no evidence of MSI was found at these loci (data not shown).

Drug tolerance assay. We first evaluated the cytotoxic effects of MNNG and 6-TG in 11 human colorectal cancer cell lines. Cell lines that were *MLH1*, *MSH2* or *MSH6*-deficient were on average up to 10-fold more resistant to 1μM MNNG than MMR-proficient cell lines and 2-fold more resistant to 15μM 6-TG (Suppl Figure S1). We next investigated the response of LCLs to both drugs. Because of the short half-life (1 hour) of MNNG in aqueous solution, 1, 2 or 3 rounds of treatment at 24-hour intervals were performed. As expected, cell viability decreased with increasing drug concentration and number of treatments. However, we found that all 3 CMMRD-derived LCLs were phenotypically distinguishable from heterozygous and wild-type MMR cells. They displayed cell survival values higher than controls and without any overlap between the two groups using several MNNG experimental conditions whereas 6-TG was found to be less specific (Figure 1C and 1D).

THE CASE-CONTROL STUDY. In order to validate these preliminary results on a larger series of patients, a call for contribution was made at the 1st workshop of the newly established

European consortium 'Care for CMMRD' (C4CMMRD) in Paris, on June 9 2013. Blood samples or LCLs from 42 patients (37 families) from several European pediatric cancer centers, including patients already diagnosed with CMMRD (n=12) and patients clinically suspected of the condition (n=30) on the basis of the scoring system recently proposed by the C4CMMRD consortium [Wimmer, 2014 #881] were collected. The latter patients underwent a genetic analysis of MMR genes. Personal and familial clinical history and available IHC and tumor microsatellite data were also collected (Table 1). Pedigrees of all previously unreported patients are presented in Suppl Fig 2. Among the 42 patients, 19 were diagnosed as definite CMMRD patients with confirmed molecular diagnosis, i.e. with biallelic pathogenic MMR gene mutations, and thus were used in the case-control study. Control MMR-proficient LCLs originated from 47 Lynch patients and 15 subjects considered free of MMR germline defects (Suppl Table S1). *Ev*MSI status, drug sensitivity and gMSI assays were evaluated in parallel and in a blinded fashion in the Saint-Antoine laboratory.

***Ev*MSI and drug response assays.** The *ev*MSI test was performed on all individuals for whom both LCL and germline DNA were available, i.e. 14/19 CMMRD and 23 control subjects. LCLs from the 14 CMMRD patients, including carriers of biallelic mutations on *PMS2* (n=10), *MSH6* (n=3) or *MLH1* (n=1), were positive for *ev*MSI with deletions ranging from 1 to 7 base pairs whereas LCLs from all 23 MMR-proficient controls (including 12 Lynch patients and 11 MMR wild-type individuals) were *ev*MSI negative (no deletion). Thus, this test was 100% sensitive and specific in detecting CMMRD patients (Figures 2A and 3). The culture period, which could be precisely estimated in 10 LCLs, showed that the detection of an *ev*MSI phenotype in all LCLs required 46 to 125 days from immortalization (a positive *ev*MSI phenotype being detected before a 3 months time period in 7/10 LCLs) (Suppl Table S1). Therefore, a maximum culture time of 4 months was set for subsequent experiments, which was considered to be an appropriate time limit for a diagnostic test. However, we assumed that such deadline was only approximate and that detection of an *ev*MSI phenotype could be delayed in some LCLs, which could make this test somewhat less sensitive.

Since some Lynch patients displayed increased tolerance to MNNG drug treatment when compared to the 14 MMR wild-type controls, an additional series of 27 Lynch patients was tested for methylation tolerance complementary to the 12 also analyzed for *ev*MSI, in order to

better assess the heterogeneity in drug response of Lynch LCLs. With the exception of *MLH1*$^{+/-}$ LCLs (n=11) that behaved similarly to MMR wild-type lymphoblasts (n=12) in all experimental conditions using MNNG, *MSH2*$^{+/-}$ (n=12), *PMS2*$^{+/-}$ (n=4) and mainly *MSH6*$^{+/-}$ cell lines (n=13) exhibited increased cell survival under low MNNG concentrations. At higher MNNG concentrations and/or increasing numbers of drug treatments, the survival of *MSH2*$^{+/-}$, *PMS2*$^{+/-}$ and *MSH6*$^{+/-}$ lines decreased towards that of *MLH1*$^{+/-}$ and MMR wild-type cells, whereas CMMRD LCLs remained quite resistant to the drug. Since our goal was to combine our two functional assays to ideally get a 100% accurate test for CMMRD diagnosis, and given that the *ev*MSI assay was assumed to be highly specific but perhaps less sensitive, we chose the MNNG experimental condition, i.e. 2 rounds of 2.5 μM MNNG, which maximized sensitivity at the expense of a slight lack of specificity (see red boxes in Suppl Figure S3B). Using this condition of MNNG exposure, LCLs from all 14 CMMRD patients displayed a cell survival rate above 60% while 52/53 LCLs from controls displayed a cell survival lower than 40% (median cell survival of 87.5% and 20.9%, respectively; P<.0001, Student's t test). So, the cutoff value was arbitrarily set at 50% cell survival. Compared to wild-type MMR cells, LCLs from *MSH6*$^{+/-}$ and *MSH2*$^{+/-}$ Lynch patients still showed a slight but significant increase in MNNG tolerance (median cell survival of 16.6% for wild-type cells compared to 32% and 20.9% respectively; P<.0001 and P=.0305, Student's t test). The results obtained with the thiopurine tolerance assay were less conclusive (Suppl Fig S3A).

The overall results from functional screening showed that *ev*MSI and methylation tolerance were observed in all 14 patients with biallelic *PMS2*, *MSH6* or *MLH1* defects (100% sensitivity), but not in the 23/23 and 51/52 MMR-proficient LCLs analyzed for these features, respectively.

gMSI assay. The gMSI assay could be performed on 18 CMMRD (17 families) and 19 Lynch patients of the series for whom germline DNA was available and on 220 additional controls from the Human Genome Diversity Panel (HGDP). The test was non-contributory in 3/18 (16.7%) CMMRD patients, 3/20 (15%) Lynch patients and 39/220 (17.7%) controls because of the presence of heterozygous marker(s) with alleles closer than 6 bp that hampered analysis [Ingham, 2013 #859]. In agreement with previous report, the two biallelic *MSH6* mutations carriers were not detected by this method (gMSI negative), whereas CMMRD patients with

biallelic mutations involving *PMS2* (n=11), *MLH1* (n=1) or *MSH2* (n=1) displayed abnormal gMSI values (gMSI positive) (Figure 2C). All controls were negative.

Overall, the 3 tests were carried out on 13 CMMRD patients. Combined data showed that gMSI assay did not detect the patients with biallelic *MSH6* alterations and was non-contributory in two other cases. In the nine remaining CMMRD patients, *ev*MSI, methylation tolerance and gMSI assays generated concordant positive results (Suppl Table S2).

CONTRIBUTION OF THE DIFFERENT METHODS FOR POSSIBLE CMMRD PATIENTS WHOSE DIAGNOSIS WAS NOT CONFIRMED AT THE MOLECULAR LEVEL. In 22 of 42 patients of our series, a suspicion of CMMRD was suggested on the basis of their high clinical score (see above) but diagnosis could not be confirmed by genetic testing. These included eight patients with non-contributory molecular diagnosis, i.e. with biallelic MMR mutations including 1 or 2 UV(s) (four with homozygous *MSH6* variant and four with both variant and deleterious mutation involving *MSH6* (1 case), *PMS2* (2 cases) or *MSH2* (1 case)). Fourteen other patients were tested negative for biallelic MMR mutations, i.e. five patients with a single MMR mutation and nine patients without any detected MMR mutations (Table 1). In front of a clinical phenotype suggestive of CMMRD, the risk was to miss 1 or 2 germline mutation(s) by genetic testing, especially because of the acknowledged technical shortcomings in detecting *PMS2* mutation. The three assays (*ev*MSI, drug and gMSI) were performed on these 22 patients (Suppl Table S2).

As expected, there were overall more patients displaying at least one positive assay among patients with biallelic MMR mutations since they have a higher likelihood of presenting CMMRD syndrome (7/8 Vs 1/15 among patients with 0 or 1 mutation, P=2,47 10^{-4}, exact Fisher test) (Suppl Table S2). Six of 22 patients suspected of CMMRD displayed both positive *ev*MSI and drug assays, as specifically observed in definite CMMRD patients, which strongly supported a diagnosis of CMMRD. Among these highly probable CMMRD patients, five harbored *MSH6* or *PMS2* biallelic MMR alterations including UV. As expected, gMSI was found negative for the three *MSH6* biallelic carriers (C20.1, C20.2 and C22). More unexpectedly, it was also found negative in one of the two *PMS2* biallelic carriers (C18) (and non-contributory in the

other (C19)). Interestingly, in the 6th patient (C29.1), all three assays were positive whereas no germline MMR mutation was detected. In the absence of available genetic test in this family, his asymptomatic brother aged 11 year (C29.2) was additionally investigated because he displayed CLS. All three assays were negative (Suppl Table S2).

In another 14 patients suspected of CMMRD (including one compound heterozygous for a *MSH2* variant (C24), five patients with a single *MLH1*, *PMS2* or *MSH2* alteration and eight patients with no detected MMR alteration), *ev*MSI and drug assays were negative as was specifically observed in controls, which made CMMRD diagnosis as highly unlikely. The gMSI assay was also found negative in 13/14 patients whereas it was non-contributory in the latter.

Finally, in the two remaining patients who displayed biallelic *MSH6* mutations including UV(s) (C21 and C23), a discrepancy was observed among functional tests since a methylation tolerance but not an *ev*MSI phenotype was observed. Therefore, the diagnosis of these two patients remained doubtful and could not be established on the basis of the functional assays. Moreover, gMSI could not help in this context of *MSH6* alterations.

STATISTICAL ANALYSIS OF THE DATA SET. In order to better assess the contribution of the three assays (*ev*MSI, methylation tolerance and gMSI) to the diagnosis of CMMRD from a statistical point of view, the whole data set found in molecularly proven CMMRD patients, patients at-risk and controls, was analyzed *via* a latent class model formulation, and parameters have been estimated *via* an Hastings-Metropolis algorithm. It showed 67.3% (46.8 to 85.1%) sensitivity and 98.8% (95.6 to 100%) specificity for genetic testing, and 95.5% (84 to 99.9%) sensitivity and 96.8% (91.9 to 99.7%) specificity for methylation tolerance assay. When the latter was combined to another test (*ev*MSI or gMSI), sensitivity was 94.1% (79.8 to 99.8%) and specificity increased to 98.8% (95.6 to 100%). Positive and negative predictive values were respectively 90.5% (74.8 to 99.6%) and 77.1% (67.5 to 85.6%) for drug assay, 94% (79.9 to 99.8%) and 92.2% (85.9 to 96.8%) when drug assay was combined to another test and 96.7% (83.8 to 100%) and 77.4% (68.1 to 85.6%) for genetic testing.

DIAGNOSTIC ACCURACY OF MSI TUMOR TESTING AND IHC OF MMR PROTEINS. Although our study was not designed to test the accuracy of these methods, available data regarding tumor MSI status and expression of MLH1, MSH2, MSH6, and PMS2 proteins in tumor as well as in non-neoplastic tissues were collected in our subset of definite or possible 42 CMMRD patients (see Table 1). Tumor microsatellite status was available for 11 tumors originating from 10 of 25 definite or highly probable CMMRD patients of our study. An MSI phenotype was found in 7 tumors (all of colorectal origin) but not in 4 other tumors, which included brain tumors (n=2), adenomas (n=1), and duodenal carcinoma (n=1) (specificity= 7/11 63.6%). MMR protein expression on normal tissue was known for 22 patients. It was found to be lost in 15 patients (including 10/10 molecularly confirmed CMMRD patients, 4/6 highly probable CMMRD and 1/6 highly unlikely CMMRD) and conserved in 7 patients (including 2/6 highly probable and 5/6 highly unlikely). These data indicated 87.5% (14/16) sensitivity and 83.33% (5/6) specificity of this method.

DISCUSSION

The method we present here for the screening of CMMRD is based on the detection of two major functional consequences of impaired MMR in cultured, immortalized lymphoid cells, namely *ev*MSI and tolerance to methylation. It allowed rapid confirmation of this condition in 14 patients with definite CMMRD. Importantly, when applied to a large series of MMR-proficient controls including Lynch patients with heterozygous germline MMR mutations in *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* or *PMS2*, or patients with confounding cancer syndrome (FAP or NF1), the same methods were highly specific since a single false positive result was found using the methylation tolerance assay. Overall, the method we propose is thus likely to be highly sensitive and specific for the detection of CMMRD.

We demonstrated our method constitutes an effective strategy to improve CMMRD diagnosis in patients whose diagnosis was not confirmed at the molecular level since it allowed to discriminate two main subsets of patients: those (n=6) for whom a CMMRD diagnosis was highly probable (i.e. with two abnormal functional tests results) and those (n=14) for whom this diagnosis was highly unlikely (i.e. with both normal functional tests results) (see Figure 3). It is

noteworthy that although all these patients raised a high suspicion of CMMRD according to the clinical scoring system recently proposed by the C4CMMRD consortium, it could be expected that only some of them displayed this condition since clinical criteria were chosen to be highly sensitive but less specific [7]. Among the six highly probable CMMRD patients, five individuals in whom MMR gene mutational analysis was non-contributory due to the presence of 1 or 2 UV(s), showed unambiguous positive results for both *ev*MSI and methylation tolerance, thus predicting a pathogenic nature of the variants. Consistent with our results, *in silico* prediction favored a pathogenic nature for the *MSH6* and *PMS2* variants in three of these patients (C20.1, C20.2, C18). Moreover, the c.2249G>A missense mutation of the *PMS2* gene found in patient C18, was previously reported to be associated with a complete deletion of the other *PMS2* allele in a patient with an history of rectal cancer and brain tumor at the age of 22 and 23, which further corroborates the pathogenic role of this UV [24]. In light of all these data, the diagnosis of CMMRD was almost certain despite a negative gMSI result, which thus provides the first example of a false negative gMSI result in a CMMRD patient with biallelic *PMS2* mutations. All other variants had never been reported. Our method also diagnosed CMMRD in a 6th patient, a 6 years old child (C29.1) with glioblastoma and CLS in whom no germline MMR mutation could be detected. Consistent with this result, gMSI assay was also found to be positive (Table 1). These data prompted us to conduct additional *PMS2* testing using multiplex ligation-dependent probe amplification, which provided new results in favor of a possible homozygous deletion of the 3' region of the *PMS2* gene (analysis in progress). In the absence of available genetic testing in this family, his asymptomatic brother aged 11 year (C29.2) was also investigated because he displayed CLS. All three assays were negative which ruled out the diagnosis of CMMRD for this child (genetic analysis is in progress). Finally, in another subset of 14 patients suspected of CMMRD, *ev*MSI and methylation tolerance assays together with gMSI assay were negative, as specifically observed in controls, which made a CMMRD diagnosis as highly unlikely. These data also indicated the *MSH2* variant found in one patient (C24) was likely to be not pathogenic and confirmed that genetic analysis did not miss MMR mutation(s) in the other patients.

What was our rationale for investigating both *ev*MSI and methylation tolerance to detect constitutive MMR-deficiency in LCLs? *Ev*MSI was observed exclusively in CMMRD LCLs, thus

making this method highly specific. In contrast, the MNNG cytotoxicity assay detected low levels of tolerance to MNNG in some LCLs from patients with Lynch syndrome, depending on which MMR gene was mutated. Consistent with our results, *MSH2*$^{+/-}$ lymphoblastoid cell lines were previously reported to be less sensitive to the methylating agent temozolomide than *MLH1*$^{+/-}$ cells or MMR wild-type controls [25]. Furthermore, the manifestation of *ev*MSI, but not methylation tolerance, was related to the duration of cell culture, which therefore made the drug test more sensitive by producing consistent results only a few weeks after lymphoblast immortalization. For these reasons, we recommend the use of both complementary functional approaches in studies aimed at detecting CMMRD in at-risk individuals. Although the *ev*MSI and MNNG tolerance assays results were concordant in most patients suspected of CMMRD, a discrepancy, i.e. detection of methylation tolerance but not *ev*MSI, was observed for two patients with biallelic *MSH6* mutations including 1 UV (patient C21) or 2 UVs (patient C23). Different hypothesis could account for this discrepancy. First, we cannot exclude that certain MMR gene mutations might result in an uncoupling of DNA mismatch repair and DNA damage-induced apoptosis functions, as reported in mice [26, 27]. An alternate hypothesis is that the 4 months deadline might be too short for the detection of an *ev*MSI phenotype in these cases. To check this issue, culture of lymphoblasts has been extended until 270 days. It demonstrated the detection of an *ev*MSI phenotype (1bp shift in Bat26 at 247 days) in one patient (C23) but not in the other. These data suggested a highly probable CMMRD syndrome for patient C23 whereas the diagnosis remained doubtful for patient C21 who could be considered as either a *MSH6* Lynch patient with a severe tumor phenotype or a CMMRD patient.

Further studies will be required to assess whether variants resulting in abrogated DNA damage response but normal MMR are associated with the same clinical features as pathogenic mutations. The great incidence of UV in CMMRD patients and the frequent lack of familial history in one or both parental branch(es) suggest that some UV may be variants of low penetrance at a heterozygous state. At a homozygous or compound heterozygous state, a partial residual function may explain a less severe CMMRD phenotype, as observed in the patient C21. Moreover, we found some Lynch patients, carriers of heterozygous pathogenic *PMS2* or *MSH2* mutation, who displayed unusually early tumor onset, e.g. colon tumor at 12, 17 or 25 years of age in patients C24, C26 and C25, respectively. All together, this may account

for the existence of a clinical continuum that goes from less severe CMMRD phenotypes that mimic Lynch syndrome, to severe and early Lynch syndrome phenotypes that could mimic CMMRD.

Other molecular tools that were reported for CMMRD screening, are MSI tumor testing and MMR proteins IHC analysis. According to previous reports, we found MSI tumor testing was not sensitive (63.6%), particularly in non-gastrointestinal malignancies (see [7] for recent review). It is well known that tumor MSI is neither specific since most tumors from Lynch patients and approximately 10% of sporadic colorectal carcinomas are MSI due to somatic hypermethylation of the *MLH1* promoter. In contrast to MSI tumor testing, IHC in normal tissue was recently reported 100% sensitive in all tumor types [28]. However, in our study, it was only found 87.5% sensitive since positive MSH6 staining was conserved in two assumed CMMRD patients (C20.2 and C22), carriers of homozygous *MSH6* missense mutations. Accordingly, positive IHC staining was reported in tumors from patients with Lynch syndrome carriers of non-truncating MMR mutations that encode non-functional proteins. Moreover, recent studies demonstrated that IHC has a low sensitivity in identifying pathogenic *MSH6* mutations [29] and may be some *PMS2* mutations [30]. We also found IHC lacks specificity since no PMS2 protein expression was found in one putative CMMRD patient who displayed three negative tests (patient C25), who was tested negative for *PMS2* mutation despite extensive genetic screening of *PMS2* gene (including MLPA analysis) and was thus assumed not to be CMMRD. Moreover, the seemingly simple and easily available IHC test can be challenging both technically and with respect to staining interpretation because of the lack of staining of internal normal cells in CMMRD patients. So, in order to further assess the robustness of this method as a diagnostic tool, we would recommend a blinded evaluation of normal tissue screening by IHC on a large case-control study. Moreover, samples should not be centrally reviewed as was the case in [28], but analyzed across different institutions, which corresponds to the most frequent situation in routine practice.

So, we recommend that the different tests (drug-*ev*MSI-gMSI) should be implemented for the diagnosis of CMMRD, complementary to IHC. The screening strategy that we proposed takes into account the ease of implementation of each assay and their sensitivity/specificity (Figure 3). Therefore, the first-line method should include gMSI and IHC, which constitute simple and

rapid tools to detect CMMRD. Since both methods have potential pitfalls (lack of sensitivity for detecting *MSH6* and some *PMS2* biallelic mutations for gMSI assay and lack of sensitivity/specificity for IHC) and may fail to confirm the suspected diagnosis, we recommend combining them. The final confirmation of the diagnosis in screen-positive patients should come from identification of two biallelic mutations. However, if a single or no MMR mutation was found, or if IHC and/or gMSI were normal or non-contributory, then the second-line method should include the two functional assays (i.e. *ev*MSI and methylation tolerance testings). Since these assays require establishment of a LCL, we recommend freezing the patient 's lymphocytes preventively as soon as the diagnosis of CMMRD is suspected. Since the methylation tolerance test is the only of the four assays that never gave false negative result until now, it should allow rule out the diagnosis and avoid complex, long and demanding genetic testing. Such screening strategy should allow early implementation of surveillance protocol, which is important since reported data suggested efficiency of surveillance protocol [31]. Therefore, we suggest surveillance protocol should be initiated even before a genetic confirmation is available to avoid late tumor diagnosis.

Our study provides the largest series of CMMRD patients ever reported in the literature. Importantly, we were able to investigate CMMRD patients with biallelic inactivating mutations in *PMS2*, *MSH6* or *MLH1*, representing 92% of CMMRD families reported to date. We recommend that from now, geneticists use *ev*MSI, methylation tolerance and gMSI assays for the diagnostic of CMMRD syndrome when genetic testing is non-contributory. Indeed, we expect that this functional assay will allow assess whether or not MMR variants are pathogenic, which represents an increased challenge in the context of the advent of next-generation sequencing technology. Our assay could also prove useful in clinical practice through providing the opportunity to functionally test MMR deficiency in patients with an evocative CMMRD clinical phenotype but in whom a single or no germline MMR mutation was found (like in patient C29.1). Our study provides the identification of new cases of constitutive loss of MMR that furthered our understanding of the clinical and molecular characteristics of this syndrome. To our knowledge, we report the first CMMRD patient with an osteosarcoma (case C05). Interestingly, we also report that CLS are not necessarily associated with the disease in CMMRD families (see patients C29.2 and C09.2 in pedigrees of Suppl Figure S2). Two

mutations that involved the *PMS2* gene, i.e. c.137G>T missense mutation predicted to be pathogenic and c.2007-2A>G pathogenic splice variant, were found in 3 unrelated families each (patients C01.1, C01.2, C07 and C08 and patients C06, C09.1 and C10.1, respectively). Moreover, three *PMS2* mutations found in our study, *i.e.* c.137G>T, c.400C>T nonsense mutation and c.2249G>A unclassified variant, were previously reported in 6, 1 and 1 families respectively, in carriers of biallelic *PMS2* gene mutations [3, 6, 24, 32-35]. This suggests that besides the founder effect of the c.2404C>T variant described in several Lynch families of Pakistani origin [36] or the Norwegian c.989-1G>T splice variant [30], other mutations within the *PMS2* locus, such as the c.137G>T and the c.2007-2A>G whose prevalence remains to be determined, are candidate for additional founder mutations.

Funding. Supported by grants from the Association pour la Recherche contre le Cancer (number 5079 to MM). AD group have the label « La Ligue Contre le Cancer ». AC is a recipient of an Institut National du Cancer (INCa) fellowship. SB is the recipient of an MESR fellowship (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche).

Acknowledgements. We thank the cell bank from AP-HP Cochin - Saint Vincent de Paul, Paris, France, that provided most of the lymphoblastoid cell lines. We thank Barry Iacopetta for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

1. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003; **348**: 919-32.
2. Ricciardone MD, Ozcelik T, Cevher B, Ozdag H, Tuncer M, Gurgey A, et al. Human MLH1 deficiency predisposes to hematological malignancy and neurofibromatosis type 1. *Cancer Res* 1999; **59**: 290-3.
3. Auclair J, Leroux D, Desseigne F, Lasset C, Saurin JC, Joly MO, et al. Novel biallelic mutations in MSH6 and PMS2 genes: gene conversion as a likely cause of PMS2 gene inactivation. *Hum Mutat* 2007; **28**: 1084-90.
4. Felton KE, Gilchrist DM, Andrew SE. Constitutive deficiency in DNA mismatch repair. *Clin Genet* 2007; **71**: 483-98.
5. Wimmer K, Etzler J. Constitutional mismatch repair-deficiency syndrome: have we so far seen only the tip of an iceberg? *Hum Genet* 2008; **124**: 105-22.

6. Herkert JC, Niessen RC, Olderode-Berends MJ, Veenstra-Knol HE, Vos YJ, van der Klift HM, et al. Paediatric intestinal cancer and polyposis due to bi-allelic PMS2 mutations: case series, review and follow-up guidelines. *Eur J Cancer* 2011; **47**: 965-82.
7. Wimmer K, Kratz CP, Vasen HF, Caron O, Colas C, Entz-Werle N, et al. Diagnostic criteria for constitutional mismatch repair deficiency syndrome: suggestions of the European consortium 'Care for CMMRD' (C4CMMRD). *J Med Genet* 2014; **51**: 355-65.
8. Chapusot C, Martin L, Puig PL, Ponnelle T, Cheynel N, Bouvier AM, et al. What is the best way to assess microsatellite instability status in colorectal cancer? Study on a population base of 462 colorectal cancers. *The American journal of surgical pathology* 2004; **28**: 1553-9.
9. Overbeek LI, Ligtenberg MJ, Willems RW, Hermens RP, Blokx WA, Dubois SV, et al. Interpretation of immunohistochemistry for mismatch repair proteins is only reliable in a specialized setting. *The American journal of surgical pathology* 2008; **32**: 1246-51.
10. Karran P. Mechanisms of tolerance to DNA damaging therapeutic drugs. *Carcinogenesis* 2001; **22**: 1931-7.
11. Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nature reviews* 2006; **7**: 335-46.
12. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993; **260**: 812-6.
13. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993; **363**: 558-61.
14. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; **260**: 816-9.
15. Duval A, Hamelin R. Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Res* 2002; **62**: 2447-54.
16. Ingham D, Diggle CP, Berry I, Bristow CA, Hayward BE, Rahman N, et al. Simple Detection of Germline Microsatellite Instability for Diagnosis of Constitutional Mismatch Repair Cancer Syndrome. *Hum Mutat* 2013.
17. Wang Q, Lasset C, Desseigne F, Frappaz D, Bergeron C, Navarro C, et al. Neurofibromatosis and early onset of cancers in hMLH1-deficient children. *Cancer Res* 1999; **59**: 294-7.
18. Bonadona V, Bonaiti B, Olschwang S, Grandjouan S, Huiart L, Longy M, et al. Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome. *Jama* 2011; **305**: 2304-10.
19. Benachenhou N, Guiral S, Gorska-Flipot I, Labuda D, Sinnett D. Frequent loss of heterozygosity at the DNA mismatch-repair loci hMLH1 and hMSH3 in sporadic breast cancer. *Br J Cancer* 1999; **79**: 1012-7.
20. Jacob S, Aguado M, Fallik D, Praz F. The role of the DNA mismatch repair system in the cytotoxicity of the topoisomerase inhibitors camptothecin and etoposide to human colorectal cancer cells. *Cancer Res* 2001; **61**: 6555-62.

21. 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 in press*.
22. Pasmant E, Sabbagh A, Masliah-Planchon J, Ortonne N, Laurendeau I, Melin L, et al. Role of noncoding RNA ANRIL in genesis of plexiform neurofibromas in neurofibromatosis type 1. *J Natl Cancer Inst* 2011; **103**: 1713-22.
23. Mongin C, Coulet F, Lefevre JH, Colas C, Svrcek M, Eyries M, et al. Unexplained polyposis: a challenge for geneticists, pathologists and gastroenterologists. *Clin Genet* 2012; **81**: 38-46.
24. Senter L, Clendenning M, Sotamaa K, Hampel H, Green J, Potter JD, et al. The clinical phenotype of Lynch syndrome due to germ-line PMS2 mutations. *Gastroenterology* 2008; **135**: 419-28.
25. Marra G, D'Atri S, Corti C, Bonmassar L, Cattaruzza MS, Schweizer P, et al. Tolerance of human MSH2+/- lymphoblastoid cells to the methylating agent temozolomide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**: 7164-9.
26. Yang G, Scherer SJ, Shell SS, Yang K, Kim M, Lipkin M, et al. Dominant effects of an Msh6 missense mutation on DNA repair and cancer susceptibility. *Cancer cell* 2004; **6**: 139-50.
27. Lin DP, Wang Y, Scherer SJ, Clark AB, Yang K, Avdievich E, et al. An Msh2 point mutation uncouples DNA mismatch repair and apoptosis. *Cancer Res* 2004; **64**: 517-22.
28. Bakry D, Aronson M, Durno C, Rimawi H, Farah R, Alharbi QK, et al. Genetic and clinical determinants of constitutional mismatch repair deficiency syndrome: report from the constitutional mismatch repair deficiency consortium. *Eur J Cancer* 2014; **50**: 987-96.
29. Okkels H, Lindorff-Larsen K, Thorlasius-Ussing O, Vyberg M, Lindebjerg J, Sunde L, et al. MSH6 mutations are frequent in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families with normal pMSH6 expression as detected by immunohistochemistry. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry* 2012; **20**: 470-7.
30. Grindedal EM, Aarset H, Bjornevoll I, Royset E, Maehle L, Stormorken A, et al. The Norwegian PMS2 founder mutation c.989-1G > T shows high penetrance of microsatellite instable cancers with normal immunohistochemistry. *Hereditary cancer in clinical practice* 2014; **12**: 12.
31. Durno CA, Aronson M, Tabori U, Malkin D, Gallinger S, Chan HS. Oncologic surveillance for subjects with biallelic mismatch repair gene mutations: 10 year follow-up of a kindred. *Pediatric blood & cancer* 2012; **59**: 652-6.
32. Jackson CC, Holter S, Pollett A, Clendenning M, Chou S, Senter L, et al. Cafe-au-lait macules and pediatric malignancy caused by biallelic mutations in the DNA mismatch repair (MMR) gene PMS2. *Pediatric blood & cancer* 2008; **50**: 1268-70.
33. Giunti L, Cetica V, Ricci U, Giglio S, Sardi I, Paglierani M, et al. Type A microsatellite instability in pediatric gliomas as an indicator of Turcot syndrome. *European journal of human genetics : EJHG* 2009; **17**: 919-27.

34. Agostini M, Tibiletti MG, Lucci-Cordisco E, Chiaravalli A, Morreau H, Furlan D, et al. Two PMS2 mutations in a Turcot syndrome family with small bowel cancers. *The American journal of gastroenterology* 2005; **100**: 1886-91.
35. De Vos M, Hayward BE, Picton S, Sheridan E, Bonthron DT. Novel PMS2 pseudogenes can conceal recessive mutations causing a distinctive childhood cancer syndrome. *American journal of human genetics* 2004; **74**: 954-64.
36. De Vos M, Hayward BE, Charlton R, Taylor GR, Glaser AW, Picton S, et al. PMS2 mutations in childhood cancer. *J Natl Cancer Inst* 2006; **98**: 358-61.

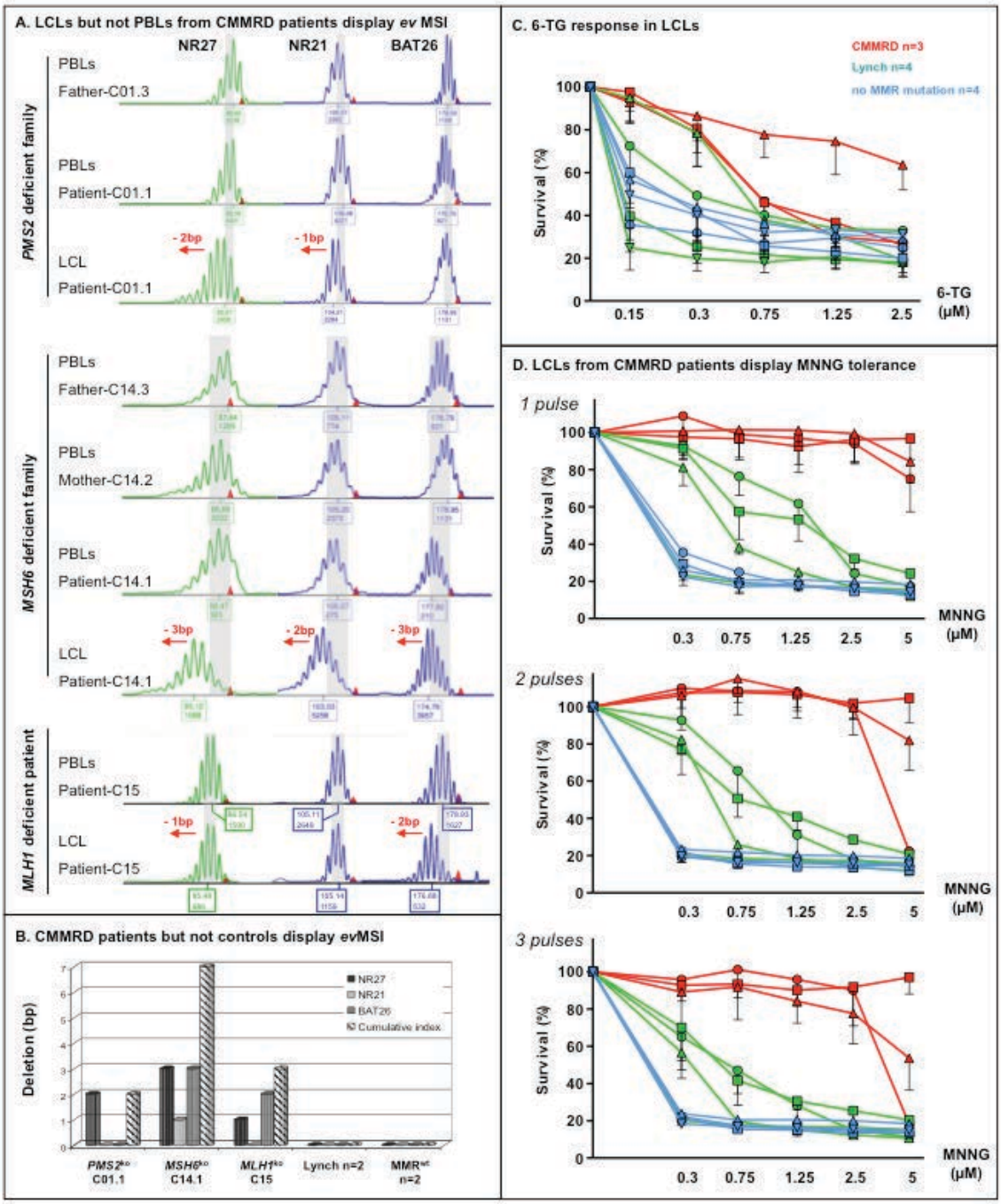


Figure 1. Proof of concept study. (A) LCLs but not PBLs from CMMRD patients display *ev*MSI. Electrophoretograms for the NR21, NR27 and BAT26 microsatellites. Deletions occurred at these loci in lymphoblastoid cell lines (LCLs) derived from CMMRD patients C01.1 (*PMS2*^{ko}), C14.1 (*MSH6* ^{ko}) and C15 (*MLH1*^{ko}) compared to their respective peripheral blood lymphocytes (PBLs). In contrast, using DNA from PBLs, the PCR profiles of these markers were similar between patient C01.1 or C14.1 and their respective parents (C01.3, C14.2 and 14.3), demonstrating that MSI occurred only *ex vivo*. **(B)** CMMRD patients but not controls display *ev*MSI. Deletion sizes (in bp) expressed as the size of deletions of each marker (NR21, NR27 and BAT26) and the cumulative deletion size in LCLs from CMMRD patients (the shortest culture time was chosen) and MMR-proficient controls (the longest culture time was chosen). LCLs

from CMMRD patients C01.1, C14.1 and C15 displayed deletion in allele size whereas no change was detected in the 4 MMR-proficient controls tested, i.e. 2 MMR wild-type and 2 Lynch patients. The cut-off value to define a cell line as positive for *ev*MSI was set at 1 base pair deletion for all 3 markers. **(C)** 6-TG response in LCLs. Sensitivity of LCLs derived from CMMRD patients (red) C01.1, C14.1 and C15 and MMR-proficient individuals including 4 MMR wild-type (blue) and 4 Lynch subjects (green) to increasing concentrations of 6-TG. **(D)** LCLs from CMMRD patients display MNNG tolerance. Sensitivity of LCLs derived from CMMRD patients (red) C01.1, C14.1 and C15 and MMR-proficient individuals including 4 MMR wild-type (blue) and 4 Lynch subjects (green) to increasing concentrations of MNNG. Because of the short half-life (1 hour) of MNNG in aqueous solution, 1, 2 or 3 rounds of treatment at 24-hour intervals were performed. As expected, cell viability decreased with increasing drug concentration and number of treatments. However, cells derived from CMMRD patients displayed mean cell survival values significantly higher than controls without any overlap between the two groups using several experimental conditions.

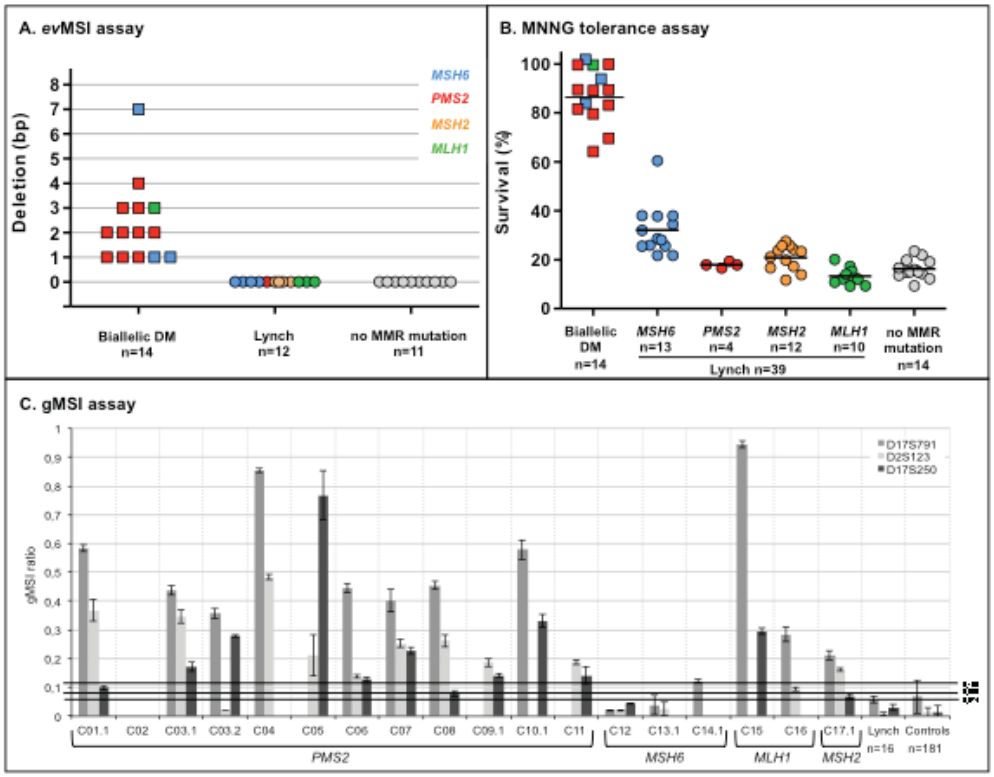


Figure 2. Case-control study. (A) *ev*MSI assay. All 14 biallelic CMMRD patients were *ev*MSI positive but none of the 23 controls. The color indicates the MMR gene that is mutated, *MSH6* (blue), *PMS2* (red), *MSH2* (yellow), *MLH1* (green) and no MMR mutation (grey). **(B)** MNNG tolerance assay using 3 rounds of 1.25 μM MNNG. All 14 biallelic CMMRD patients were drug positive as well as 1 of the 53 controls. **(C)** gMSI assay. Histogram showing gMSI ratios at each marker D17S791 (dark grey 0.095), D2S123 (light grey 0.109), D17S250 (black 0.074) for each of the 18 CMMRD patients. Mean gMSI ratios from 16 Lynch patients and 181 controls are also indicated. Error bars represent the standard error of the mean.

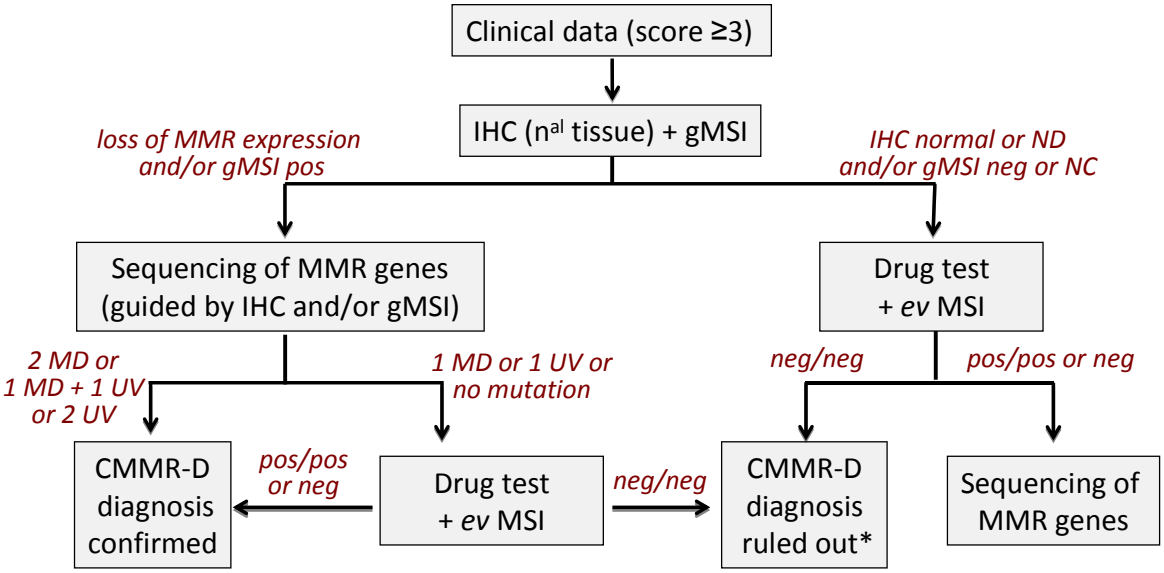


Figure 3. Suggested diagnostic strategy for evaluation of patients suspected of CMMRD.

* but LS should be sought in case of evocative criteria

Table 1. Data set relative to known and putative CMMRD patients.

Patient	Clinical and tumor data[a]	Clinical[b] score	Familial[c] history
C01.1	oligodendroglioma (19 yr); two colorectal cancers (24 yr)	7	S, R
C01.2	CLS; colorectal cancer (MSI / PMS2 normal at 1rst analysis; lost in N and T at 2nd look) with 12 adenomas (20 yr); endometrial cancer (24 yr)	7	S, R
C02	glioblastoma (4 yr)	3	Co, R
C03.1	CLS; pilomatricomas (PMS2 lost in N and T) (2 yr), oligodendroglioma (11 yr)	8	S, Co
C03.2	CLS; pilomatricomas (2 yr), pre B-cell non Hodgkin lymphoma (3 yr); glioblastoma (9 yr)	9	S, Co
C04	pilomatricomas (PMS2 lost in N and T) CLS; glioblastoma (4 yr); B-cell non Hodgkin lymphoma (5 yr);	7	-
C05	glioblastoma (22 yr); colorectal cancer (MSI / PMS2 lost in N and T) with three adenomas (24 yr); osteosarcoma (24 yr)	10	Co
C06	CLS/ testicular T-lymphoblastic lymphoma (5 and 14 yr); rectal cancer (MSI / PMS2 lost in N and T) (16 yr)	8	Co
C07	no CLS; colorectal cancer (22yr); colorectal cancer (MSI / PMS2 lost in N and T) 25yr; glioblastoma (34yr); endometrial cancer (PMS2 lost in N and T) (36 yr); duodenal cancer (MSS/ PMS2 lost in N and T) (37 yr); benin sebaceous cyst (37 yr); multiple colorectal adenomas (>15) (since the age of 22 yr)	8	P, Co
C08	CLS; colorectal cancer (19 yr); colorectal cancer (MSI / PMS2 lost in N and T) (20 yr); lymphoblastic lymphoma (27 yr)	8	-
C09.1	CLS; lymphoblastic lymphoma (4 yr); PMS2 lost in normal skin	5	Co
C10.1	CLS; glioblastoma (6 yr)	4	Co
C11	T-cell lymphoblatic mediastinal lymphoma (14yr), colorectal cancer with polyposis (16 yr)	11	S
C12	CLS; T-non Hodgkin lymphoma (2 yr) since publication	5	Co, R
C13.1	CLS; colon adenomas (10 yr), glioblastoma (12.5 yr); MSH6 lost in tumor of the sister	10	S, R
C14.1	CLS; multiple adenomas (MSS / MSH6 lost in N and T) with high grade dysplasia (9 yr)	8	S, R
C15	CLS; lymphoblastic lymphoma (MLH1 lost in N and T) (5 yr); glioblastoma (MLH1 lost in N and T) (6 yr)	10	Co, S, R
C16	CLS; neurofibroma (6 yr); several adenomas and rectal cancer (15 yr) since publication	9	Co
C17.1	CLS; cavernoma (3 yr), T-cell lymphoblastic lymphoma (3 yr)	6	P, Co
C18	CLS; colorectal cancer (22 yr); colorectal cancer (MSI / PMS2 lost in N and T) with adenoma (32 yr); multiple adenomas with high grade dysplasia (38 yr); glioblastoma (40 yr)	6	R
C19	Colorectal cancer (MSI / PMS2 lost in N and T) (21 yr); glioblastoma (22 yr)	8	S, R
C20.1	CLS; gliomatosis (MSS /MSH6 lost in N and T) (9 yr)	7	Co, S
C20.2	CLS; glioblastoma (MSS / MSH6 weak in N and T) (6 yr)	7	Co, S
C21	CLS; adenomas (14 yr); colorectal cancer (17 and 19 yr); urinary tract carcinoma (MSS / MSH6 lost in N and T) (24 yr)	14	S, R
C22	CLS; colorectal cancer (MLH1, MSH2, PMS2, MSH6 normal in N) (16 yr)	8	Co, S
C23	CLS; T-cell lymphoblastic lymphoma (6 and 11 yr); glioblastoma (14 yr); colorectal cancer (MSS/ MLH1, MSH6, MSH2 normal at 1rst analysis; MSH2 and MSH6 lost in N and T at 2nd look) with polyposis (14 yr)	13	Co
C24	no CLS; colorectal cancer (MSH2 lost in T) (12 yr); 1 skin nodule (neurofibroma histologically not confirmed)	6	R
C25	CLS; colorectal cancer (MSI, MLH1 lost in T; PMS2 lost in N and T) (25 yr); breast cancer (36 yr)	5	R

C26	no CLS; rectal cancer (17 yr); colon cancer (MSI in N and T / PMS2 lost in T) (27 yr)	4	S, R
C27	two colorectal cancers with one adenoma>1cm (30 yr)	3	S, P, R
C28	osteosarcoma (11 yr); urothelial carcinoma (32 and 33 yr); cholangiosarcoma (MLH1 lost in T) (36 yr); colorectal cancer (MLH1 lost in T) (36 yr)	1	-
C29.1	CLS; glioblastoma (PMS2 lost in N and T) (6 yr)	4	R
C30	CLS; T-cell lymphoblastic lymphoma (8 yr)	4	-
C31	lymphosarcoma (5 yr); oligodendroglioma (MSS / MLH1, MSH2 normal in T) (21 yr); thyroid cancer (29 yr)	3	-
C32	Hodgkin lymphoma (11 yr)	3	R
C33	CLS; oligodendroglioma (27 yr)	4	S
C34.1	colorectal tumor (MSI / MLH1 lost in T) (18 yr)	4	S
C35	CLS; glioblastoma (18 yr)	6	R, Co
C36	colorectal tumor (MSI / MLH1 lost in T) (17 yr)	3	-
C37	CLS; adenomatous polyposis (n>50) with duodenal adenomas (*APC*, *MUTYH* negative) (24 yr); bilateral breast cancer (*BRCA* negative) (35 and 37 yr); diffuse gastric cancer (*CDH1* negative) (39 yr)	4	R
C29.2	CLS	NA	S, R
C34.2	pinealoblastoma (MLH1, MSH6, MSH2, PMS2 normal) (12 yr)	4	S

Patient	Germline MMR analysis[d]							Diagnosis [e]
	Gene	Exon	Mutation	Amino-acid change	Type	Classification	Status	
C01.1	*PMS2*	11	c.1730dup	p.Arg578Alafs*3	F	DM	cpd HTZ	CMMRD
		4	c.137G>T	p.Ser46Ile	M	DM		
C01.2	*PMS2*	11	c.1730dup	p.Arg578Alafs*3	F	DM	cpd HTZ	CMMRD
		4	c.137G>T	p.Ser46Ile	M	DM		
C02	*PMS2*	15	c.2521del	p.Trp841Glyfs*10	F	DM	HMZ	CMMRD
		15	c.2521del	p.Trp841Glyfs*10	F	DM		
C03.1	*PMS2*	11	c.1164del	p.His388Glnfs*10	F	DM	HMZ	CMMRD
		11	c.1164del	p.His388Glnfs*10	F	DM		
C03.2	*PMS2*	11	c.1164del	p.His388Glnfs*10	F	DM	HMZ	CMMRD
		11	c.1164del	p.His388Glnfs*10	F	DM		
C04	*PMS2*	7-9	c.(706-?_903+?del)	p.?	LD	DM	cpd HTZ	CMMRD
		9-15	c.(904-?_*+?del)	p.?	LD	DM		
C05	*PMS2*	5	c.400C>T	p.Arg134*	N	DM	cpd HTZ	CMMRD
		5	c.400C>T	p.Arg134*	N	DM		
		11	c.1579del	p.Arg527Glyfs*68	F	DM		
C06	*PMS2*	12	c.2007-2A>G	p.?	S	DM	HMZ	CMMRD
		12	c.2007-2A>G	p.?	S	DM		
C07	*PMS2*	2	c.137G>T	p.Ser46Ile	M	DM	HMZ	CMMRD
		2	c.137G>T	p.Ser46Ile	M	DM		
C08	*PMS2*	2	c.137G>T	p.Ser46Ile	M	DM	HMZ	CMMRD
		2	c.137G>T	p.Ser46Ile	M	DM		
C09.1	*PMS2*	12	c.2007-2A>G	p.?	S	DM	HMZ	CMMRD
		12	c.2007-2A>G	p.?	S	DM		
C10.1	*PMS2*	12	c.2007-2A>G	p.?	S	DM	HMZ	CMMRD
		12	c.2007-2A>G	p.?	S	DM		
C11	*PMS2*	14	c.2275+210_2446-1356del	p.Ala759Glyfs*8	LD	DM	HMZ	CMMRD
		14	c.2275+210_2446-1356del	p.Ala759Glyfs*8	LD	DM		
	MSH2	4	c.728G>A	p.Arg243Gln	M	UV	HTZ	
	MSH6	i3	c.627+25_627+27del	p.?	M	UV	HTZ	
C12	*MSH6*	5	c.3261dupC	p.Phe1088Leufs*5	F	DM	HMZ	CMMRD
		5	c.3261dupC	p.Phe1088Leufs*5	F	DM		
C13.1	*MSH6*	9	c.3984_3987dup	p.Leu1330Valfs*12	F	DM	cpd HTZ	CMMRD
		9	c.3959_3962del	p.Ala1320Glufs*6	F	DM		
C14.1	*MSH6*	4	c.1596_1597dup	p.Glu533Valfs*39	F	DM	cpd HTZ	CMMRD
		5	c.3261del	p.Phe1088Serfs*2	F	DM		
C15	*MLH1*	9	c.678-7_686del	p.?	S	DM	HMZ	CMMRD
		9	c.678-7_686del	p.?	S	DM		
C16	*MLH1*	17	c.1942C>T	p.Pro648Ser	M	DM	HMZ	CMMRD
		17	c.1942C>T	p.Pro648Ser	M	DM		
C17.1	*MSH2*	8	c.1277-?_c.1386+?	p.?	LD	DM	HMZ	CMMRD
		8	c.1277-?_c.1386+?	p.?	LD	DM		
C18	*PMS2*	10	c.989?_1144+?del	p.Glu330_Glu381del	ID	DM	cpd HTZ	inconclusive
		13	c.2249G>A	p.Gly750Asp	M	UV		

C19	*PMS2*	2	c.161T>C	p.Ile54Thr	M	UV	cpd HTZ	inconclusive
		11	c.1831dup	p.Ile611Asnfs2*	F	DM		
C20.1	*MSH6*	4	c.2216C>A	p.Thr739Lys	M	UV	HMZ	inconclusive
		4	c.2216C>A	p.Thr739Lys	M	UV		
C20.2	*MSH6*	4	c.2216C>A	p.Thr739Lys	M	UV	HMZ	inconclusive
		4	c.2216C>A	p.Thr739Lys	M	UV		
C21	*MSH6*	5	c.3261dupC	p.Phe1088Leufs*5	F	DM	cpd HTZ	inconclusive
		4	c.2561_2563del	p.Lys854del	ID	UV		
	MSH2	5	c.832G>A	p.Glu278Lys	M	UV		
C22	*MSH6*	5	c.3184T>C	p.Cys1062Arg	M	UV	HMZ	inconclusive
		5	c.3184T>C	p.Cys1062Arg	M	UV		
	PMS2	11	c.1688G>T	p.Arg563Leu	M	UV	HTZ	
C23	*MSH6*	4	c.1763_1771dup	p.His588_Pro590dup	ID	UV	HMZ	inconclusive
		4	c.1763_1771dup	p.His588_Pro590dup	ID	UV		
C24	*MSH2*	i6	c.1076+1G>A	p.Gly315Ilefs*29	S	DM	cpd HTZ	inconclusive
		i6	c.1077-11A>G	p.?	S	UV		
C25	*PMS2*	11-14	large genomic conversion with PMS2CL	p.?	F	DM	HTZ	Lynch
C26	*PMS2*	i11-i12	c.2007-786_2174+493del1447	p.Ser669_Ala725delinsArg	LD	DM	HTZ	Lynch
C27	*MLH1*	9	c.769del	p.Ile257Serfs*11	F	DM	HTZ	Lynch
	MSH2	5	c.832G>A	p.Glu278Lys	M	UV	HTZ	
C28	*MLH1*	15	c.1731G>A	p.Ser577Ser	S	DM	HTZ	Lynch
C29.1	-	-	no MMR mutation identified	-	-	-	-	not CMMRD
C30	*MSH2*	i4	c.792+16A>G	p.?	S?	UV	HTZ	not CMMRD
C31	-	-	no MMR mutation identified	-	-	-	-	not CMMRD
C32	-	-	no MMR mutation identified	-	-	-	-	not CMMRD
C33	-	-	no MMR mutation identified	-	-	-	-	not CMMRD
C34.1	-	-	no MMR mutation identified	-	-	-	-	not CMMRD
C35	-	-	no MMR mutation identified	-	-	-	-	not CMMRD
C36	-	-	no MMR mutation identified	-	-	-	-	not CMMRD
C37	-	-	no MMR mutation identified	-	-	-	-	not CMMRD
C29.2	-	-	no MMR mutation identified	-	-	-	-	not CMMRD
C34.2	-	-	no MMR mutation identified	-	-	-	-	not CMMRD

Table 1. Data set relative to known and putative CMMRD patients.

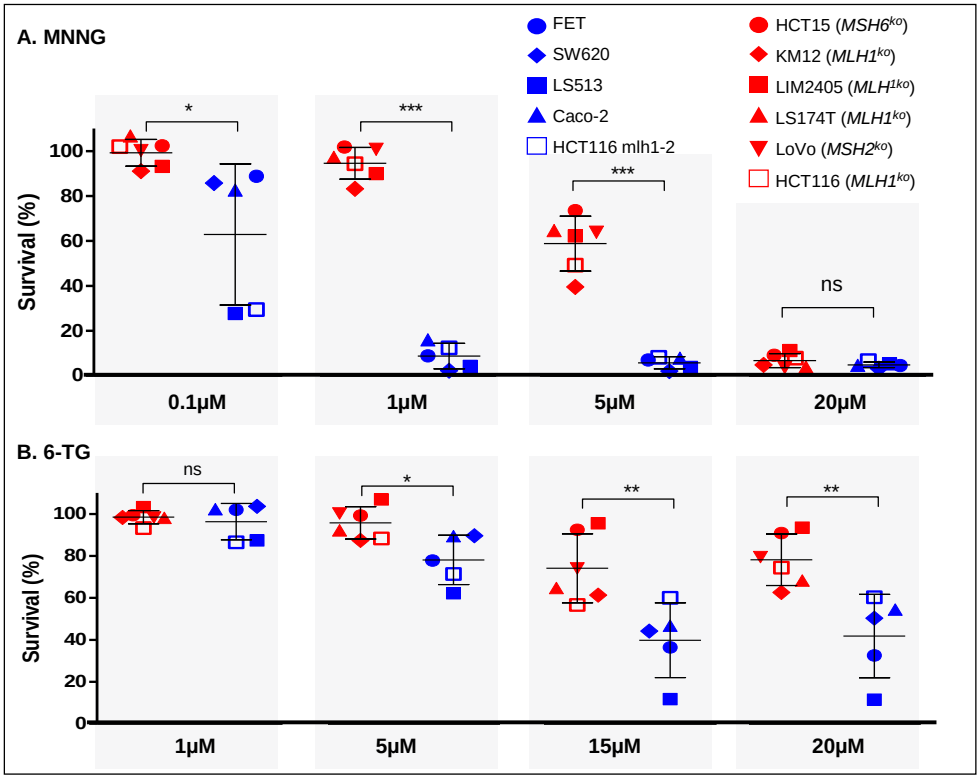
[a] When available, data relative to the microsatellite status of the tumor, i. e. stable (MSS) or unstable (MSI), and to immunohistochemistry for MMR proteins in normal (N) and tumoral (T) tissues are indicated in brackets. CLS, café-au-lait spot; yr, year.

[b] Clinical score according to Wimmer et 2014; NA, not applicable.

[c] Familial history: Co, consanguinity; S, sibling affected with CMMRD associated cancer; P, parent affected with Lynch syndrome associated cancer; R, relative affected with Lynch syndrome or CMMRD associated cancer.

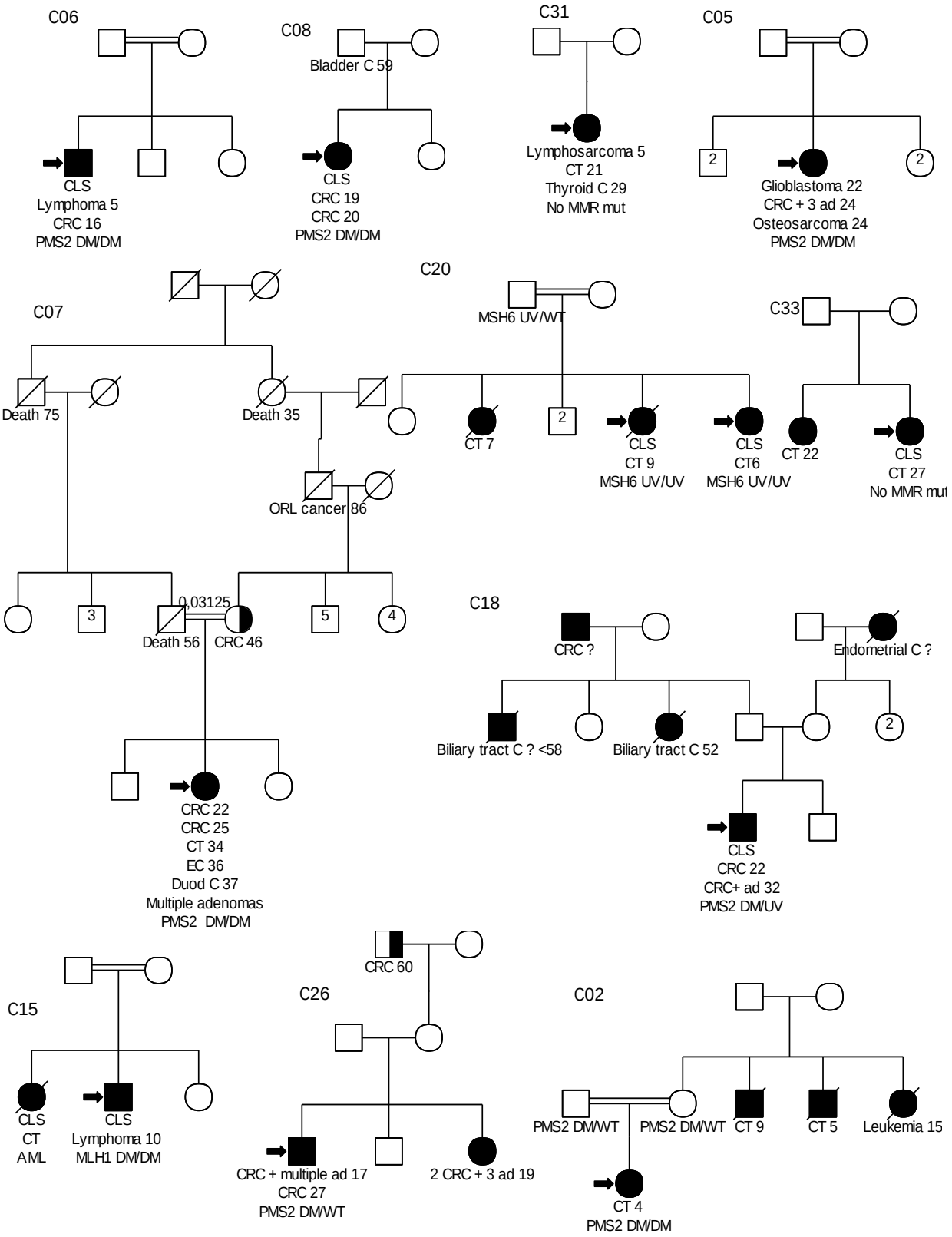
[d] F, frameshift; M, missense; N, nonsense; S, splice; LD, large deletion, ID, in frame deletion or in frame duplication; DM, deleterious mutation; UV, unknown variant; HTZ, heterozygous; HMZ, homozygous; cpd, compound.

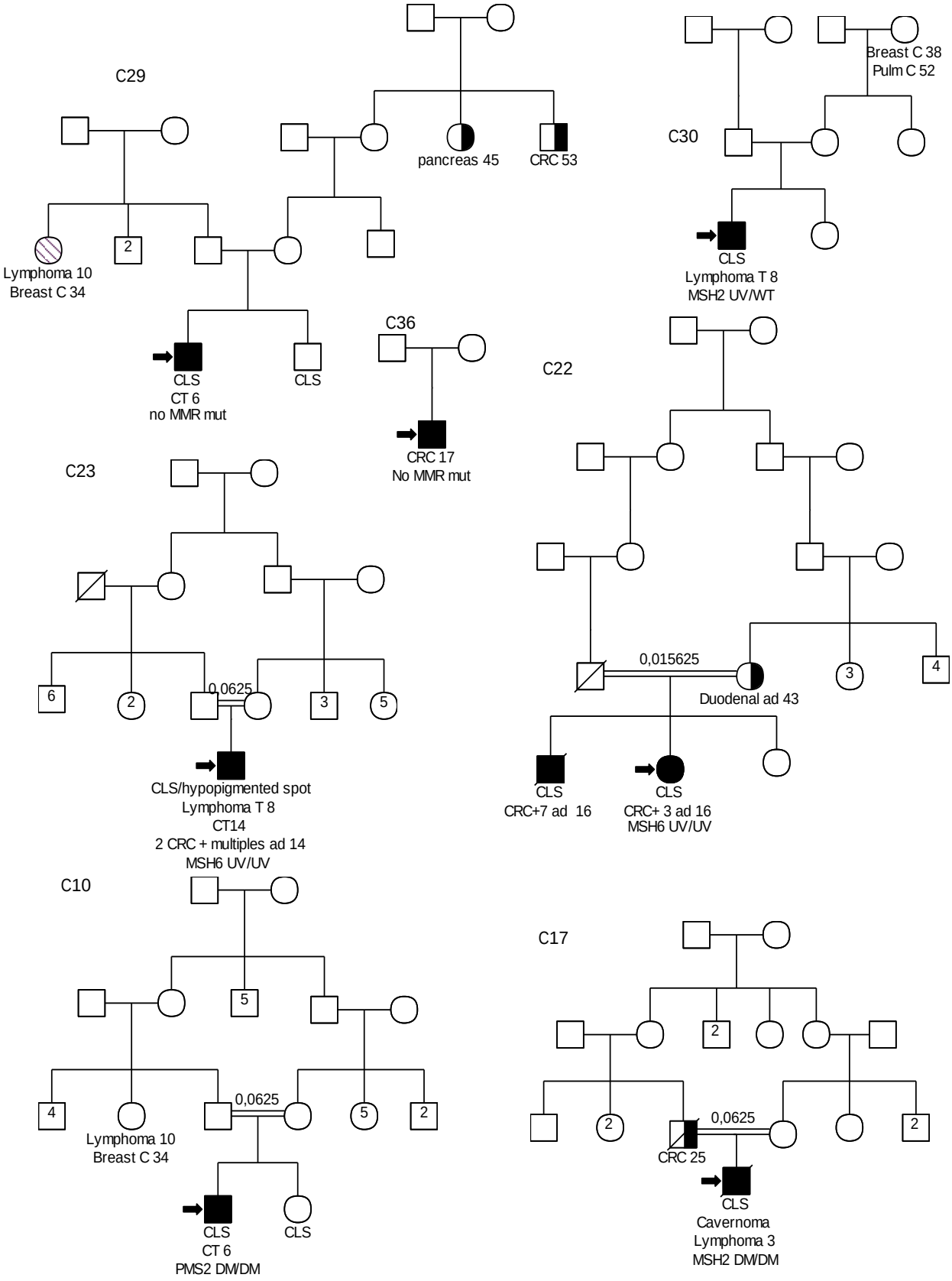
[e] Diagnosis according to germline MMR analysis.

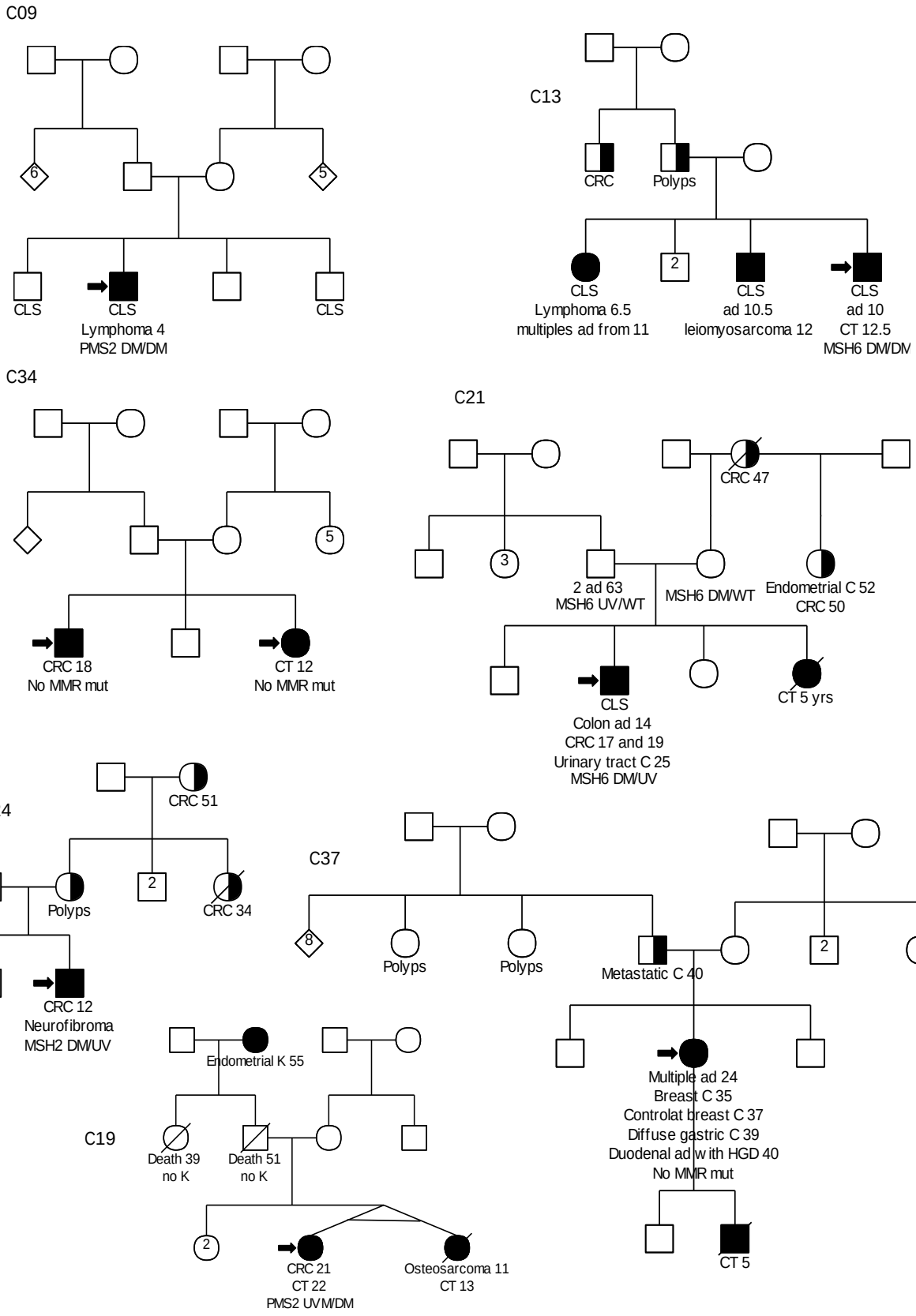


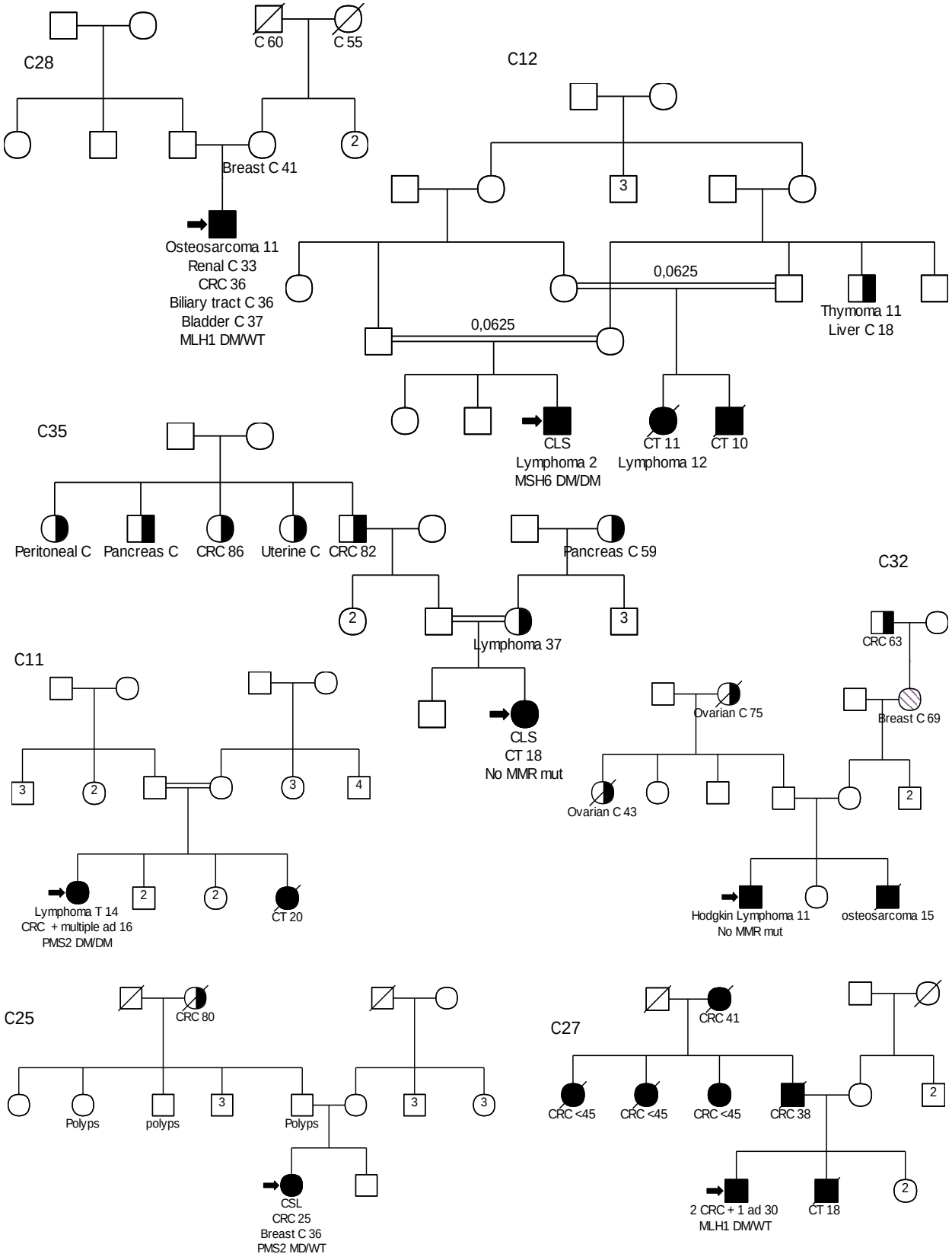
Supplementary Figure S1. Drug tolerance in human colon cancer cell lines. Whatever their MMR defect, 6 MMR-deficient (*MSH6*^{ko}, *MLH1*^{ko}, *MSH2*^{ko}) colon cancer cell lines showed a statistically significant increase (10-fold using 1μM MNNG **(A)** and 2-fold using 15μM 6-TG **(B)**) in the mean cell survival as compared with 4 MMR-proficient cell lines. Mean±SD. * for P<0.05, ** for P<0.01, ***P<0.001 ns not significant, Student's t test.

Supplementary Figure S2. Pedigrees in definite and putative CMMRD patients.

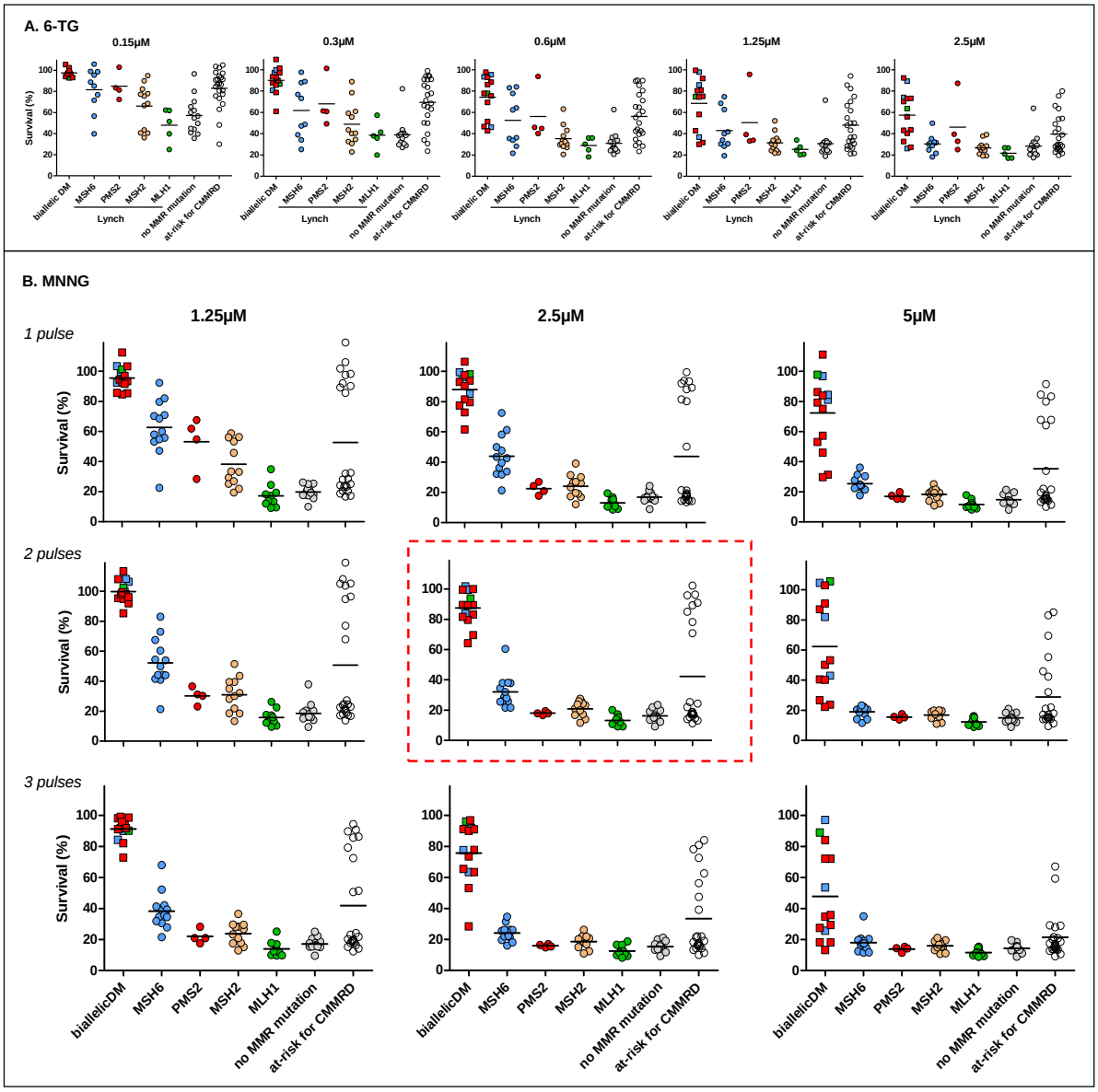



C29
pancreas 45
CRC 53
2
Lymphoma 10
Breast C 34
CLS
CT 6
no MMR mut
CLS
C36
CRC 17
No MMR mut
C30
Breast C 38
Pulm C 52
CLS
Lymphoma T 8
MSH2 UV/WT
C22
0,015625
3
4
Duodenal ad 43
CLS
CRC+7 ad 16
CLS
CRC+ 3 ad 16
MSH6 UV/UV
C23
6
2
0,0625
3
5
CLS/hypopigmented spot
Lymphoma T 8
CT14
2 CRC + multiples ad 14
MSH6 UV/UV
C10
5
4
Lymphoma 10
Breast C 34
0,0625
5
2
CLS
CT 6
PMS2 DM/DM
CLS
C17
2
2
0,0625
2
CRC 25
CLS
Cavernoma
Lymphoma 3
MSH2 DM/DM


C09
6
5
CLS
CLS
Lymphoma 4
PMS2 DM/DM
CLS
C13
CRC
Polyps
2
CLS
Lymphoma 6.5
multiples ad from 11
CLS
ad 10.5
leiomyosarcoma 12
CLS
ad 10
CT 12.5
MSH6 DM/DM
C34
5
CRC 18
No MMR mut
CT 12
No MMR mut
C21
CRC 47
3
2 ad 63
MSH6 UV/WT
MSH6 DM/WT
Endometrial C 52
CRC 50
CT 5 yrs
CLS
Colon ad 14
CRC 17 and 19
Urinary tract C 25
MSH6 DM/UV
C24
CRC 51
2
Polyps
CRC 34
CRC 12
Neurofibroma
MSH2 DM/UV
C37
8
Polyps
Polyps
Metastatic C 40
2
2
Multiple ad 24
Breast C 35
Controlat breast C 37
Diffuse gastric C 39
Duodenal ad w ith HGD 40
No MMR mut
CT 5
C19
Endometrial K 55
Death 39
no K
Death 51
no K
2
CRC 21
CT 22
PMS2 UV M/DM
Osteosarcoma 11
CT 13



Supplementary Figure S2. Pedigrees in definite and putative CMMRD patients. Open circle, female; open square, male; filled circle or square, patient with cancer; diagonal line, dead; double line, consanguinity; CLS, café-au-lait spot; DM, deleterious mutation; UV, unknown variant; AML, acute myeloid leukemia; CT, cerebral tumor; CRC, colorectal cancer. Arrow indicate patient tested.



Supplementary Figure S3. Drug tolerance of LCLs in various conditions of treatment. **(A)** 6-TG was found to be not efficient to discriminate MMR-deficient from MMR-proficient cell lines. **(B)** Because of the short half-life (1 hour) of MNNG in aqueous solution, 1, 2 or 3 rounds of treatment at 24-hour intervals were performed. As expected, cell viability decreased with increasing drug concentration and number of treatments. However, cells derived from CMMRD patients displayed mean cell survival values significantly higher than controls without any overlap between the two groups using several experimental conditions. Whereas *MLH1*$^{+/-}$ LCLs behaved similarly to MMR wild-type lymphoblasts under low concentrations of MNNG, *MSH2*$^{+/-}$ and *MSH6*$^{+/-}$ cell lines exhibited increased cell survival. At higher MNNG concentrations and/or increasing numbers of drug treatments, the survival of *MSH2*$^{+/-}$, *PMS2*$^{+/-}$ and *MSH6*$^{+/-}$ lines decreased to that of *MLH1*$^{+/-}$ and MMR wild-type cells, whereas CMMRD LCLs remained quite resistant to the drug. The best experimental conditions for CMMRD diagnosis were deemed to be 2 rounds of 2.5 μM MNNG. The mean values are indicated.

Supplementary Table S1. Data set relative to all eligible patients and controls.

Patient	Mutated gene	drug tolerance[a]									*ev*MSI[b]			Culture time
		1 pulse MNNG			2 pulses MNNG			3 pulses MNNG						
		1.25μM	2.5μM	5μM	1.25μM	2.5μM	5μM	1.25μM	2.5μM	5μM	BAT26	NR21	NR27	
Previously confirmed CMMRD patients														
C01.1	*PMS2*	96.8 ± 14.1	93.9 ± 10.1	75.1 ± 17.7	108 ± 8.5	99.9 ± 6	22.3 ± 10.7	95.8 ± 12.1	90.1 ± 19.2	18.1 ± 4.8	178 / 178 / 0	106 / 106 / 0	86 / 84 / -2	X
C01.2	*PMS2*	85.6 ± 13.8	77.4 ± 16.4	29.7 ± 11.2	85.3 ± 9.6	69.6 ± 15.8	26.6 ± 11.1	72.8 ± 15.4	24.8 ± 10.8	13.2 ± 4.7	178 / 178 / 0	105 / 105 / 0	86 / 84 / -2	X
C02	*PMS2*	91.6 ± 18.6	97.5 ± 12.6	83.9 ± 12.2	96 ± 11.8	89.1 ± 9	90.9 ± 17.9	91.2 ± 15.8	91 ± 16.1	35.7 ± 8.1	179 / 178 / -1	105 / 105 / 0	87 / 86 / -1	78
C04	*PMS2*	92.5 ± 15	93 ± 17.8	46 ± 13.3	97.9 ± 12.4	89.4 ± 12	50.1 ± 18.6	99.1 ± 12.6	91.2 ± 14.5	72.1 ± 15.1	179 / 179 / 0	105 / 104 / -1	86 / 85 / -1	> 130
C05	*PMS2*	94.4 ± 13.6	79.6 ± 15.2	31.4 ± 10.7	94.9 ± 10.6	79.6 ± 15.6	40.5 ± 17.3	98.1 ± 7.3	77.7 ± 15.1	27.5 ± 12.5	180 / 179 / -1	105 / 103 / -2	85 / 84 / -1	46
C06	*PMS2*	85.3 ± 16.6	61.6 ± 10	53.1 ± 14.1	98 ± 11.6	64.2 ± 17.6	23.8 ± 5.5	98.6 ± 12.7	53.1 ± 11	18.2 ± 1.5	180 / 178 / -2	106 / 105 / -1	86 / 86 / 0	81
C07	*PMS2*	84.6 ± 7.4	72.9 ± 12.6	57.3 ± 10.4	95.3 ± 17.8	83.2 ± 17.7	87 ± 16.3	82.2 ± 15.7	63.5 ± 13.5	72.1 ± 14.3	182 / 182 / 0	105 / 105 / 0	86 / 85 / -1	100
C08	*PMS2*	93.3 ± 8	90.3 ± 13.1	79.3 ± 15.7	99.3 ± 8.4	89.5 ± 10.9	53.2 ± 15.4	91.7 ± 11.8	73.5 ± 12	29.4 ± 6.7	178 / 177 / -1	105 / 104 / -1	86 / 85 / -1	82
C09.1	*PMS2*	112.4 ± 15	106.4 ± 10.9	111 ± 11.6	113.4 ± 14.8	99.6 ± 14.2	102.9 ± 12.9	93.9 ± 16.8	96.8 ± 14.5	84.1 ± 8.7	181 / 180 / -1	105 / 105 / 0	86 / 86 / 0	125
C10.1	*PMS2*	103.2 ± 12.4	81.4 ± 14.3	86.2 ± 17.6	91.9 ± 14.4	81.6 ± 11.3	40.2 ± 16	91.9 ± 8.2	65.5 ± 18.8	34.8 ± 16.8	180 / 180 / 0	105 / 105 / 0	86 / 85 / -1	115
C12	*MSH6*	103.3 ± 13.3	98 ± 18.5	97.7 ± 14.9	102.5 ± 11	93.8 ± 20.1	105.6 ± 8.7	90.2 ± 15.7	96.1 ± 13.7	89 ± 8.1	181 / 181 / 0	105 / 105 / 0	87 / 86 / -1	80
C13.1	*MSH6*	99.5 ± 9.3	85.2 ± 15.3	81.1 ± 13	100.1 ± 17.7	83.9 ± 17.9	43 ± 9.9	97.8 ± 14.5	63.4 ± 18.1	25.7 ± 6.3	179 / 178 / -1	106 / 106 / 0	86 / 86 / 0	70
C14.1	*MSH6*	92.5 ± 14.1	96.1 ± 11.6	96.7 ± 11.2	106.4 ± 8.8	101.8 ± 8.6	104.6 ± 13.4	90.1 ± 8.6	91.8 ± 15.9	97 ± 8.9	178 / 175 / -3	105 / 104 / -1	87 / 84 / -3	X
C15	*MLH1*	101.1 ± 8.5	99.4 ± 16.3	84.3 ± 11.5	108.2 ± 14.2	99.5 ± 14.7	81.9 ± 16.1	84.2 ± 11.8	77.6 ± 16.3	53.6 ± 17.2	179 / 177 / -2	105 / 105 / 0	87 / 86 / -1	64
Patients at-risk for CMMRD														
C20.1	*MSH6*	85.6 ± 19.2	92 ± 18.8	67.8 ± 16.6	96.4 ± 14.5	96.2 ± 13.3	42.3 ± 6.7	85.6 ± 12.5	56.3 ± 9.7	27.9 ± 7.1	180 / 179 / -1	105 / 105 / 0	87 / 87 / 0	45
C20.2	*MSH6*	89.2 ± 15.3	80.3 ± 11.3	33.9 ± 7.7	77 ± 13.6	70.8 ± 16.5	17.1 ± 2.1	72.4 ± 13.6	47.4 ± 8.8	18.6 ± 5.1	180 / 179 / -1	105 / 105 / 0	87 / 86 / -1	45
C18	*PMS2*	92 ± 7.7	89.2 ± 3.1	79.9 ± 15.9	94.8 ± 8.4	89.2 ± 9.7	85 ± 16.4	90.8 ± 6	80.9 ± 6.8	59.3 ± 6.8	180 / 180 / 0	106 / 105 / -1	87 / 87 / 0	X
C27	*MLH1*	23.9 ± 11.3	14.2 ± 2	11.4 ± 1.6	18 ± 1.7	13.1 ± 1.2	11.3 ± 1	14.1 ± 2.5	11.4 ± 1.7	10.6 ± 1	180 / 180 / 0	105 / 105 / 0	86 / 86 / 0	182
C25	*PMS2*	16.7 ± 1.8	14.5 ± 2	14.8 ± 2.9	17.1 ± 2.1	15.3 ± 2.6	15.5 ± 2.3	18.9 ± 5.9	16.8 ± 2.7	16.3 ± 2.6	180 / 180 / 0	105 / 105 / 0	87 / 87 / 0	344
C22	*MSH6*	101.7 ± 5.3	93.8 ± 8	84.5 ± 7.6	108.2 ± 9.2	102.3 ± 12.2	83.1 ± 11.6	89.7 ± 16.2	78.2 ± 11.7	67.1 ± 12.5	180 / 179 / -1	105 / 105 / 0	87 / 87 / 0	68
C24	*MSH2*	90.1 ± 13.2	50.2 ± 17.1	22.1 ± 3.9	67.9 ± 12	24.3 ± 6.6	14.3 ± 1.3	50.7 ± 19.9	22 ± 5.6	13.4 ± 2	181 / 181 / 0	106 / 106 / 0	87 / 87 / 0	140
C30	*MSH2*	23.4 ± 7.2	17.1 ± 2.7	15.7 ± 2.4	20.9 ± 4.6	17.4 ± 2.5	15.1 ± 2.9	16.5 ± 5.4	16.1 ± 2.8	13.7 ± 3	180 / 180 / 0	106 / 106 / 0	87 / 87 / 0	125
C19	*PMS2*	97.4 ± 11.1	81.4 ± 9.6	64.1 ± 17.3	105.2 ± 9.5	95.8 ± 4.7	55.3 ± 17.9	94.4 ± 14.8	62.6 ± 11.8	29.1 ± 8.1	181 / 178 / -2	106 / 105 / -1	87 / 86 / -1	70
C21	*MSH6*	106 ± 10.8	88.1 ± 19.4	83.3 ± 18.4	105 ± 15	84.9 ± 18.7	45.9 ± 19.5	79.3 ± 19.7	72.6 ± 16.3	15.8 ± 1.3	180 / 180 / 0	105 / 105 / 0	86 / 86 / 0	270

C28	*MLH1*	17.2 ± 2.4	14.3 ± 3.1	13.3 ± 1.5	17.2 ± 3.4	14.1 ± 1.5	14 ± 1.6	18 ± 5.4	13.3 ± 1.2	13.6 ± 1.6	180 / 180 / 0	106 / 106 / 0	88 / 88 / 0	203
C26	*PMS2*	23.3 ± 6.5	19.3 ± 1.6	19.5 ± 3.9	27.1 ± 3.8	25.2 ± 7.4	21.1 ± 4.1	24.2 ± 3.6	21.4 ± 3.2	21.6 ± 3.9	179 / 179 / 0	105 / 105 / 0	86 / 86 / 0	139
C23	*MSH6*	98.2 ± 11.4	93.4 ± 8.4	91.5 ± 15.4	103.7 ± 17.3	90.9 ± 10.4	69.5 ± 15.9	86.3 ± 19.3	84.1 ± 17.7	28.9 ± 13.7	181 / 180 / -1	104 / 104 / 0	87 / 87 / 0	247
C29.1	-	121.5 ± 17.2	99.4 ± 13.8	67.8 ± 13.7	122.1 ± 10.5	78.2 ± 20.6	32.1 ± 5.7	51.5 ± 8.6	39.1 ± 15.8	20.9 ± 2.4	181 / 180 / -1	101 / 100 / -1	86 / 86 / 0	66
C29.2	-	20.6 ± 5	15 ± 1.5	14.8 ± 1.2	16.7 ± 1.5	14.6 ± 1	14.3 ± 0.7	15.2 ± 1.8	14.3 ± 1.1	13.6 ± 0.9	180 / 180 / 0	101 / 101 / 0	86 / 86 / 0	105
C31	-	25 ± 13	13.4 ± 3	10 ± 1.6	13.7 ± 2.7	11.4 ± 1.6	9.5 ± 0.7	12.4 ± 1.3	10 ± 0.7	9.2 ± 0.6	180 / 180 / 0	105 / 105 / 0	86 / 86 / 0	70
C32	-	18.7 ± 1.4	16.8 ± 2.2	14.9 ± 1.1	18.8 ± 3.6	17.4 ± 3	15.3 ± 1.3	17.7 ± 1.4	16.4 ± 1.5	15.1 ± 1.1	180 / 180 / 0	106 / 106 / 0	87 / 87 / 0	131
C33	-	32 ± 15	21.2 ± 5.2	17 ± 5.5	24.7 ± 6.7	18.8 ± 5.6	17.1 ± 5.3	21.8 ± 5.2	19.1 ± 6.3	17.1 ± 6.1	180 / 180 / 0	105 / 105 / 0	87 / 87 / 0	80
C34.1	-	28.5 ± 5.9	17.4 ± 3.4	15.8 ± 2.7	22.9 ± 6.3	17.4 ± 2.3	15.2 ± 2	18.7 ± 5.1	14.5 ± 1.9	12.7 ± 1.2	181 / 181 / 0	105 / 105 / 0	87 / 87 / 0	150
C34.2	-	28.1 ± 2.6	21.5 ± 3.2	21.6 ± 3.9	24.3 ± 3.9	21.6 ± 3.9	21.7 ± 4.7	23 ± 4.9	21.9 ± 4.1	20.2 ± 4.8	180 / 180 / 0	105 / 105 / 0	86 / 86 / 0	140
C35	-	24.2 ± 9.1	15.3 ± 2.1	14.1 ± 2.4	22.5 ± 7.9	17 ± 3.4	15.2 ± 3.9	20.3 ± 3.7	18.2 ± 6.5	14.7 ± 2.5	180 / 180 / 0	106 / 106 / 0	87 / 87 / 0	144
C36	-	20.2 ± 6.7	18.2 ± 5.9	17.7 ± 7.3	21.4 ± 9.3	18.5 ± 7	18 ± 7.1	19.3 ± 7	17.6 ± 6.1	17.5 ± 6.3	180 / 180 / 0	105 / 105 / 0	87 / 87 / 0	175
C37	-	32.5 ± 11.2	18.7 ± 4.3	15.6 ± 2	24.4 ± 7.3	17.2 ± 3.4	15.2 ± 2.4	19.9 ± 5.1	15.8 ± 3.7	14.2 ± 3.1	180 / 180 / 0	106 / 106 / 0	87 / 87 / 0	135
MMR wild-type patients														
A3	*APC*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	180 / 180 / 0	106 / 106 / 0	87 / 87 / 0	> 120
A2	*APC*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	180 / 180 / 0	105 / 105 / 0	87 / 87 / 0	> 120
A1	*APC*	17.9 ± 2.2	16.4 ± 2.2	13.8 ± 2.1	16.3 ± 2.9	14.8 ± 2.3	14.7 ± 3.9	16.1 ± 1.7	14.7 ± 1.5	13.6 ± 2.9	180 / 180 / 0	105 / 105 / 0	86 / 86 / 0	> 120
A5	*APC*	15.6 ± 3.5	15.5 ± 3.3	14.6 ± 2.9	16.1 ± 3.6	15.5 ± 4	15.3 ± 2.5	15.3 ± 3.3	14.8 ± 3.5	13.6 ± 2.9	ND	ND	ND	ND
A8	*APC*	18 ± 3.2	14.6 ± 1	13 ± 1	14 ± 1.6	13.6 ± 1	12 ± 0.9	15.1 ± 1.3	13.6 ± 0.9	14 ± 1.2	180 / 180 / 0	105 / 105 / 0	87 / 87 / 0	223
N1	*NF1*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	180 / 180 / 0	106 / 106 / 0	87 / 87 / 0	122
N3	*NF1*	20.8 ± 1.2	19.7 ± 1.3	18.3 ± 1.4	20.3 ± 1	19.8 ± 1.4	18.5 ± 1.2	20.5 ± 1.4	20 ± 1.2	18.4 ± 1	181 / 181 / 0	105 / 105 / 0	87 / 87 / 0	83
X1	NA	25.3 ± 4.8	16.2 ± 3	13.4 ± 3.1	17.9 ± 3.6	14.4 ± 4.1	13.2 ± 3	18.6 ± 2.9	15 ± 2.3	13.6 ± 2.6	ND	ND	ND	ND
X2	NA	20.5 ± 4	18.3 ± 3.9	17.1 ± 4.5	19.2 ± 4.4	19.1 ± 4.7	18 ± 5.3	17.5 ± 2.8	16.6 ± 2.7	15.7 ± 2	180 / 180 / 0	105 / 105 / 0	87 / 87 / 0	135
X5	NA	22.2 ± 3.9	17.5 ± 2.3	14.4 ± 1.9	20.1 ± 1.8	16.7 ± 1.1	15.4 ± 1.6	17.5 ± 2.4	16.8 ± 2.6	15.4 ± 2.3	180 / 180 / 0	106 / 106 / 0	86 / 86 / 0	138
X7	NA	17.5 ± 2.3	16.3 ± 1.9	14.2 ± 2.1	16.2 ± 2.1	16 ± 2.8	15.1 ± 3.2	16.3 ± 2.1	15.6 ± 2.4	14.9 ± 2.2	180 / 180 / 0	105 / 105 / 0	86 / 86 / 0	142
X12	NA	10 ± 1.6	8.9 ± 1	8.1 ± 0.7	9.4 ± 1.1	9.3 ± 0.8	9 ± 1	9.6 ± 0.8	9.3 ± 0.8	9 ± 1.4	180 / 180 / 0	105 / 105 / 0	87 / 87 / 0	173
X14	NA	25 ± 2.4	21.4 ± 2	19.7 ± 0.7	24.1 ± 4.4	21.9 ± 3.2	21 ± 2.1	22.3 ± 3	21.1 ± 2.5	19.5 ± 2.1	ND	ND	ND	ND
X13	NA	17.7 ± 3.5	14.6 ± 2.6	13.6 ± 2.2	16.3 ± 2.8	15.1 ± 2.6	13.4 ± 2.3	15.4 ± 3.4	13.7 ± 2.4	13.3 ± 1.8	ND	ND	ND	ND
X17	NA	26 ± 5.4	24.2 ± 5.3	21.3 ± 5.7	37.8 ± 15.3	23.5 ± 6.7	18.4 ± 4.5	25 ± 8.4	19 ± 5.8	15.1 ± 2.5	181 / 181 / 0	105 / 105 / 0	85 / 85 / 0	237
Lynch patients														
C20.3	*MSH6*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	180 / 180 / 0	105 / 105 / 0	86 / 86 / 0	122

L13	*MLH1*	13.3 ± 1.8	12.8 ± 1.2	11.4 ± 1.2	13.1 ± 2.1	12.2 ± 1.4	11.5 ± 1.4	13.2 ± 1.8	12.3 ± 2	11.5 ± 1.9	180 / 180 / 0	106 / 106 / 0	87 / 87 / 0	> 120
L15	*MLH1*	17.2 ± 1.9	16.8 ± 1.7	15.4 ± 1.3	17.5 ± 1.3	17.3 ± 0.7	15.8 ± 0.6	16.9 ± 2.4	16.5 ± 2.2	15.3 ± 1.6	180 / 180 / 0	105 / 105 / 0	87 / 87 / 0	252
L20	*MLH1*	24.4 ± 11.5	15 ± 3.8	12.4 ± 1.9	22.5 ± 11.5	15.3 ± 3.9	12.9 ± 1.2	17.7 ± 1.8	16.4 ± 0.9	14.6 ± 0.9	180 / 180 / 0	106 / 106 / 0	86 / 86 / 0	126
L12	*MSH2*	45.8 ± 7	39 ± 10.6	20.6 ± 4.1	39.4 ± 9.5	24.2 ± 5.6	19.6 ± 4.3	28.1 ± 7.7	20.7 ± 3.2	18.9 ± 3.3	178 / 178 / 0	106 / 106 / 0	87 / 87 / 0	249
L14	*MSH2*	29.2 ± 5.5	23.3 ± 3.3	19.2 ± 3.4	28.1 ± 3.7	21.1 ± 2.2	19 ± 2.2	23.4 ± 2.6	21.1 ± 2.6	18.3 ± 3	180 / 180 / 0	105 / 105 / 0	87 / 87 / 0	> 120
L16	*MSH2*	25.1 ± 6.9	16.8 ± 3	12.2 ± 2.3	18.4 ± 1.9	13.9 ± 2.5	11.7 ± 2	15.1 ± 3.5	12.3 ± 1.2	10.8 ± 1.1	180 / 180 / 0	106 / 106 / 0	86 / 86 / 0	207
L18	*MSH2*	33.4 ± 12.5	19 ± 2.3	13.9 ± 1.9	21.8 ± 2.1	17.3 ± 1.8	14.8 ± 2.1	17.5 ± 2.9	15 ± 1.7	13.2 ± 1	179 / 179 / 0	105 / 105 / 0	85 / 85 / 0	214
L17	*MSH6*	53.2 ± 11.5	32.2 ± 5.8	24.2 ± 6.9	40.9 ± 7.3	28.6 ± 1.9	20.8 ± 5.8	30.6 ± 4.8	25.4 ± 5.7	20.4 ± 8	179 / 179 / 0	105 / 105 / 0	86 / 86 / 0	304
L19	*MSH6*	58 ± 16.8	42.6 ± 19	22.6 ± 9.7	49.8 ± 17	25.6 ± 6.9	14 ± 3.2	38.8 ± 10.6	26.2 ± 13.8	12.4 ± 2	179 / 179 / 0	106 / 106 / 0	85 / 85 / 0	203
C13.2	*MSH6*	47.2 ± 12.2	36.2 ± 9.9	24.9 ± 8.5	41.5 ± 16.4	28 ± 8	20.5 ± 2.8	34.6 ± 10.3	21.9 ± 4.3	19 ± 2.3	180 / 180 / 0	105 / 105 / 0	87 / 87 / 0	100
C09.2	*PMS2*	54.7 ± 16.9	20.9 ± 6.7	15.3 ± 2.2	30.2 ± 12.6	17.9 ± 5.1	15.3 ± 3.3	21 ± 5.2	15.4 ± 2.3	14.2 ± 3.2	181 / 181 / 0	105 / 105 / 0	87 / 87 / 0	120
L42	*PMS2*	28.4 ± 11.8	17.7 ± 3.5	15.4 ± 2.7	23.1 ± 6.5	16.6 ± 3.1	15.6 ± 2.7	17.5 ± 3.7	16.4 ± 3.3	15.2 ± 2.7	ND	ND	ND	ND
L4	*MLH1*	34.9 ± 16.2	19.4 ± 3.2	17.8 ± 2.7	26.1 ± 5.3	20.1 ± 3	16.1 ± 2.8	25.1 ± 11.5	18.7 ± 3.8	12.9 ± 1	ND	ND	ND	ND
L5	*MSH2*	33.1 ± 6.5	26 ± 4.8	20.4 ± 0.6	32.1 ± 5.5	25.8 ± 6.4	17.1 ± 0.9	36.5 ± 14.4	26.1 ± 5.5	19.5 ± 1.7	ND	ND	ND	ND
L7	*MSH2*	56.3 ± 16	27 ± 9.5	25 ± 7.8	51.4 ± 19.7	27.5 ± 13.6	18.8 ± 5.4	28.3 ± 11.4	18.6 ± 5.4	15.5 ± 3.6	ND	ND	ND	ND
L3	*MSH2*	53.3 ± 18.3	26.6 ± 8.8	19.2 ± 4.1	39.4 ± 10.2	23.3 ± 3.4	16.9 ± 4.1	26.6 ± 5.8	17.9 ± 4.8	14.9 ± 3.7	ND	ND	ND	ND
L34	*MSH6*	59.9 ± 15.3	43.3 ± 6.1	17.6 ± 3.2	53.9 ± 9.5	25.9 ± 9	11.6 ± 0.4	42.1 ± 9.9	16 ± 3.1	11.6 ± 0.7	ND	ND	ND	ND
L33	*MSH2*	26.9 ± 9	19.6 ± 6.4	19.2 ± 3.6	30 ± 13.1	19.8 ± 4.4	17.5 ± 2.7	21 ± 4	20.1 ± 4.7	16.6 ± 2	ND	ND	ND	ND
L29	*MSH2*	56 ± 9.4	30.1 ± 5	21.6 ± 3.1	34.9 ± 7.9	23.8 ± 2.1	20 ± 2	29.6 ± 6	21.8 ± 2.1	21.1 ± 1.5	ND	ND	ND	ND
L24	*MSH2*	21.9 ± 4.6	17.3 ± 2.7	16.4 ± 3.7	18.5 ± 3.3	16.7 ± 2.8	15.7 ± 3	17.8 ± 2.8	16.9 ± 2.7	15 ± 1.7	ND	ND	ND	ND
L23	*MSH2*	58.7 ± 13	31.4 ± 10.6	21.1 ± 4.3	43.5 ± 15.9	25.7 ± 5.8	19.8 ± 2.6	29.5 ± 8.1	21.9 ± 4.1	17 ± 1.1	ND	ND	ND	ND
L40	*PMS2*	67.5 ± 9	27 ± 7.6	19.8 ± 3.8	36.4 ± 8.7	19.4 ± 2.9	17.5 ± 2.9	21 ± 5.7	16.9 ± 3.6	14.4 ± 0.6	ND	ND	ND	ND
L41	*PMS2*	61.8 ± 7	24.2 ± 8.7	17.4 ± 3.7	31.1 ± 13.6	17.9 ± 4.2	13.8 ± 2.3	28.2 ± 12.1	14.9 ± 1.8	11.5 ± 2.3	ND	ND	ND	ND
L47	*MSH6*	70.9 ± 12.6	47.6 ± 15.5	30.3 ± 12.6	60.3 ± 15.8	34.4 ± 10.1	22.6 ± 5.5	39.2 ± 17.6	26 ± 8.3	17 ± 1.3	ND	ND	ND	ND
L21	*MSH2*	19.4 ± 7.6	12 ± 2.7	10.9 ± 1.2	13.2 ± 2.1	11.7 ± 0.9	11 ± 0.7	12.9 ± 2.2	11 ± 1	11.1 ± 0.7	ND	ND	ND	ND
L27	*MLH1*	12 ± 4.8	10.8 ± 4.5	10.1 ± 4.2	15.9 ± 6.4	14 ± 5	15.2 ± 5.5	9.8 ± 1.7	8.2 ± 1.7	8.8 ± 0.6	ND	ND	ND	ND
L50	*MSH6*	79.6 ± 14.5	58.2 ± 12.9	27.7 ± 5.1	72.9 ± 14.8	37.9 ± 10.6	18.7 ± 3.8	52.2 ± 18.4	24.6 ± 8.5	16.4 ± 3.7	ND	ND	ND	ND
L52	*MSH6*	68.5 ± 8.4	49.9 ± 12.4	31.4 ± 7	54.4 ± 10	38 ± 8.8	21.6 ± 3.7	41.2 ± 10.8	26.1 ± 6.8	17.5 ± 1.6	ND	ND	ND	ND
L53	*MSH6*	92.3 ± 9.5	72.5 ± 9.2	36 ± 13.5	83 ± 12.3	60.4 ± 10.1	23.3 ± 7.4	68 ± 10.1	34.7 ± 11.6	17.5 ± 5.6	ND	ND	ND	ND
L54	*MSH6*	82 ± 17.2	61.2 ± 14.2	24.5 ± 13.2	67.5 ± 12.1	32 ± 9.8	13.9 ± 3.8	31.9 ± 2.5	18.1 ± 5	11.7 ± 2	ND	ND	ND	ND

L55	*MSH6*	55.8 ± 16	39.5 ± 14.4	23.3 ± 2.8	44.2 ± 11.8	37.8 ± 14.8	20.6 ± 1.3	35.7 ± 8.7	31.5 ± 12.9	35 ± 17.2	ND	ND	ND	ND
L56	*MLH1*	21.7 ± 7.9	15.7 ± 2.7	12.5 ± 3.2	15.9 ± 2	15 ± 1.5	14 ± 0.5	16 ± 1.9	13.3 ± 1.4	12.9 ± 0.6	ND	ND	ND	ND
L28	*MLH1*	9.5 ± 0.9	9 ± 0.5	8.9 ± 1	10.3 ± 1	9.3 ± 1.1	9.6 ± 1.2	10 ± 0.9	9.3 ± 1.1	9.8 ± 1.2	ND	ND	ND	ND
L43	*MLH1*	13.7 ± 2.6	11.8 ± 1.5	11.3 ± 1.5	13 ± 1.5	12.5 ± 1.6	11.9 ± 1.5	12.5 ± 1.3	12.2 ± 1.3	11.8 ± 1.7	ND	ND	ND	ND
L44	*MLH1*	19.3 ± 15.6	10.6 ± 3.2	9.9 ± 2.1	12.1 ± 3.6	10.8 ± 2.3	10.3 ± 1.8	11.7 ± 2.8	10.6 ± 2	11.1 ± 2.9	ND	ND	ND	ND
L45	*MLH1*	18.3 ± 5.2	15.4 ± 6.7	10.4 ± 3.5	17.2 ± 6.7	12.1 ± 3.7	10.5 ± 3.1	12.4 ± 3.1	11.4 ± 3.9	10.6 ± 2.8	ND	ND	ND	ND
L46	*MLH1*	9.2 ± 2.8	8.5 ± 2.1	8.2 ± 1.7	9.5 ± 2.3	9.2 ± 1.8	8.9 ± 1.8	9.7 ± 2.5	9.9 ± 3.3	9.3 ± 1.6	ND	ND	ND	ND
L48	*MSH6*	70.2 ± 14.7	31.7 ± 7.9	21.4 ± 2	44.3 ± 14.9	21.7 ± 2.8	17.5 ± 2.6	27.8 ± 7.3	19.6 ± 4.8	14.7 ± 1.9	ND	ND	ND	ND
L49	*MSH6*	22.4 ± 1.8	21.2 ± 2	24.1 ± 10.4	21.3 ± 1.7	21.7 ± 2.2	20.1 ± 1.4	21.6 ± 1	21.5 ± 1.2	20.6 ± 2	ND	ND	ND	ND
L51	*MSH6*	54.8 ± 11	33.7 ± 9.3	22.4 ± 4.3	43.9 ± 14.8	25.5 ± 6.1	21.6 ± 5.2	34.5 ± 10	22.3 ± 5.4	19.6 ± 5.2	ND	ND	ND	ND

Supplementary Table S1. Data set relative to all eligible patients and controls.

[a] For each drug concentration, mean cell survival (%) ± SD are indicated.

[b] The size (in base pairs) of each marker is indicated in peripheral blood lymphocytes, in immortalized lymphocytes, along with the difference between the two (i.e. deletion size) at the indicated culture time (in days). For the cell lines displaying a shift in allele size, the shortest culture time showing *ev*MSI is indicated, whereas for the cell lines displaying stable allele profiles, the longest culture time is indicated. Culture time was calculated from the day of lymphoblast immortalization. Cell lines were scored as *ev*MSI positive if at least 1 base pair deletion was observed at all 3 markers. Since peripheral blood lymphocytes were not available for CMMRD patient B2, comparison of the allele size was performed with primary blood lymphocytes from the father.

NA, not applicable; ND, not done; X, unknown.

Patient	Mutated gene	gMSI[c]			
		D17S791	D2S123	D17S250	Interprétation
Previously confirmed CMMRD patients					
C01.1	*PMS2*	0.58 ± 0.012	0.37 ± 0.037	0.10 ± 0.006	positive
C01.2	*PMS2*	ND	ND	ND	ND
C02	*PMS2*	0.39 ± 0.009	0.25 ± 0.036	0.28 ± 0.002	NI
C04	*PMS2*	0.85 ± 0.007	0.48 ± 0.008	0.17 ± 0.002	positive
C05	*PMS2*	0.43 ± 0.017	0.21 ± 0.071	0.77 ± 0.086	positive
C06	*PMS2*	0.40 ± 0.040	0.25 ± 0.015	0.23 ± 0.012	positive
C07	*PMS2*	0.45 ± 0.016	0.14 ± 0.005	0.13 ± 0.009	positive
C08	*PMS2*	0.45 ± 0.013	0.26 ± 0.021	0.08 ± 0.009	positive
C09.1	*PMS2*	0.39 ± 0.023	0.14 ± 0.015	0.11 ± 0.007	positive
C10.1	*PMS2*	0.58 ± 0.034	0.17 ± 0.044	0.33 ± 0.023	positive
C12	*MSH6*	0.00 ± 0.000	0.00 ± 0.000	0.04 ± 0.002	negative
C13.1	*MSH6*	0.04 ± 0.034	0.03 ± 0.023	0.02 ± 0.014	negative
C14.1	*MSH6*	0.12 ± 0.005	0.03 ± 0.004	0.03 ± 0.004	NI
C15	*MLH1*	0.94 ± 0.012	0.24 ± 0.007	0.29 ± 0.011	positive
C03.1	*PMS2*	0.44 ± 0.016	0.35 ± 0.023	0.17 ± 0.016	positive
C03.2	*PMS2*	0.36 ± 0.018	0.00 ± 0.000	0.28 ± 0.004	positive
C11	*PMS2*	0.38 ± 0.018	0.19 ± 0.007	0.14 ± 0.029	positive
C16	*MLH1*	0.28 ± 0.025	0.09 ± 0.006	0.05 ± 0.006	NI
C17.1	*MSH2*	0.21 ± 0.016	0.16 ± 0.006	0.07 ± 0.008	positive
Patients at-risk for CMMRD					
C20.1	*MSH6*	0.09 ± 0.005	0.03 ± 0.002	0.04 ± 0.013	negative
C20.2	*MSH6*	0.09 ± 0.005	0.04 ± 0.005	0.05 ± 0.010	negative
C18	*PMS2*	0.16 ± 0.007	0.05 ± 0.003	0.04 ± 0.002	negative
C27	*MLH1*	0.08 ± 0.001	0.00 ± 0.000	0.02 ± 0.001	negative
C25	*PMS2*	0.06 ± 0.004	0.03 ± 0.001	0.01 ± 0.013	negative
C22	*MSH6*	0.09 ± 0.009	0.03 ± 0.027	0.04 ± 0.005	negative
C24	*MSH2*	0.07 ± 0.002	0.03 ± 0.002	0.01 ± 0.014	negative
C30	*MSH2*	0.05 ± 0.002	0.03 ± 0.009	0.04 ± 0.010	negative
C19	*PMS2*	0.24 ± 0.015	0.02 ± 0.028	0.36 ± 0.021	NI
C21	*MSH6*	0.02 ± 0.034	0.00 ± 0.000	0.02 ± 0.017	negative
C28	*MLH1*	0.08 ± 0.002	0.01 ± 0.018	0.04 ± 0.006	negative
C26	*PMS2*	0.08 ± 0.002	0.00 ± 0.000	0.02 ± 0.002	negative
C23	*MSH6*	0.09 ± 0.006	0.06 ± 0.007	0.04 ± 0.005	negative
C29.1	-	0.41 ± 0.049	0.18 ± 0.021	0.29 ± 0.008	positive
C29.2	-	0.02 ± 0.041	0.01 ± 0.019	0.02 ± 0.001	negative
C31	-	0.08 ± 0.003	0.00 ± 0.000	0.04 ± 0.001	negative
C32	-	0.07 ± 0.005	0.03 ± 0.003	0.03 ± 0.004	negative
C33	-	0.07 ± 0.005	0.00 ± 0.000	0.02 ± 0.016	NI
C34.1	-	0.05 ± 0.043	0.03 ± 0.001	0.00 ± 0.000	negative
C34.2	-	0.05 ± 0.027	0.00 ± 0.000	0.03 ± 0.046	negative
C35	-	0.00 ± 0.000	0.00 ± 0.000	0.02 ± 0.015	negative
C36	-	0.05 ± 0.046	0.01 ± 0.016	0.01 ± 0.011	negative
C37	-	0.06 ± 0.011	0.01 ± 0.017	0.02 ± 0.017	negative
MMR proficients					
X17	NA	0.06 ± 0.002	0.02 ± 0.001	0.00 ± 0.000	negative
C20.3	*MSH6*	0.08 ± 0.004	0.01 ± 0.026	0.02 ± 0.018	negative

L13	*MLH1*	0.09 ± 0.003	0.00 ± 0.000	0.01 ± 0.021	negative
L15	*MLH1*	0.07 ± 0.001	0.00 ± 0.000	0.00 ± 0.000	negative
L20	*MLH1*	0.05 ± 0.001	0.03 ± 0.003	0.03 ± 0.001	negative
L12	*MSH2*	0.07 ± 0.011	0.01 ± 0.017	0.02 ± 0.017	negative
L14	*MSH2*	0.08 ± 0.019	0.01 ± 0.016	0.11 ± 0.016	negative
L16	*MSH2*	0.05 ± 0.003	0.00 ± 0.000	0.03 ± 0.001	negative
L18	*MSH2*	0.05 ± 0.042	0.00 ± 0.000	0.01 ± 0.019	negative
L17	*MSH6*	0.07 ± 0.002	0.02 ± 0.003	0.03 ± 0.003	negative
L19	*MSH6*	0.04 ± 0.009	0.02 ± 0.003	0.03 ± 0.002	NI
C13.2	*MSH6*	0.05 ± 0.002	0.00 ± 0.000	0.03 ± 0.004	negative
C09.2	*PMS2*	0.07 ± 0.002	0.03 ± 0.027	0.02 ± 0.017	NI
L42	*PMS2*	0.07 ± 0.003	0.00 ± 0.000	0.03 ± 0.001	negative
C01.3	*PMS2*	0.02 ± 0.038	0.00 ± 0.000	0.02 ± 0.018	negative
C10.2	*PMS2*	0.08 ± 0.002	0.00 ± 0.000	0.01 ± 0.017	negative
C14.2	*MSH6*	0.02 ± 0.040	0.00 ± 0.000	0.03 ± 0.002	negative
C14.3	*MSH6*	0.03 ± 0.030	0.00 ± 0.000	0.01 ± 0.015	negative
C17.2	*MSH2*	0.05 ± 0.004	0.03 ± 0.001	0.03 ± 0.006	negative
C17.3	*MSH2*	0.03 ± 0.030	0.03 ± 0.003	0.00 ± 0.000	NI

Supplementary Table S1. Data set relative to all eligible patients and controls.

[c] gMSI ratios for each marker ± SD are indicated.

NA, not applicable; ND, not done; X, unknown.

Patient	Genetic testing		Assays			Diagnosis
	status	gene	*ev*MSI	drug	gMSI	
Definite CMMRD						
C01.1, C04, C05, C06, C07, C08, C09.1, C10.1	2 DM	*PMS2*	+	+	+	CMMRD
C15	2 DM	*MLH1*	+	+	+	CMMRD
C12, C13.1	2 DM	*MSH6*	+	+	-	CMMRD
C14.1	2 DM	*MSH6*	+	+	NC	CMMRD
C02	2 DM	*PMS2*	+	+	NC	CMMRD
C01.2	2 DM	*PMS2*	+	+	ND	CMMRD
C03.1, C03.2, C11	2 DM	*PMS2*	ND	ND	+	CMMRD
C17.1	2 DM	*MSH2*	ND	ND	+	CMMRD
C16	2 DM	*MLH1*	ND	ND	NC	NA
At-risk for CMMRD						
C20.1, C20.2, C22	UV hmz	*MSH6*	+	+	-	CMMRD
C18	DM+UV	*PMS2*	+	+	-	CMMRD
C19	DM+UV	*PMS2*	+	+	NC	CMMRD
C29.1	no mutation	NA	+	+	+	CMMRD
C21	DM+UV	*MSH6*	-	+	-	Doubtful
C23	UV hmz	*MSH6*	-	+	-	Doubtful
C24	DM+UV	*MSH2*	-	-	-	not CMMRD
C30	UV	*MSH2*	-	-	-	not CMMRD
C25, C26	DM	*PMS2*	-	-	-	not CMMRD
C27, C28	DM	*MLH1*	-	-	-	not CMMRD
C29.2, C31, C32,C34.1, C34.2, C35, C36, C37	no mutation	NA	-	-	-	not CMMRD
C33	no mutation	NA	-	-	NC	not CMMRD

Supplementary Table S2. Results of the 3 assays in definite and putative CMMRD patients.
+, abnormal test result; -, normal test result; DM, deleterious mutation; UV, unknown variant; hmz, homozygous; ND, not done; NA, not applicable; NC, not contributory.

Brevet

« Screening of Constitutional MisMatch Repair Deficiency (CMMRD) »

Co-découvreurs: Alex Duval, Chrystelle Colas, Olivier Buhard, Ada Collura, **Sahra Bodo**, Martine Muleris,

Déposé le 16.02.2011 sous le numéro N°1000103624
Inserm Transfert numéro d'application EP11305160.1

Déspitage du syndrome de déficience constitutionnelle du système MMR (CMMRD)

Lors du travail décrit dans l'article 2, nous avons mis au point une nouvelle approche diagnostique du syndrome CMMRD en utilisant les lymphocytes des patients immortalisés par EBV. Cette approche est basée sur la détection d'un phénotype MSI acquis *ex vivo* (*ev*MSI) et d'une tolérance à un agent méthylant. Afin de garantir la propriété intellectuelle de cette découverte et de son utilisation pour le dépistage du syndrome CMMRD, ces résultats ont fait l'objet d'un dépôt de brevet (références N°1000103624). Ce brevet couvre la technique telle qu'elle est décrite dans l'article 2 mais aussi ses éventuelles améliorations et modifications futures.

Screening of Constitutional Mismatch Repair-Deficiency (CMMRD)

The present invention relates to a method for *in vitro* diagnosis of Constitutional Mismatch Repair Deficiency (CMMRD). More specifically, the present invention 5 relates to the use of microsatellite markers for the diagnosis of CMMRD and for identifying patient requiring monitoring for detection of cancer onset and/or patient at risk of developing a tumor. The present invention also relates to a method of identification of microsatellite markers associated with CMMRD.

The microsatellite instability (MSI) phenotype occurs specifically in Mismatch Repair (MMR)-deficient cells due to the accumulation of replication errors in repetitive DNA sequences. MSI has been widely reported in the tumor DNA of both inherited and sporadic MMR-deficient neoplasms. However, this type of genetic instability has not been detected in the germline DNA of patients suffering from Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer (HNPCC), also called Lynch syndrome. The Lynch syndrome is due to dominant autosomal mutation in one of the 4 genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* called "MMR genes" which are involved in the mismatch repair during DNA replication. Patients suffering from Lynch syndrome have a risk of 80% to develop, in their adult years, colon cancer and various cancer affecting endometrium, ovary, stomach, small intestine, liver, superior urinary system, brain and skin.

In contrast to individuals with Lynch syndrome, cases with biallelic deleterious germline mutations in MMR genes leading to constitutional mismatch repair-deficiency (CMMRD), or Lynch-3 syndrome, have been recognized since 1999 (Ricciardone *et al.* (1999) *Cancer Res*. **59**: 290–3 ; Wang *et al.* (1999) *Cancer Res.* **59**: 294–7). The CMMRD/Lynch 3 syndrome (herein after called CMMRD) is characterized by the development of childhood tumors and a huge clinical spectrum very different from one patient to another. The tumors are mainly lymphomas, leukemias, astrocyte-derived brain tumors and/or very early-onset colorectal tumors. Other signs, named call signs, such as atypical "café-au lait" spots are frequently observed in CMMRD patients, being however also present in healthy subjects from the general population. They allow to recognize, even if not specific, at-risk individuals for CMMRD syndrome in the general population before the emergence of cancers.

To date, when CMMRD syndrome is suspected in patients, three tests for diagnosing the disease are available.

The first one concerns the identification of a MSI process in healthy tissues, such as blood or skin, of these patients using limiting dilution analysis of DNA, but results are very contradictory in the litterature and the method is neither sensible nor specific enough, besides being complex and expensive (Wimmer and Etzler (2008) *Hum. Genet.* **124:** 105- 22; Gallinger *et al.* (2004) *Gastroenterology*. **126:** 546-585; Felton *et al.* (2007) *Clin.Genet.* **71:** 483-498; Bacon *et al.*

(2001) *Oncogene*. **20:** 7467-7471). In fact, it has been demonstrated in these publications that the methodology used is critical for identification of MSI process, and that the methodology consisting of using a small-pool PCR, *i.e.* using limiting dilution of DNA, allow the identification of MSI, whereas the methodology consisting of using conventional PCR, *i.e.* using un-diluted DNA, does not allow MSI identification.

The second test concerns the search for constitutional mutations of MMR genes in these patients by sequencing the MMR genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* and *PMS2*, but this reference method can be used, as for many genetic diseases, when the diagnosis is strongly suspected, and its implementation in a routine screening, from a call sign, is not possible because this method is too long and too expensive. Moreover, it is often difficult to identify mutations in two alleles of the same gene in these patients and a lot of coding variants can have a significance not yet specified.

The third test concerns the identification of a MSI phenotype in the tumor, but this method allows a diagnosis only after the development of a tumor and it needs to be confirmed in terms of reliability. In fact, there is often a difficulty to establish a MSI phenotype in tumors which are not colorectal cancers, for instance in lymphoma or cerebral cancers, and these patients can also developped cancers which are not due to MSI. Furthermore, identification of a MSI phenotype in a tumor does not necessarily means that the patient is suffering from CMMRD syndrome since it can be a sporadic MSI cancer (rare in young patients) and/or especially a consecutive MSI tumor in a Lynch patient.

Thus, there is a need to develop a simple method that detects constitutive MSI in germline DNA from normal cells of CMMRD patients, before the emergence of tumors, allowing an early diagnosis of CMMRD syndrome.

There is also a need to early identify patient suffering from CMMRD syndrome in order to establish a monitoring for detection of cancer onset.

The inventors surprinsingly identified that cultured, and optionally immortalized lymphocytes, from CMMRD patients acquire MSI phenotype during culture and, hence enable for the early detection of constitutive MSI. Moreover, contrary to that was previously accepted, the inventors identified that MSI identification is achievable using conventional PCR, *i.e.* using un-diluted DNA sample.

Use of microsatellite markers for the diagnosis of constitutional mismatch repair-deficiency

A first aspect of the invention is a method for *in vitro* diagnosing constitutional mismatch repair-deficiency (CMMRD), which method comprises the steps of:

a) culturing lymphocytes obtained from a patient likely to be affected by CMMRD; and

b) detecting the presence or absence of instability on at least one microsatellite marker of CMMRD in the cultured lymphocytes of step a);

wherein the detection of instability on at least one microsatellite marker in the cultured lymphocytes of the patient indicates that the patient suffers from CMMRD.

As used herein, the term "CMMRD" refers to an inherited cancer syndrome, also named Lynch-3 syndrome, involving bi-allelic germline mutations in at least one of the MMR genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* and *PMS2*. CMMRD is usually characterized by the development of chilhood tumors (before the age of 15) but not necessarily, as a first tumor may occur in CMMRD patients when adults. The tumors may correspond, without limitation, to lymphomas, leukemias, brain tumors, such as glioblastoma, astrocytoma, or neuroblastoma, and/or very early-onset colorectal tumors. Other signs, named "call signs", are frequently observed in CMMRD patients. Call signs may correspond to (i) presence of atypical "café-au-lait" spots, and/or (ii) parental consanguinity with the development of a tumor in a child, and/or iii) an evocative familial history of Lynch syndrome, and/or iv) a brother or a sister suffering from a cancer in childhood, and/or v) a childhood cancer outside the spectrum of tumors conventionally associated with the neurofibromatosis type 1 (NF1). By "an evocative familial history of Lynch syndrome", it is meant signs which can evocate a familial Lynch syndrome or HNPCC according to the Bethesda criteria: a) a colorectal cancer before the age of 50; or b) presence of at least two tumors of the HNPCC spectrum, such as colorectal cancer, stomach cancer, endometrial cancer, bladder cancer, urinary tract cancer, ovary cancer, whatever the age at disease onset; or c) a colorectal cancer, diagnosed before the age of 60, with an evocative histology of an MSI phenotype ("Crohn-Like"); or d) a patient with a colorectal cancer having a firstdegree relative suffering from a tumor of the HNPCC spectrum diagnosed before the age of 50; or e) patients with a colorectal cancer having two or more first-degree relatives suffering from a tumor of the HNPCC spectrum, whatever the age at disease onset.

As used herein, the patient is a human or a non human mammal, in particular a rodent, a feline, a canine, a bovine or an ovine. In a preferred embodiment, the patient is a human. More particularly, the patient is a child, an adult, a man or a woman. In a particular preferred embodiment, the patient is a child.

By "patient likely to be affected by CMMRD", it meant a patient who presents call signs of CMMRD, a patient who is suffering from childhood tumors such as leukemia, lymphoma, glioblastoma, neuroblastoma, astrocytoma and/or colorectal cancer, a patient who is suffering from tumors in adulthood, and/or a patient who suffered from a first cancer in childhood and who is suffering from a second cancer in adulthood.

In a particular embodiment, the method comprises a step of immortalization of lymphocytes from a patient affected by CMMRD prior to step a). Accordingly, the method of the invention may comprise the steps of:

a0) immortalizing lymphocytes obtained from a patient likely to be affected by CMMRD

a) culturing the immortalized lymphocytes obtained at step a0); and

b) detecting the presence or absence of instability on at least one microsatellite marker of CMMRD in the cultured immortalized lymphocytes of step a);

wherein the detection of instability on at least one microsatellite marker in the cultured immortalized lymphocytes of the patient indicates that the patient suffers from CMMRD.

In a particular embodiment, the detection of instability on at least three microsatellite markers, in the cultured lymphocytes, optionally immortalized lymphocytes, of the patient indicates that the patient suffers from CMMRD. In another particular embodiment, the detection of instability on at least five microsatellite markers, in the cultured lymphocytes, optionally immortalized lymphocytes, of the patient indicates that the patient suffers from CMMRD.

In order to carry out the process according to the present invention lymphocytes (preferably mononuclear lymphocytes) may firstly be isolated from *e.g.* the blood or plasma according to known methods *e.g.* by a Ficoll density gradient centrifugation.

According to the method of the invention, in step a0) immortalization of lymphocytes may be performed by conventional methods of immortalization. For example, lymphocytes can be immortalized by the Epstein Barr Virus (EBV).

According to the method of the invention, the step of culturing lymphocytes, optionally immortalized lymphocytes, is performed by conventional method of culture, for instance using RPMI-1640 medium or Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% of Foetal Calf Serum.

In an embodiment, culturing lymphocytes in step a) is performed in the presence of proliferative agents, such as Phytohemagglutinine (PHA), Concanavaline A, Pokeweed Mitogen (PWM), Nocardia Water Soluble Mitogen and Lipopolysaccharide (LPS).

In a preferred embodiment, lymphocytes, optionally immortalized lymphocytes, may be cultured during 1 to 150 days, more preferably during 30 to 150 days, 60 to 120 days, 80 to 110 days, or 90 to 100 days. For instance, lymphocytes, optionally immortalized lymphocytes, may be cultured during 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145 or 150 days.

As used herein, the terms "microsatellite marker of CMMRD" refers to microsatellites which have been identified as being involved in CMMRD. Preferably, the microsatellite markers of CMMRD are selected from the group consisting of BAT26, NR21, NR27, NR24 and BAT25. Still preferably, said at least one microsatellite marker is BAT26, NR21 and NR27, and more preferably BAT26, NR21, NR27, NR24 and BAT25.

The BAT26 microsatellite marker is a 26A repeat localized in the intron 5 of the *hMSH2* gene, and is found for instance between positions 16298 and 16323 of the NCBI Reference Sequence NG_0007110.1. More preferably, the BAT26 microsatellite marker has a repeated pattern comprised between 20A to 26A.

The NR21 microsatellite marker is a 21T repeat localized in the 5' untranslated region of the *SLC7A8* gene, and is found for instance between positions 483 and 503 of the NCBI Reference Sequence NM_012244.2. More preferably, the NR21 microsatellite marker consists of a repeated pattern comprised between 16T to 21T.

The NR27 microsatellite marker is a 26A repeat localized in the 5' untranslated region of the *BIRC3* gene, and is found for instance between positions 1031 and 1056 of the NCBI Reference Sequence NM_001165.3. More preferably, the NR27 microsatellite marker consists of a repeated pattern comprised between 23A to 26A.

The NR24 microsatellite marker is a 23T repeat localized in the 3' untranslated region of the *ZNF2* gene, and is found for instance between positions 3248 and 3270 of the NCBI Reference Sequence NM_021088.2. More preferably, the NR24 microsatellite marker consists of a repeated pattern comprised between 18T to 23T.

The BAT25 microsatellite marker is a 25T repeat localized in the intron 16 of the *c-KIT* gene, and is found for instance between positions 74118 and 74142 of the NCBI Reference Sequence NG_007456.1. More preferably, the BAT25 microsatellite marker consists of a repeated pattern comprised between 19T to 25T.

According to the present invention, in step b) detection of the presence or absence of instability may be performed by any method well-known in the art.

In a preferred embodiment, detection of the presence or absence of instability is performed on an un-diluted DNA sample. By "un-diluted DNA sample", it is meant that the DNA has not been diluted down to achieve a limiting dilution of 1 to 3 genomes per sample. In

other word, detection of the presence or absence of instability is performed on an un-diluted DNA sample that contains at least 4 genomes per sample.

In a preferred embodiment, detection of the presence or absence of instability is performed by sequencing at least one microsatellite marker of CMMRD.

In a particular preferred embodiment, detection of the presence or absence of instability is performed by genotyping at least one microsatellite marker of CMMRD.

The genotyping can be performed by amplifying the microsatellite markers and isolating the amplification products by capillary electrophoresis. Amplification of the microsatellite markers can be performed using conventional polymerase chain reaction (PCR) techniques, i.e. using an un-diluted DNA sample, and more preferably, amplification of microsatellite markers is performed by multiplex PCR. In other words, amplification of the microsatellite markers is not performed using small-pool PCR, i.e. on a DNA sample extensively diluted to 1 to 3 genomes equivalents per PCR reaction (Parsons et al. 1995, *Cancer. Res.*, **55**:5548-5550).

In a preferred embodiment, amplification of the microsatellite markers comprises an initial denaturation step followed by cycles of denaturation-annealing-elongation steps and a final extension step.

The initial denaturation step may be performed under heating conditions ranging from 90°C to 105°C, during 15 sec to 15 min. Prefer ably, the heating conditions range from 92°C to 102°C, more preferably from 95°C to 10 0°C, still more preferably the heating conditions are at 95°C. Preferably, the initial den aturation step is performed during 1 min to 15 min, more preferably during 2 min to 12 min, still more preferably during 5 min to 10 min, and still more preferably the initial denaturation step is performed during 5 min.

In a preferred embodiment, the initial denaturation step is performed at 95°C during 5min.

Each cycle of denaturation-annealing-elongation step includes a denaturation phase under heating conditions, followed by an annealing phase performed under conditions which allow the hybridization of the primers to the sequence to be amplified, and an elongation phase performed under conditions which allow the polymerase to synthesizes an extension product from each primer that is annealed to the sequence to be amplified.

The denaturation phase may be performed between 90°C to 105°C, preferably 92°C to 100°C, more preferably between 94°C to 98°C , during 10 sec to 4 min, preferably during 10 sec to 2 min, more preferably during 15 sec to 1 min.

The annealing phase may be performed between 35°C a nd 70°C, preferably between 40°C to 65°C, more preferably between 45°C to 60°C, still more preferably between 50°C to

60°C, during 10 sec to 2 min, prefe rably during 20 sec to 1,5 min, more preferably during 25 sec to 45 sec.

The elongation phase may be performed between 40°C and 80°C, preferably between 50°C to 75°C, more preferably between 60°C to 72°C, during 10 sec to 5 min, preferably during 20 sec to 3 min, more preferably during 25 sec to 1 min, still more preferably during 30 sec to 45 sec.

In a preferred embodiment, the denaturation phase is performed at 95°C during 30 sec, the annealing phase is performed at 55°C durin g 30 sec, and the elongation phase is performed at 72°C during 30 sec. The denaturation-a nnealing-elongation step may be repeated during 30 to 60 cycles, preferably during 32 to 40 cycles, more preferably during 35 to 40 cycles. Still more preferably, the denaturation-annealing-elongation step is repeated during 35 cycles.

The final extension step may be performed between 40°C and 80°C, preferably between 50°C to 75°C, more preferably between 60°C to 72°C, during 1 min to 10 min, preferably during 3 min to 8 min, more preferably during 4 min to 6 min.

In a preferred embodiment, the final extension step is performed at 72°C during 5 min.

Amplification of the microsatellite marker BAT26 may be performed using the forward primer having the sequence 5'-CTGCGGTAATCAAGTTTTTAG-3' (SEQ ID NO: 1) and the reverse primer having the sequence 5'-AACCATTCAACATTTTTAACCC-3' (SEQ ID NO: 2).

Amplification of the microsatellite marker NR21 may be performed using the forward primer having the sequence 5'-GAGTCGCTGGCACAGTTCTA-3' (SEQ ID NO: 3) and the reverse primer having the sequence 5'-CTGGTCACTCGCGTTTACAA-3' (SEQ ID NO: 4).

Amplification of the microsatellite marker NR27 may be performed using the forward primer having the sequence 5'-AACCATGCTTGCAAACCACT-3' (SEQ ID NO: 5) and the reverse primer having the sequence 5'-CGATAATACTAGCAATGACC-3' (SEQ ID NO: 6).

Amplification of the microsatellite marker NR24 may be performed using the forward primer having the sequence 5'-GCTGAATTTTACCTCCTGAC-3' (SEQ ID NO: 7) and the reverse primer having the sequence 5'-ATTGTGCCATTGCATTCCAA-3' (SEQ ID NO: 8).

Amplification of the microsatellite marker BAT25 may be performed using the forward primer having the sequence 5'-TACCAGGTGGCAAAGGGCA-3' (SEQ ID NO: 9) and the reverse primer having the sequence 5'-TCTGCATTTTAACTATGGCTC- 3' (SEQ ID NO: 10).

In a particular embodiment, the method further comprises in step b) comparison with a control sample.

As used herein, the control sample may consist of non-cultured cells from the patient likely to be affected by CMMRD. In a preferred embodiment, said non-cultured cells may be non-cultured peripheral blood cells and/or non-cultured plasma cells. In a particular embodiment, said non-cultured peripheral blood cells and/or non-cultured plasma cells may be non-cultured lymphocytes, and more preferably non-cultured mononuclear lymphocytes. As used herein, non-cultured lymphocytes are lymphocytes, and preferably mononuclear lymphocytes, directly extracted from blood and/or plasma obtained from the patient likely to be affected by CMMRD. Non-cultured lymphocytes (preferably mononuclear lymphocytes) may be isolated from *e.g.* the blood or plasma according to known methods *e.g.* by a Ficoll density gradient centrifugation.

By "instability on at least one microsatellite marker" is meant a deletion or an addition of the repeated pattern of mononucleotides, dinucleotides or trinucleotides.

In an examplary embodiment, instability on the BAT26 microsatellite marker is present when the BAT26 microsatellite consists of a repeated pattern of more than 26A or less than 20A.

In an examplary embodiment, instability on the NR21 microsatellite marker is present when the NR21 microsatellite consists of a repeated pattern of more than 21T or less than 16T.

In an examplary embodiment, instability on the NR27 microsatellite marker is present when the NR27 microsatellite consists of a repeated pattern of more than 26A or less than 23A.

In an examplary embodiment, instability on the NR24 microsatellite marker is present when the NR24 microsatellite consists of a repeated pattern of more than 23T or less than 18T.

In an examplary embodiment, instability on the BAT25 microsatellite marker is present when the BAT25 microsatellite consists of a repeated pattern of more than 25T or less than 19T.

In a particular embodiment, instability is present when a deletion or an addition of at least one nucleotide is detected in the cultured lymphocytes, optionnally in the cultured immortalized lymphocytes, of the patient in comparison to the control sample.

Preferably, instability is present when a deletion or an addition is detected on one allelle, and more preferably on two alleles.

In another particular embodiment, the method comprises a step of determining the resistance or sensitivity of the cultured lymphocytes, optionally cultured immortalized lymphocytes, to DNA-damaging drugs. Said step may be performed simultaneously or consecutively to step b) of the methods as described herein. Accordingly, in one embodiment the method of the invention may comprise the steps of:

a) culturing lymphocytes obtained from a patient likely to be affected by CMMRD; and

b) detecting the presence or absence of instability on at least one microsatellite marker of CMMRD in the cultured lymphocytes of step a);

c) determining the resistance or sensitivity of the cultured lymphocytes of step a) to DNA-damaging drugs,

wherein the detection of instability on at least one microsatellite marker on the cultured lymphocytes of the patient and of the resistance of the cultured lymphocytes of the patient to the DNA-damaging drugs indicates that the patient suffers from CMMRD. In another embodiment, the method may comprises the steps of:

a0) immortalizing lymphocytes obtained from a patient likely to be affected by CMMRD

a) culturing the immortalized lymphocytes obtained at step a0); and

b) detecting the presence or absence of instability on at least one microsatellite marker of CMMRD in the cultured immortalized lymphocytes of step a);

c) determining the resistance or sensitivity of the cultured lymphocytes of step a) to DNA-damaging drugs,

wherein the detection of instability on at least one microsatellite marker in the cultured immortalized lymphocytes of the patient and of the resistance of the cultured immortalized lymphocytes of the patient to the DNA-damaging drugs indicates that the patient suffers from CMMRD.

According to the method of the invention, in step c) determination of resistance or sensitivity of the cultured lymphocytes, optionally cultured immortalized lymphocytes, is performed by conventional methods. Such conventional methods may include any method for studying cell proliferation and viability known by the skilled in the art. Such method may be performed by measuring the metabolic activity of the cells, for example using WST1, XTT, or MTT reagents, or by measuring the rate of DNA synthesis, for example using 3H-thymidine or BrdU. For example, said determination may be performed using the WST1 reagent, as described in example 2. In some embodiments, said determination may include the steps of:

(i) incubating the cultured lymphocytes, or the cultured immortalized lymphocytes, of the patient with the DNA-damaging drug or with a vehicle,

(ii) determining the proliferation and/or viability level of the cells of step (i), wherein a decrease of proliferation and/or viability of the cultured lymphocytes, or the cultured immortalized lymphocytes, of the patient incubated with the DNA-damaging drug in comparison to the cultured lymphocytes, or the cultured immortalized lymphocytes, of the

patient incubated with the vehicle indicates that the cultured lymphocytes, or the cultured immortalized lymphocytes, of the patient are sensitive to the DNA-damaging drug.

In some embodiments, said determination may include the steps of:

(i) incubating the cultured lymphocytes, or the cultured immortalized lymphocytes, of the patient with the DNA-damaging drug,

(ia) incubating control cells with the DNA-damaging drug,

(ii) determining the proliferation and/or viability level of the cells of step (i) and (ia), wherein an increased proliferation and/or viability of the cultured lymphocytes, or the cultured immortalized lymphocytes, of the patient in comparison to the control cells indicates that the cultured lymphocytes, or the cultured immortalized lymphocytes, of the patient are resistant to the DNA-damaging drug.

Step (i) may be performed e.g. for at least 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, or 15 day(s), and/or at most 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 day(s).

Step (i) may be performed e.g. at a temperature of at least 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, or 40°C, and/or of at most 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, or 30°C.

The DNA-damaging drug of step (i) may have a concentration ranging from e.g. 0.01 to 500 μM, preferably ranging from 0.1 to 100 μM, more preferably ranging from 0.15 to 50 M. DNA-damaging drug at step a) may have a concentration of e.g. at least 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 45, 50 μM, and/or at most 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8 7, 6, 5, 4.5, 4, 3.5, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.5, 0.,45, 0.4, 0.35, 0.30, 0.25, 0.20, 0.15, 0.1μM.

Step (ii) may be performed:

- by adding at least 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 μl and/or at most 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 μl of WST1 reagent, and

- by incubating the cells with the WST1 reagent during at least 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, or 15 hour(s), and/or at most 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 hour(s),

- reading the absorbance at 450nm.

Step (ii) may be performed at a temperature of at least 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, or 40°C, and/or of at most 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, or 30°C.

Control cells of step (ia) may include cultured lymphocytes, or immortalized cultured lymphocytes from a control subject (i.e. a subject carrying no mutation in any of the 4 genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*), or from a subject suffering from Lynch syndrome (i.e. a subject carrying dominant autosomal mutation in one of the 4 genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*).

DNA damaging drugs may include a DNA-methylating agent, i.e. an agent that is able to methylate the DNA, or a thiopurine such as described in Karran (2001) *Carcinogenesis* **22:**1931-1937. For example, the methylating agent may be the Methylmethane sulfonate (MMS) (CAS Number 62-27-3), the N-Methyl-N'-nitro-Nnitrosoguanidine (MNNG) (CAS Number 70-25-7), the Temozolomide (CAS Number 85622-93-1), the N-Methyl-N-Nitrosourea (NMU) (CAS Number 684-93-5). The thiopurine drug may be, for example, the 6-thioguanine (CAS Number 154-42-7), the 6-mercaptopurine (CAS Number 50-44-2), or the azathioprine (CAS Number 446-86-6).

The invention also relates to a method for identifying a patient requiring monitoring for detection of cancer onset, which method comprises the steps of:

a) *in vitro* diagnosing if the patient suffers from constitutional mismatch repair deficiency (CMMRD) according to the method previously described; and

b) identifying the patient diagnosed as suffering from CMMRD in step a) as a patient requiring monitoring for detection of cancer onset.

The types of cancer likely to be monitored for detection of onset may be for instance, none limitatively, leukemia, lymphoma, glioblastoma, neuroblastoma, astrocytoma and/or colorectal cancer.

The invention is further directed to a method for identifying a patient at risk of developing a tumor, which method comprises the steps of:

a) *in vitro* diagnosing if the patient suffers from constitutional mismatch repair deficiency (CMMRD) according to the method previously described; and

b) identifying the patient diagnosed as suffering from CMMRD in step a) as a patient at risk of developing a tumor.

The "tumor" may be, none limitatively, lymphomas, leukemias, glioblastomas, neuroblastomas, astrocytomas and/or colorectal tumors.

Method for identifying microsatellite markers of constitutional mismatch repairdeficiency

The present invention also relates to a method for identifying microsatellite markers associated with constitutional mismatch repair-deficiency (CMMRD) comprising the steps of:

a) culturing lymphocytes obtained from a patient affected by CMMRD;

b) detecting the presence or absence of instability on at least one microsatellite in the cultured lymphocytes of step a); and

c) identifying as a microsatellite marker associated with CMMRD said microsatellite which displays instability in the cultured lymphocytes of the patient affected by CMMRD but which does not display instability in non-cultured cells of the patient affected by CMMRD.

In a particular embodiment, the method comprises a step of immortalization of lymphocytes from a patient affected by CMMRD prior to step a). Accordingly, the method of the invention may comprise the steps of:

a0) immortalizing lymphocytes obtained from a patient affected by CMMRD;

a) culturing the immortalized lymphocytes obtained at step a0);

b) detecting the presence or absence of instability on at least one microsatellite in the cultured immortalized lymphocytes of step a); and

c) identifying as a microsatellite marker associated with CMMRD said microsatellite which displays instability in the cultured immortalized lymphocytes of the patient affected by CMMRD but which does not display instability in noncultured cells of the patient affected by CMMRD.

By "patient affected by CMMRD" is meant an individual who have bi-allelic germline mutations on at least one MMR genes. More preferably, the patient has bi-allelic germline mutations on *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* or *PMS2*. As used herein, the patient is a human or a non-human mammal, in particular a rodent, a feline, a canine, a bovine or an ovine. In a preferred embodiment, the patient is a human. More particularly, the patient is a child, an adult, a man or a woman. In a particular preferred embodiment, the patient is a child.

As used herein, non-cultured cells may be cells directly extracted from blood or plasma of the patient affected by CMMRD. In a preferred embodiment, said non-cultured cells may be lymphocytes, and preferably mononuclear lymphocytes, directly extracted from blood or plasma of the patient affected by CMMRD. Non-cultured lymphocytes, and preferably

mononuclear lymphocytes, may be isolated from *e.g.* the blood or plasma according to known methods *e.g.* by a Ficoll density gradient centrifugation.

FIGURES

Figure 1 depicts clinical presentation and MMR mutation analysis in CMMRD family A. A partial pedigree for the family is shown with indications for malignancies (filled symbols) and benign lesions (striped symbols) in probands (arrows) and affected members. Stars indicate members for whom blood sample was available and their genotype is shown in slanting characters. WT: wild type; CRC: colorectal cancer; CLS: café-au-lait spots.

Figure 2 depicts clinical presentation and MMR mutation analysis in CMMRD family B. A partial pedigree for the family is shown with indications for malignancies (filled symbols) and benign lesions (striped symbols) in probands (arrows) and affected members. Stars indicate members for whom blood sample was available and their genotype is shown in slanting characters. WT: wild type; CRC: colorectal cancer; CLS: café-au-lait spots.

Figure 3 depicts clinical presentation and MMR mutation analysis in CMMRD 25 family C. A partial pedigree for the family is shown with indications for malignancies (filled symbols) and benign lesions (striped symbols) in probands (arrows) and affected members. Stars indicate members for whom blood sample was available and their genotype is shown in slanting characters. WT: wild type; CRC: colorectal cancer; CLS: café-au-lait spots.

Figure 4 depicts electrophoretograms for the BAT26, NR21 and NR27 alleles from AIII and her parents. Allelic sizes are indicated in each case. Bp: base pair.

Figure 5 depicts quantification of *ev*-MSI in CMMRD families A and B. In each 35 case, a cumulative size index (SI) of the BAT26, NR21 and NR27 alleles was calculated. Box-plots correspond to the SI median and quartile values in patients and their parents (experiments performed in 8-plicate). *Ev*-MSI is illustrated by the aberrant SI values for AIII3-L and BIII2-L (LBL samples) compared to AIII3 and BIII2 (primary lymphocytes) due to deletions within BAT26, NR21 and/or NR27 mononucleotide repeats.

Figure 6 depicts time course analysis of *ev*-MSI at BAT26, NR21 and NR27 in LBLs from AIII3 (AIII3-L) and BIII2 (BIII2-L). In each case, the duration of culture is indicated in days. NC: non-cultured, primary blood DNA sample.

Figure 7 depicts comparative analysis of BAT26, NR21 and NR27 microsatellite profiles in LBLs from CMMRD, HNPCC and MMR-proficient wild-type healthy subjects. The size index (SI) for BAT26, NR21 and NR27 alleles was calculated in additional series of LBLs from HNPCC (H1-L to H9-L) and healthy wild-type MMR-proficient controls (C1-L to C13-L). In the absence of primary blood DNA samples from these subjects, data from a previous study by our group on allele sizes for the BAT26, NR21 and NR27 microsatellites was used. SI values below the red

line would not be expected and are therefore explained by *ev*-MSI arising after long-term culture of LBLs in CMMRD patients.

Figure 8 depicts cell survival of lymphoblastoid cell lines with MMR-KO genotype (from CMMRD patients, circles), MMR+/- (from Lynch patients, square) and MMR-wt (from control subjects, triangle) genotype after 5 μM MNNG exposure.

EXAMPLE

Example 1

MATERIAL AND METHODS

Subjects, clinical samples, Lymphoblastoid cell lines (LBLs) and mismatch repair gene mutation analyses in CMMRD families.

Families A and B were from the Lyon Centre Léon Bérard and were previously reported as having bi-allelic mutations in *MSH6* and *PMS2*, respectively. Family C was from the Department of Clinical Genetics, Hospital Robert Debré and La Pitié Salpêtrière in Paris. The proband CIV1 of Turkish consanguineous parents exhibited a homozygous deletion of exon 8 in the *MSH2* gene as detected by multiplex ligation-dependent probe amplification. All HNPCC and FAP patients were sourced from the Department of Clinical Genetics, La Pitié Salpêtrière in Paris. Members of families A, B and C as well as HNPCC and FAP patients provided informed consent for their samples to be used in this study. Wild-type healthy controls were provided by CEPH (Centre d'Etude du Polymorphisme Humain), Paris, France. All immortalized lymphoblastoid cells (LBLs) were obtained following a standard EBV infection procedure (Neitzel (1986), *Hum Genet.* **73**: 320-326). LBLs were maintained in DMEM (Life Technologies) containing 10% FCS (InVitrogen).

Microsatellite instability testing.

Constitutional DNA extracted from peripheral blood cells and cultured DNA from LBLs were amplified by PCR at the BAT26, BAT25, NR21, NR24 and NR27 alleles, as well as at 40 microsatellite sequences contained within coding regions (Table 1).

Name of primer	Sequences (dye) 5'-3'	Seq ID N°
53BP1-F	(hex)ttccgttgcacctttctctgactg	11
53BP1-R	ttctccactccctccaaaggttca	12
ATM-F	(fam)ccctgtccagactgttagcttctt	13
ATM-R	cgcttctcaaaccaaatagctggat	14
AURORAB-F	(hex)tgttgcaaggtgtcttttggtg	15
AURORAB-R	atgagacatacctgagagtggagt	16
BARD1-F	(fam)gccctcgaagtaagaaagtcag	17
BARD1-R	tccagatcttgcagaagcct	18

CARD10-F	(hex)gaggaagccacagacagtgaa	19
CARD10-R	gtctactgctatccccagccat	20
CARD15/NOD2-F	(fam)gaagtacatccgcaccgagttcaa	21
CARD15/NOD2-R	tgggctgagaacacgtagca	22
CARD6-F	(hex)tggcctggttgagataacatggtg	23
CARD6-R	agtagctgtgctggcttcaagttc	24
CARD8-F	(hex)ttcctgcacagcctatgctatc	25
CARD8-R	gacacctccatggaagaaaacctc	26
CASP10-F	(hex)gagtgcagttgcgcaatctcg	27
CASP10-R	agacttgatgcagggaaggacaga	28
CASP1-F	(hex)gctgtcataaaccaggaagggaa	29
CASP1-R	ggaccatgtagtatccagcactct	30
CASP3-F	(fam)tgtgtgcttctgagccatggtg	31
CASP3-R	acccctgcttaatcgtcaataacc	32
CASP4-F	(fam)gccacttaaggtgttggaatccc	33
CASP4-R	agacactgcttaggccttggagtt	34
CASP5-F	(fam)tgtgttattcgctggagacatggt	35
CASP5-R	cacgcgattctttcgcaaagag	36
CASP8AP2-F	(hex)cgtttatttgaacagcaactaccag	37
CASP8AP2-R	tgttggagttgtccacactcct	38
CASP8-F	(fam)tcaccatcctgactgaagtgaac	39
CASP8-R	aggcaggagaatggcctgaa	40
CDC25C-F	(fam)agactgaagcaggtggaaaa	41
CDC25C-R	acccggcctatgacaacatt	42
CHK1-F	(hex)atgggaccaacccagtgaca	43
CHK1-R	ttgcagagttctgggactaaagag	44
CTIP-F	(fam)ctcgagtgttcatctcctgtatttgg	45
CTIP-R	ctgtgatgtgtgaaaagggcata	46
FANCJ-F	(hex)gccctggatccagacattgaattg	47
FANCJ-R	atcctcagctttcacttctctggc	48
MDC1-F	(hex)ttggcagggagaatgagga	49
MDC1-R	gaagactcaggtgtctgact	50
MDM2-F	(fam)ggggaaatctctgagaaagccaaac	51
MDM2-R	gcattaaggggcaaactagattcca	52
MRE11-F	(fam)gcatttcttaattgtagccccttgt	53
MRE11-R	atcccctagacctatggactgact	54
p63-F	(hex)ggtgctggtaattaagttactcaag	55
p63-R	ggaggttaggctgtttgtatgg	56
PAK3-F	(fam)caccctctgctgaaaatgccaa	57
PAK3-R	ggcttatgagaaacactcccgtgta	58
RAD17-F	(fam)ggagaaaacaacttacggccaagga	59
RAD17-R	ccaccaatagcttggacctcttga	60
RAD51APT-F	(hex)atccagaacagcaccaaaggag	61
RAD51APT-R	gctcctgttttctgactgcaccta	62
RAD54-F	(fam)gacaaacaccaatctctcaaaggc	63
RAD54-R	ggcattgtatcctcaggcattc	64
RAD9-F	(fam)ccagtgctatcattgtcatccca	65

RAD9-R	ccactcttttcattgcagggc	66
REV3-F	(hex)ctggctgagtttgagggagacttt	67
REV3-R	actccagttggcttggttttaggc	68
RF1-F	cctgcggcagtatctcattct	69
RF1-R	cgggccctgggtgtaattagtt	70
RIF1-F	(fam)ttcaaggcgacgttcagaag	71
RIF1-R	acaatgtcctgggtaccatc	72
SGO1-F	(fam)agaggggacccttttacagatttg	73
SGO1-R	atgagctagggtcctgtcaaga	74
ATR-F	tgaaagcaagttttactggactagg	75
ATR-R	(hex)tcttctgtaggaacttgaaagcc	76
BAX-F	agttcgtccccgatgcgcttgaga	77
BAX-R	(fam)ttcatccaggatcgagcagggcga	78
BLM-F	acagcagtgcttgtgagaac	79
BLM-R	(fam)ctctgccaccaggaagaatc	80
CBF2-F	tcccttactttgtcatcacc	81
CBF2-R	(hex)ccatgaagaaagtgaattgg	82
MSH3-F	actcccacaatgccaataaaaa	83
MSH3-R	(hex)agatgtgaatcccctaatcaagc	84
MSH6-F	cgtaatgcaaggatggcgtg	85
MSH6-R	(hex)gggtgatggtcctatgtgtc	86
TGFBR2-F	cacatgaagaaagtctcaccaggc	87
TGFBR2-R	(fam)ctttattctggaagatgctg	88
RAD50-F	caagtcccagcatttcatca	89
RAD50-R	(hex)aactgcgacttgctccagat	90
TFDP2-F	attcctgagcagaattggta	91
TFDP2-R	(hex)cagaagaacattaggcgaag	92
GRB14-F	gcctgtaccttaaagcagaa	93
GRB14-R	(hex)ggcaatagtgatatttatgt	94
GRK4-F	tttagagccatagcttcacc	95
GRK4-R	(fam)tgctgtttaaactaggtttgc	96
RBBP8-F	ccaagactgtgatgtgtgaa	97
RBBP8-R	(hex)gtgtcatctcctgtatttgga	98
MBD4-F	cagaacaaaaatttgatcctgaactc	99
MBD4-R	(fam)gatgctggagcatgtggt	100

Table 1. List of forward and reverse primers used for amplifying 40 microsatellite sequences contained within coding regions.

Amplification of the microsatellite marker BAT26 is performed using the forward primer having the sequence 5′-CTGCGGTAATCAAGTTTTTAG-3′ (SEQ ID NO: 1) and the reverse primer having the sequence 5′-AACCATTCAACATTTTTAACCC-3′ (SEQ ID NO: 2).

Amplification of the microsatellite marker NR21 is performed using the forward primer having the sequence 5′-GAGTCGCTGGCACAGTTCTA-3′ (SEQ ID NO: 3) and the reverse primer having the sequence 5′-CTGGTCACTCGCGTTTACAA-3′ (SEQ ID NO: 4).

Amplification of the microsatellite marker NR27 is performed using the forward primer having the sequence 5′-AACCATGCTTGCAAACCACT-3′ (SEQ ID NO: 5) and the reverse primer having the sequence 5′-CGATAATACTAGCAATGACC-3′ (SEQ ID NO: 6).

Amplification of the microsatellite marker NR24 is performed using the forward primer having the sequence 5′-GCTGAATTTTACCTCCTGAC-3′ (SEQ ID NO: 7) and the reverse primer having the sequence 5′-ATTGTGCCATTGCATTCCAA-3′ (SEQ ID NO: 8).

Amplification of the microsatellite marker BAT25 is performed using the forward primer having the sequence 5′-TACCAGGTGGCAAAGGGCA-3′ (SEQ ID NO: 9) and the reverse primer having the sequence 5′-TCTGCATTTTAACTATGGCTC-3′ (SEQ ID NO: 10).

PCR products were separated by capillary electrophoresis on an ABI 3100 genetic analyser and analyzed using GeneMapper software v3.7. Experiments with BAT26, BAT- 25, NR21, NR-24 and NR27 were performed in 8-plicate to allow true instability at these microsatellite loci to be distinguished from background.

RESULTS AND DISCUSSION

Samples from 4 CMMRD index cases in 3 distinct families (A, B, C) were collected, together with samples from their first degree relatives. Families A and B display previously reported bi-allelic mutations in *MSH6* and *PMS2*, respectively. In family C, the proband of consanguineous parents exhibited a homozygous deletion of exon 8 in the *MSH2* gene. Details concerning the clinical features and mutations in these families are shown in Figure 1 to 3. We established LBLs of CMMRD probands following a standard EBV infection procedure. MMR wild-type subjects with familial adenomatous polyposis (FAP) due to germline *APC* mutation were used as controls, together with HNPCC patients consulted in our hospital. To detect MSI, we used a panel of 5 non-coding microsatellites (BAT25, BAT26, NR21, NR24, and NR27) in which instability is almost systematically observed in MMR-deficient tumors.

We observed aberrant BAT26, NR21 and NR27 allelic profiles due to MSI in the cultured LBLs of 3 CMMRD patients (AIII3-L, BIII2-L and BIII4-L; Figures 4 and 5). MSI progressively increased at these markers with longer duration of culture under standard conditions (Fig 6).

In contrast, all of the control and HNPCC cases displayed stable allelic profiles in culture with similar BAT26, NR21 and NR27 alleles in primary lymphocytes and related LBLs (Fig 5).

We also investigated MSI in microsatellite sequences contained within coding regions (Table 2).

RELATED PATHWAYS	GENES	Total DNA	Total DNA	Total DNA	LBL Sub-clones	
		MSH6-/-	PMS2-/-	PMS2-/-	*N* = 8	*N* = 2
		AIII3-L	BIII2-L	BIII4-L	AIII3-L	BIII2-L
CHECKPOINT	*53BP1*	wt	wt	wt	wt	wt
	ATM	wt	wt	wt	wt	wt
	AURORA B	wt	wt	na	wt	wt
	BARD1	wt	wt	wt	wt	wt
	CDC25	na	wt	wt	wt	wt
	CHK1	na	wt	na	wt	na
	CTIP	wt	wt	wt	wt	wt
	FANCJ	wt	wt	wt	wt	wt
	MDC1	na	wt	wt	wt	wt
	MDM2	wt	wt	na	wt	wt
	PAK3	wt	wt	wt	wt	wt
	RAD9	wt	wt	wt	wt	wt
	RBBP8	wt	wt	wt	wt	wt
APOPTOSIS	*CASP1*	wt	wt	wt	wt	wt
	CASP3	wt	wt	wt	wt	wt
	CASP4	wt	wt	wt	wt	wt
	CASP5	wt	wt	na	wt	na
	CASP8	wt	wt	wt	wt	wt
	CASP82AP2	wt	wt	na	wt	wt
	CASP10	wt	wt	na	wt	wt
	CARD6	wt	wt	na	wt	wt
	CARD8	wt	wt	na	wt	na
	CARD10	wt	wt	na	wt	wt
	CARD15	wt	wt	na	wt	wt
	RF1	wt	wt	wt	wt	na
	BAX	wt	wt	wt	wt	wt/+1 (1)
DNA REPAIR	*MRE11*	wt	wt	wt	wt	wt
	P63	wt	wt	wt	wt	wt
	REV3	wt	wt	wt	wt	wt
	RAD50	wt	wt	na	wt	na
	RAD51AP	wt	wt	wt	wt	wt
	RAD54	wt	wt	na	wt	wt
	MSH3	wt	wt	wt	wt	wt
	MSH6	wt/-1	wt	wt	wt/-1 (8)	wt
	BLM	wt	na	wt	wt/+1 (1)	wt
	MBD4	wt	wt	wt	wt	wt

Table 2. Screening for MSI in 40 repetitive sequences contained within coding regions. These microsatellites were found not to be mutated in the blood, although sub-clones with heterozygous mutations in *BAX* (*N* = 1), *BLM* (*N* = 1), *TFDP2* (*N* = 1), *GRK4* (*N* = 2) and/or *TGFBR2* (*N* = 1) were found. One sub-clone was found with a homozygous mutation in *TGFBR2* (*N* = 1). As expected, all sub-clones (*N* = 8) from AIII3 showed a heterozygous *MSH6* mutation,

representing one of the two germline mutations in this family. These results indicate mosaicism for MSI in repetitive sequences from coding regions in CMMRD LBLs. Whether these mutational events also occur *in vivo* is not known.

Since normal blood lymphocytes are heterogeneous, we screened LBL sub-clones from AIII3-L and BIII2-L to improve the detection of putative microsatellite alterations in these coding sequences. We could not detect MSI in the coding sequences of LBLs from CMMRD patients, but did find rare sub-clones with alterations (Table 2). Due to the low frequencies, this was not considered to be of interest for the diagnosis of CMMRD.

Overall, we concluded that *ex-vivo* acquisition of the MSI phenotype in LBLs from CMMRD patients was readily detectable by amplifying consensual, non-coding microsatellite markers such as BAT26, NR21 and NR27. We have termed this '*ev*-MSI'. We further characterized the specificity of *ev*-MSI in CMMRD individuals by collecting additional, independent LBL controls from MMR-proficient, wild-type healthy subjects, together with additional HNPCC cases from other clinical centers in France. Due to the lack of primary blood DNA samples for these controls, we used as a reference the polymorphisms of BAT26, NR21 and NR27 amplicons previously obtained by our group in a study of 1,206 wild-type healthy individuals encompassing 55 different populations worldwide (Buhard *et al.* (2006) *J. Clin. Oncol*. **24** : 241-51). In AIII3-L, BIII2-L and BIII4-L, the BAT26, NR21 and NR27 markers displayed aberrant, shortened profiles that fell outside the polymorphic zone defined by our previous study (Figure 7). In contrast, the size of these markers for LBLs from HNPCC and healthy subjects was within the polymorphic zone, demonstrating that *ev*-MSI was indeed a specific feature of CMMRD (Figure 7).

To date, CMMRD has been diagnosed in more than 90 patients from at least 54 families. The epidemiology of CMMRD is characterized by an unusually low incidence of HNPCC in first degree relatives. Because of this apparent sporadic presentation of tumors, the incidence of CMMRD could be significantly underestimated in children who develop tumors. We have shown here that MSI is not detectable in the normal blood of either HNPCC or CMMRD patients, but can be unmasked by culture of LBLs from CMMRD but not HNPCC patients, presumably due to the presence of a functional MMR allele in the latter.

These findings demonstrate that routine detection of CMMRD in at-risk individuals can be achieved by immortalizing LBLs and then evaluating the size of specific microsatellites after a period of culture.

This approach is highly specific since we did not detect *ev*-MSI in any of the MMRproficient controls. Our experience in genotyping several MMR-proficient cancer cell lines at the BAT26, NR21, NR27 and other microsatellite loci corroborate this observation: no changes have been noted in the profile of these markers after many passages in culture. We therefore speculate that MSI occurs specifically in CMMRD LBLs because the additional cell divisions during culture

lead to the accumulation of unrepaired replication errors at mononucleotide repeats. In contrast, the same DNA alterations are recognized and repaired in MMR-proficient LBLs.

Our method seems to be highly sensitive, and after 90 days of culture, we observed a clear *ev*-MSI phenotype in LBLs from AIII3 (AIII3-L), BIII2 (BIII2-L) and BIII4 (BIII4-L). The difference in allele size compared to wild-type, as measured by the SI index (Figure 6), indicates that CMMRD could well be diagnosed after a shorter culture period of one month or less.

However, due to the quasi-monomorphic nature and well-established allelic profiles of BAT26, NR21, NR27, analysis of LBLs alone is sufficient to detect *ev*-MSI that manifests beyond the polymorphic zone in cases where normal blood sample is not available.

Finally, *ev*-MSI was detected in LBLs from patients with bi-allelic *MSH6* or *PMS2* germline mutations. Importantly, inactivation of these MMR genes in tumors has been associated with a 'mild' MSI phenotype characterized by short deletions of DNA repetitive sequences. Since most CMMRD patients reported so far have been diagnosed with bi25 allelic *PMS2* mutations, this indicates that detection of *ev*-MSI in LBLs may be sensitive enough to diagnose all CMMRD cases including *MSH6*- and *PMS2*-deficient patients. Similar to sporadic MSI tumors, bi-allelic defects in *MLH1* or *MSH2* would be expected to show higher levels of *ev*-MSI in LBLs and therefore be more readily detectable.

In conclusion, we report *ev*-MSI as a novel phenomenon that occurs specifically in LBLs from CMMRD patients. The clinical interest of our finding is that it provides an opportunity for large-scale screening of this hereditary tumor syndrome, thus allowing the incidence of CMMRD to be evaluated in humans. As an initial clinical indication for our method, we suggest the systematic screening of children with early malignancies and/or multiple, atypical café-au-lait spots, observed in almost all CMMRD patients. This should occur even in the absence of a familial history of Lynch syndrome. Our findings could greatly improve the clinical surveillance and genetic counseling of CMMRD families. It is worth noting that neither family A or B fulfilled either the Amsterdam or Bethesda criteria. Improved detection of CMMRD in children could also contribute to the early diagnosis of HNPCC in their parents before they develop MSI colorectal cancers or other Lynchrelated tumors. This is of particular interest for the detection of PMS2+/- carriers that may currently be under-diagnosed in the population due to the development of late onset tumors after the age of 60 years. Finally, because CMMRD represents a severe hereditary cancer syndrome, our method could in future be applied for prenatal diagnosis in at-risk families.

Example 2

MATERIAL AND METHODS

The lymphoblastoid cell lines were established at the tumor bank of Cochin hospital. Cells were suspended in complete medium at appropriate density and dispensed in 100-ul aliquots into 96-well plates. After 24h, cells were either treated with 0.15– 5μM MNNG and incubated for 9 days at 37°C, or treated with 0.15– 20μM 6-thioguanine for 24h, rinsed and incubated in complete medium for 6 more days at 37°C. All steps of MNNG treatment were performed in presence of *O*6-benzylguanine (final concentration of 20 μM) and 1, 2 or 3 pulses of MNNG treatment were performed. Control groups included cells incubated in complete medium without drug. The effect of the drug on the cell lines was evaluated by the WST1 method (Roche diagnostic). Ten microliters of the WST1 stock solution was added, and the cells were incubated at 37°C for an additional 3 h and the absorbance was read at 450 nm. All samples were tested at least in quadruplicate and at least 2 independent experiments were performed.

RESULTS AND DISCUSSION

In order to facilitate the diagnosis of CMMRD patients and in addition to the ev-MSI method described, the development of a functional method based on the resistance of MMR deficient cells (MMR-KO cells in which one of the MMR genes, such as MLH1, MH2 or MSH6, is inactivated) to particular drugs was provided.

It has been demonstrated that functional MMR is required for the lethality of certain DNA lesions and that its inactivation is accompanied by tolerance to the cytotoxic effect of some drugs. This is a widely acknowledged mechanism underlying resistance to methylating agents and to thiopurine drugs which produce structurally similar types of DNA damage. Tolerance of MMR-KO cells, to thiopurines and methylating agents has been demonstrated primarily with epithelial cells. Here, lymphoblastoid cell lines (LLB) that could be easily established in culture from a blood sample were used. Two drugs that induce DNA damages supported by the MMR system, i.e. 6-thioguanine, a thiopurine drug, and N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) a methylating agent were used. The impact of these drugs on cell survival is evaluated by proliferation assays (WST1 test and reading of the absorbance spectroscopy). The thiopurine/methylation tolerant phenotype of MMR-KO cells was first validated, whatever the MMR gene that was inactivated (MLH1, MH2 or MSH6), in a model of epithelial cells using colon cancer cell lines. Then, the experiments were started on a collection of LLB from control subjects (MMR-wt, n = 20), from Lynch patients (MMR+/-, n = 20) and from CMMRD patients (MMR-KO, n = 6) through the establishment of a collaborative network including the Centre for the Study of Human Polymorphism and the oncogenetic consultation of the Saint-Antoine hospital. Results show that under certain experimental conditions, methylation tolerance is

clearly observed for the LLB issued from CMMRD patients (average survival rate of 90% for MMR-KO LLB vs 40% for MMR-proficient (MMR+/- or MMRwt) LLB, p <0.0001 Student's t test) which supports the possibility to develop a screening test for CMMRD patients (Figure 8).

Validation of these results on a larger number of lymphoblastoid cell lines is performed. Furthermore, thesec preliminary results can also indicate that MMR+/- lines present an intermediate drug response under other experimental conditions which allow the development of a test for the diagnosis of Lynch patients bearing an heterozygous MMR gene mutation.

CLAIMS

1. A method for *in vitro* diagnosing constitutional mismatch repair-deficiency (CMMRD), which method comprises the steps of:

a) culturing lymphocytes obtained from a patient likely to be affected by CMMRD; and

b) detecting the presence or absence of instability on at least one microsatellite marker of CMMRD in the cultured lymphocytes of step a); wherein the detection of instability on at least one microsatellite marker in the cultured lymphocytes of the patient indicates that the patient suffers from CMMRD.

2. The method according to claim 1, wherein said method comprises the steps of:

a0) immortalizing lymphocytes obtained from a patient likely to be affected by CMMRD

a) culturing immortalized lymphocytes obtained at step a0); and

b) detecting the presence or absence of instability on at least one microsatellite marker of CMMRD in the cultured immortalized lymphocytes of step a); wherein the detection of instability on at least one microsatellite marker in the cultured immortalized lymphocytes of the patient indicates that the patient suffers from CMMRD.

3. The method according to claim 1 or 2, wherein said method further comprises a step c) of determining the resistance or sensitivity of the cultured lymphocytes or cultured immortalized lymphocytes of step a) to DNA-damaging drugs, wherein :

- step c) is performed simultaneously or consecutively to step b), and

- the detection of a resistance of the cultured lymphocytes, or cultured immortalized lymphocytes, to DNA-damaging drugs, indicates that the patient suffers from CMMRD

4. The method according to any one of claims 1 to 3, wherein step b) is performed on an un-diluted DNA sample.

5. The method according to any of claims 1 to 4, wherein said at least one microsatellite marker is selected from the group consisting of BAT26, NR21, NR27, NR24 and BAT25.

6. The method according any of claims 1 to 5, wherein said at least one microsatellite marker is BAT26, NR21 and NR27.

7. The method according any of claims 1 to 5, wherein said at least one microsatellite marker is BAT26, NR21, NR27, NR24 and BAT25.

8. The method according to any of claims 1 to 7, wherein in step b) detection of the presence or absence of instability is performed by genotyping said at least one microsatellite marker.

9. The method according to any of claims 1 to 8, wherein detection of the presence or absence of instability on said at least one microsatellite marker of CMMRD includes a comparison with a control sample.

10. The method according to claim 9, wherein said control sample consists of non20 cultured cells obtained from the patient likely to be affected by CMMRD.

11. The method according to claim 10, wherein said non-cultured cells are noncultured peripheral blood cells or non-cultured peripheral plasma cells.

12. A method for identifying microsatellite markers associated with constitutional mismatch repair-deficiency (CMMRD) comprising the steps of:

a) culturing lymphocytes obtained from a patient affected by CMMRD;

b) detecting the presence or absence of instability on at least one microsatellite in cultured lymphocytes of step a); and

c) identifying as a microsatellite marker associated with CMMRD said microsatellite which displays instability in cultured lymphocytes of the patient affected by CMMRD but which does not display instability in noncultured cells of the patient affected by CMMRD.

13. The method according to claim 12, wherein said method comprises the steps of:

a0) immortalizing lymphocytes obtained from a patient affected by CMMRD;

a) culturing immortalized lymphocytes obtained at step a0);

b) detecting the presence or absence of instability on at least one microsatellite in cultured immortalized lymphocytes of step a);

c) identifying as a microsatellite marker associated with CMMRD said microsatellite which displays instability in cultured immortalized lymphocytes of the patient affected by CMMRD but which does not display instability in non-cultured cells of the patient affected by CMMRD.

14. The method according to claims 12 or 13, wherein said non-cultured cells are non-cultured peripheral blood cells or non-cultured peripheral plasma cells.

15. A method for identifying a patient requiring monitoring for detection of cancer onset, which method comprises the steps of:

a) *in vitro* diagnosing if the patient suffers from constitutional mismatch repair-deficiency (CMMRD) according to the method defined in anyone of claims 1 to 11;

b) identifying the patient diagnosed as suffering from CMMRD in step a) as a patient requiring monitoring for detection of cancer onset.

16. A method for identifying a patient at risk of developing a tumor, which method comprises the steps of :

a) *in vitro* diagnosing if the patient suffers from constitutional mismatch repair-deficiency (CMMRD) according to the method defined in anyone of claims 1 to 11;

b) identifying the patient diagnosed as suffering from CMMRD in step a) as a patient at risk of developing a tumor.

ABSTRACT

Screening of Constitutional Mismatch Repair-Deficiency (CMMRD)

The present invention relates to a method for *in vitro* diagnosis of Constitutional Mismatch Repair Deficiency (CMMRD). More specifically, the present invention relates to the use of microsatellite markers for the diagnosis of CMMRD and for identifying patient requiring monitoring for detection of cancer onset and/or patient at risk of developing a tumor. The present invention also relates to a method of identification of microsatellite markers associated with CMMRD.

Figure: None

Discussion

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à l'induction d'un processus oncogénique MSI d'une part dans un modèle murin, afin de démontrer l'impact oncogénique de l'azathioprine, un immunosuppresseur fréquemment utilisé en clinique; et d'autre part, dans un modèle cellulaire utilisant des lignées lymphoblastoïdes issues de patients CMMRD, dans le but d'améliorer le diagnostic de ce syndrome. Dans la suite de mon manuscrit, je discuterai les résultats de mes travaux de recherche obtenus dans ces deux axes et les confronterai avec les données actuelles de la littérature.

Evaluation du risque d'émergence de cancers MSI induits par l'azathioprine dans un modèle murin

Induction par l'Aza d'une lymphomagenèse de type MSI chez les souris *Msh2*^{wt}. L'exposition aux thiopurines est connue pour favoriser la sélection *in vitro* de clones cellulaires MMR déficients. Par ailleurs, l'Aza qui appartient à la famille des thiopurines, a été associée à une augmentation de l'incidence de cancers MSI iatrogènes dans certains contextes cliniques (LNH du patient immunodéprimé, LAM du transplanté d'organe) mais pas dans d'autres (néoplasies intestinales compliquant une MICI, cancers cutanés du patient immunodéprimé). Cependant, il n'y avait pas de démonstration formelle que les thiopurines puissent constituer un facteur de risque pour le développement de cancers MSI iatrogènes. Dans une étude précédemment menée au laboratoire (Chalastanis et al, 2010), il avait été observé une forte toxicité de l'Aza à la dose de 50mg/L (Aza50) vis-à-vis des souris de génotype sauvage (*Msh2*^{wt}). Nous avons émis l'hypothèse qu'en diminuant la dose d'Aza administrée, nous pourrions nous affranchir de cette toxicité et permettre ainsi une survie prolongée des souris *Msh2*^{wt} compatible avec la survenue de lymphomes, dont une faible proportion pourrait être MSI, à l'instar de ce qui est observé chez les LNH du patient immunodéprimé (Borie et al, 2009; Duval et al, 2004). Dans notre étude dose-réponse, nous avons montré *in vivo* pour la première fois, que l'Aza était capable d'induire une lymphomagenèse de type MSI chez la souris *Msh2*^{wt},

dans des conditions de traitement au long cours qui miment le mode d'administration de cette thiopurine chez l'homme.

L'étude dose-réponse menée sur plus de 2 ans montre un effet significatif (P<0,0001 ; test du log-rank) du traitement sur la survie des souris *Msh2*^{wt}, c'est-à-dire qu'en diminuant la dose d'Aza administrée, on a permis une survie prolongée des animaux. Avec l'Aza50, la médiane de survie est réduite (78 jours) et aucune souris n'a développé de lymphome patent (observation de microprolifération de cellules lymphomateuses). Ces souris décèdent vraisemblablement d'une rupture d'organe due à la grande cytotoxicité de l'Aza à cette dose notamment vis-à-vis des souris de génotype sauvage. Avec l'Aza30, on observe une survie significativement prolongée des souris (123 jours) mais la majorité des animaux (23/25; 92%) ne présentent toujours pas de lymphomes et meurent probablement d'une toxicité encore significative de l'Aza. Seulement 2 souris ont échappé à une mort précoce. Elles ont développé un lymphome de survenue tardive mais de type non-MSI. C'est à la dose la plus faible (Aza10) que l'on observe la médiane de survie la plus longue (568 jours), bien qu'encore significativement différente de celle des souris non traitées (652 jours P=0,007; test du log-rank), et 7/23 (30%) des animaux ont développé un lymphome. Par conséquent, chez les souris *Msh2*^{wt}, nous avons observé une balance entre les propriétés cytotoxiques et oncogéniques de l'Aza. Par ailleurs, une souris (1/7) a développé un lymphome de type MSI (souris C13).

L'effectif limité de souris *Msh2*^{wt} ayant développé un lymphome (n=7) sous Aza10 représente une limite de notre étude. Cependant, les cohortes de souris utilisées s'inscrivent dans les recommandations du comité d'éthique en expérimentation animale, et afin de respecter la règle des 3R (Réduire, Raffiner et Remplacer) et il n'était pas éthique d'augmenter le nombre d'animaux utilisés (tous génotypes confondus : n=201 sous Aza, n=73 sous CsA, n=81 non traitées). Si on extrapole nos résultats aux observations cliniques faites chez les LNH du patients transplantés d'organe, on constate que l'incidence du phénotype tumoral MSI est comparable (1/7 souris *Msh2*^{wt} (14%) a développé lymphome MSI après traitement par l'Aza10 et 9/111 patients (8%) ont développé un LNH de phénotype MSI après un traitement immunosuppresseur comprenant de l'Aza) (Duval et al, 2004).

Effet du traitement par l'Aza sur la survie et la lymphomagenèse MSI des souris *Msh2*^{ko} et *Msh2*$^{+/-}$. Selon le génotype des autres souris (*Msh2*^{ko} ou *Msh2*$^{+/-}$), nous avons observé une différence de réponse au traitement. Les souris *Msh2*^{ko} qu'elles soient non traitées, traitées avec de l'Aza ou de la CsA, ont toutes développé des lymphomes MSI patents caractérisés par une organomégalie, se traduisant par une paralysie des pattes postérieures et/ou des difficultés respiratoires. Ces lymphomes MSI très agressifs, vraisemblablement dus à une pénétrance quasi-complète du phénotype tumoral, sont responsables des sacrifices précoces (avant 12 mois) des souris *Msh2*^{ko}. Chez les souris *Msh2*$^{+/-}$ comme chez les souris *Msh2*^{wt}, nous avons observé un effet dose-réponse du traitement sur la survie (164, 220 et 602 jours avec respectivement l'Aza50, Aza30 et Aza10; P<0,0001; test du log-rank). L'incidence du phénotype tumoral MSI dépend également de la dose d'Aza (respectivement 22/22, 21/23 et 4/13; P <0,0001; test exact de Fisher).

L'induction d'une oncogenèse de type MSI est-elle spécifique des thiopurines ? Il faut signaler que les patients transplantés d'organe reçoivent en traitement des combinaisons de plusieurs molécules immunosuppressives adaptées en fonction du type de greffe, de l'état du patient et de sa tolérance aux médicaments. Cette combinaison varie au cours de la vie du patient et est modulée année après année, ce qui engendre des difficultés à établir un lien entre la survenue de cancers MSI et l'implication d'une molécule immunosuppressive en particulier.

Par ailleurs, si l'implication de l'Aza dans l'oncogenèse MSI peut s'expliquer par un avantage sélectif conféré par l'Aza aux cellules MMR déficientes, lié à leur phénotype de tolérance aux thiopurines, une hypothèse alternative est qu'une levée de l'immunosurveillance favoriserait plus particulièrement l'émergence des tumeurs MSI connues pour être très immunogènes. En effet, plusieurs éléments permettent d'avancer que les tumeurs MSI sont très surveillées par le système immunitaire de l'hôte. Le processus oncogénique MSI génère dans les cellules tumorales de nombreux peptides néo-antigéniques présentant une extrémité C-terminale aberrante qui sont reconnus par le système immunitaire de l'hôte et peuvent entrainer une réponse immunitaire contre les cellules tumorales MSI et limiter leur prolifération (Ishikawa et al, 2003; Saeterdal et al, 2001; Schwitalle et al, 2008). Par ailleurs, il a été montré *in vitro* que des cellules T issues de patients présentant une tumeur MSI, étaient capables de reconnaitre des

néo-antigènes tumoraux spécifiques de MSI sans stimulation préalable (Schwitalle et al, 2008). Les cancers MSI sont généralement très infiltrés par des cellules immunes, qui témoignent d'une immunité anti-tumorale active (Smyrk et al, 2001), et il est reconnu que l'intensité de ce processus immun déclenché par l'hôte contre la tumeur joue un rôle important pour contrôler la progression de ces cancers (Nosho et al, 2010). Il est donc envisageable qu'une baisse de l'immunosurveillance constitue un facteur favorisant l'émergence et la prolifération de clones tumoraux MSI (Karran & Attard, 2008). Afin de déterminer si l'induction de cancers MSI est spécifique des thiopurines ou plus généralement associée aux effets de l'immunosuppression par elle-même, la ciclosporine A (CsA), un autre immunosuppresseur fréquemment prescrit chez l'homme, a été administré aux souris pour comparaison. La CsA est une molécule de la famille des anti-calcineurines. C'est un inhibiteur de la prolifération lymphocytaire et son mode d'action est indépendant du système MMR (**Figure 13**).

Alors que parmi les 7 souris *Msh2*^{wt} ayant développé un lymphome sous Aza10, 1 a développé un lymphome de type MSI, nous n'avons pas observé de phénotype MSI parmi les 6 souris *Msh2*^{wt} ayant développé un lymphome sous CsA. De plus, chez les souris *Msh2*$^{+/-}$, nous n'avons pas observé une augmentation significative de l'oncogenèse MSI sous CsA par rapport au groupe contrôle (respectivement, 3/10 versus 1/7; P=0,60; test exact de Fisher), contrairement à ce qui a été observé avec les différentes doses d'Aza. Par conséquent, nos données sont en faveur d'un rôle de l'Aza, mais pas de la CsA, dans l'induction de lymphomes MSI chez la souris. Une limite de notre étude est l'utilisation d'une seule de dose de CsA. Il est envisageable qu'en augmentant la dose de CsA, nous puissions induire plus de lymphomes, éventuellement de type MSI. Cependant, il faut signaler que la dose que nous avons utilisée est, en équivalent humain, légèrement supérieure à la posologie utilisée chez l'homme (Reagan-Shaw et al, 2008).

Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer la survenue de lymphomes non-MSI sous CsA. Il a été montré que les CNI modifient l'expression de deux variants d'épissage de CXCR3 (CXC *chemokine receptor* 3). CXCR3 est un récepteur de la chémokine CXCL10 (CXC *chemokine ligand* 10), considérée comme un inhibiteur de tumeur. En présence de CNI, l'expression de CXCR3-A (facteur de prolifération) est augmentée alors que l'expression de

CXCR3-B (inhibiteur de croissance) est diminuée (Datta et al, 2008). Par ailleurs, il a été rapporté que les CNI peuvent: (i) favoriser la croissance tumorale en produisant du TGF-β (*transforming growth factor-beta*) (Khanna et al, 1999; Maluccio et al, 2003) et (ii) induire cette croissance tumorale par la surexpression de facteurs angiogéniques (VEGF, cytokine *vascular endothelial growth factor*) (Basu et al, 2008 ; Guba et al, 2002). Les CNI peuvent également activer et/ou inhiber l'expression de gènes importants pour des fonctions de régulation telles que l'apoptose (Tiu et al, 2006). Une étude a également rapporté une activation de la voie de signalisation Ras-Raf dans les tissus tumoraux des souris traitées par un CNI (Datta et al, 2009).

Haploinsuffisance des souris *Msh2*$^{+/-}$ vis-à-vis de la réponse au traitement par l'Aza. Dans notre étude, nous avons observé que la plus grande tolérance des souris *Msh2*$^{+/-}$ par rapport aux *Msh2*^{wt} vis-à-vis de l'Aza50 précédemment rapportée (Chalastanis et al, 2010) persiste à la dose d'Aza30. A la dose d'Aza10, il n'y a plus de différence en fonction du génotype *Msh2* et l'on s'affranchit donc de la forte toxicité de l'Aza vis-à-vis des cellules MMR^{wt}. En accord avec ces données, une étude a rapporté dans un modèle murin impliquant un autre gène MMR (*Mlh1*) et utilisant un agent méthylant (MNU), que les souris *Mlh1*$^{+/-}$ sont plus tolérantes au MNU que les souris *Mlh1*^{wt} (Kawate et al, 2000). De manière concordante, des données *in vitro* utilisant des LCL ont rapporté que les lignées *MSH2*$^{+/-}$ sont plus tolérantes que les LCL MMR^{wt} au témozolomide (un autre agent méthylant) (Marra et al, 2001). Dans notre étude, nous avons observé de manière similaire que les LCL *MSH2*$^{+/-}$ (n=12) sont moins sensibles que des LCL MMR^{wt} (n=12) au MNNG (un autre agent méthylant) et élargi ces résultats aux LCL *MSH6*$^{+/-}$ (n=13) (cf. Article 2). L'ensemble de ces données est en faveur d'un phénomène d'haploinsuffisance, situation dans laquelle l'expression d'un seul allèle (MSH2$^{+/-}$) ne permet pas d'assurer normalement la fonction de signalisation des lésions à l'ADN du gène.

Quels sont les mécanismes sous-jacents à l'inactivation MMR dans les tumeurs MSI iatrogènes ? Chez les souris *Msh2*$^{+/-}$, le principal mécanisme sous-jacent à l'inactivation du système MMR dans les lymphomes MSI iatrogènes est la perte somatique de l'allèle sauvage qui s'accompagne d'une perte d'expression de la protéine Msh2 en IHC (Chalastanis et al,

2010). De manière intéressante, le seul lymphome MSI observé chez une souris *Msh2*^{wt} sous Aza10 (souris C13), montre une conservation de l'expression des 4 principales protéines MMR (Msh2, Msh6, Mlh1 et Pms2). Chez l'homme, une étude de notre groupe menée chez 13 patients atteints de MICI et ayant développé un syndrome lymphoprolifératif, révèle 1 cas de phénotype MSI (et EBV négatif) chez un patient ayant reçu de l'Aza. De manière analogue à la souris C13, l'analyse IHC montre une conservation de l'expression des 4 principales protéines MMR. Par ailleurs, notre équipe a également décrit qu'un tiers (3/8) des LNH de phénotype MSI survenant chez les transplantés d'organe traités notamment avec de l'Aza, montre également une conservation de l'expression des 4 principales protéines MMR (Borie et al, 2009).

Plusieurs hypothèses peuvent être proposées afin d'expliquer une conservation de l'expression des 4 principales protéines MMR dans une tumeur MSI: (i) l'Aza est à l'origine de mutation de transition qui peuvent générer des mutations faux-sens conduisant à la production d'une protéine MMR non fonctionnelle mais détectable en IHC; (ii) une mutation d'un autre gène associé avec le système MMR tel qu'*EXO1*, *PMS1* ou *PMS6*; (iii) une modification épigénétique de l'histone H3K36 qui inhibe l'ancrage du complexe MutSα à l'ADN. Les protéines du complexe MutSα sont donc détectables en IHC, mais elles ne sont pas capables d'assurer leur fonction (Li et al, 2013; Li, 2008).

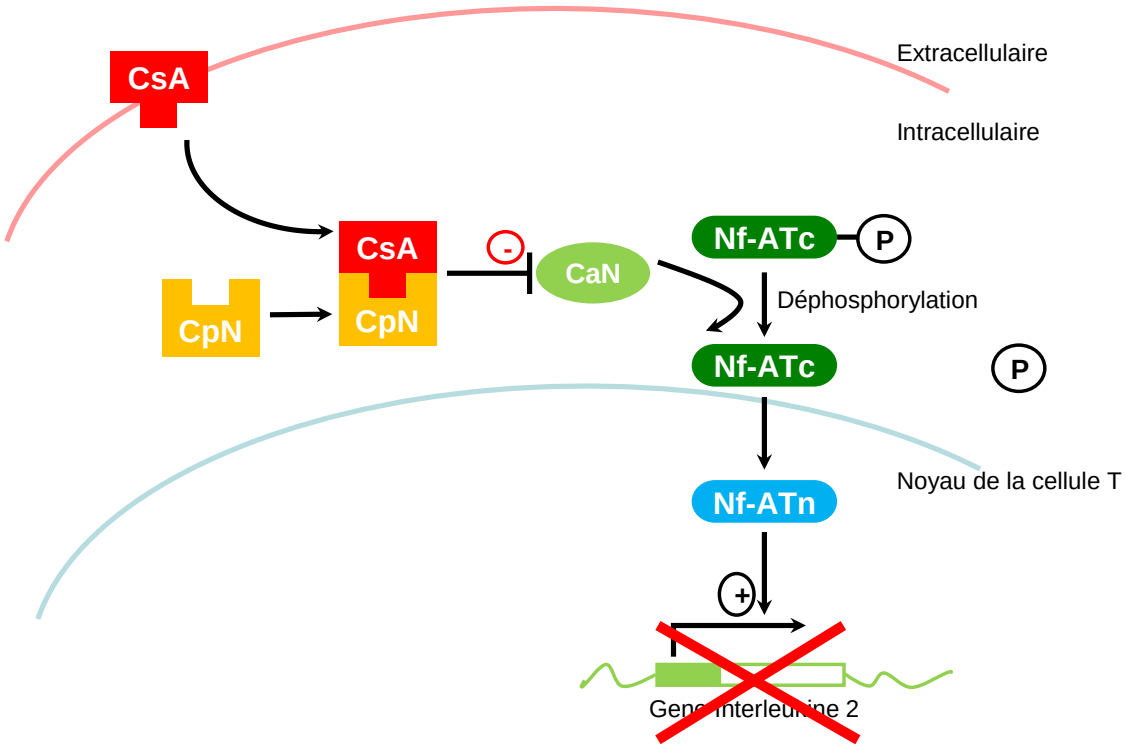


Figure 13. Mode d'action de la ciclosporine A (CsA). La calcineurine (CaN) déphosphoryle le facteur nucléaire d'activation des lymphocytes T (NF-ATc, *nuclear factor of activated T-cells*), permettant ainsi sa translocation nucléaire et l'activation des gènes cibles dont l'interleukine 2 (IL-2) et d'autres cytokines. Il s'agit là d'un élément clef dans la réponse immunitaire, car l'IL-2 va grandement augmenter la production des lymphocytes T au sein de l'organisme. En présence de CsA, il y a formation d'un complexe entre cette dernière et la ciclophiline (CpN). La CaN devient incapable de déphosphoryler le NF-ATc, qui ne peut plus se transloquer dans le noyau et activer la transcription de gènes cibles (d'après Stepkowski, 2000).

Aide au diagnostic du syndrome CMMRD: une nouvelle approche exploitant les caractéristiques fonctionnelles des cellules MMR déficientes

Nous avons développé une nouvelle approche diagnostique du syndrome CMMRD basée sur la détection de caractéristiques fonctionnelles liées à la déficience MMR déjà rapportée dans les cellules tumorales, mais jamais décrite dans des cellules non transformées. Afin d'étudier les cellules saines des patients CMMRD, nous avons utilisé des lymphocytes immortalisés par le virus EBV (LCL, *lymphoblastoid cell line*). Cette approche peut donc être proposée à un individu indemne de tumeur, de manière prospective.

L'analyse génétique constitutionnelle des gènes MMR, une méthode diagnostique descriptive. A l'heure actuelle, la technique de référence pour le diagnostic du CMMRD, est l'analyse génétique constitutionnelle des gènes MMR qui comprend le séquençage et la recherche de réarrangements de grande taille. Cette méthode, lorsqu'elle permet d'identifier les mutations délétères responsables du syndrome, permet aussi de tester les apparentés du patient index. Cependant, il s'agit d'une technique coûteuse et longue, c'est pourquoi elle n'est proposée qu'aux patients remplissant des critères très restrictifs. A l'avenir, des améliorations techniques telles que le séquençage de nouvelle génération, devrait permettre à un plus grand nombre de patients de bénéficier de cet outil, en baissant le coût de revient et en diminuant le délai de réponse. Toutefois, le séquençage de nouvelle génération ne permet pas de résoudre les difficultés d'interprétation liées à la présence des nombreux pseudogènes de *PMS2* (n=15). L'un de ces pseudogènes, *PMS2CL*, se trouve à seulement 0,7Mb du gène *PMS2* fonctionnel, et à cause des nombreux remaniements de séquences, la région 3' du gène et du pseudogène ne peuvent pas être distinguées de manière fiable. Il en résulte un manque de sensibilité de l'analyse génétique constitutionnelle de *PMS2* (De Vos et al, 2004; Wernstedt et al, 2012). Par ailleurs, l'analyse génétique est une méthode descriptive qui s'avère non contributive en cas de VSI (30% des cas) (Sijmons et al, 2013). En France, ces VSI ne peuvent pas être utilisés dans la prise en charge des patients mais sont source d'anxiété dans les familles (O'Neill et al, 2009). Près de 2 950 VSI ont été rapportés jusqu'à présent dans la base de données de mutations MMR constitutionnelles InSiGHT (1 181 pour *MLH1*, 1 002 pour *MSH2*, 533 pour *MSH6* et 234 pour

PMS2). Par ailleurs, il est probable que le nombre de VSI augmente de manière importante avec l'utilisation du séquençage de nouvelle génération. Afin de prédire la pathogénicité éventuelle des VSI, il est possible de tenir compte du degré de conservation de l'acide aminé muté, de la différence physicochimique entre l'acide aminé d'origine et celui résultant de la mutation, de la position de cet acide aminé dans les domaines protéiques importants pour la fonction de la protéine. Ces données sont regroupées et hiérarchisées dans des logiciels de prédiction *in silico*.

Deux tests fonctionnels complémentaires. Nous avons développé deux tests fonctionnels de diagnostic du syndrome CMMRD efficaces pour les 3 gènes MMR testés (*MLH1*, *MSH6* et *PMS2*) qui représentent la très grande majorité des familles CMMRD rapportées à l'heure actuelle. Aucun élément ne permet de penser que les patients CMMRD mutés sur le gène *MSH2* sont susceptibles de répondre différemment à nos tests. Nos résultats montrent notamment que la lignée cancéreuse colique *MSH2*^{ko} (LoVo) est résistante au MNNG de manière comparable à celle des autres lignées MMR déficientes testées (HCT15 - *MSH6*^{ko}, KM12, LIM2405, LS174T, HCT116 - *MLH1*^{ko}). Une limite de notre étude concerne l'effectif restreint de patients CMMRD testés (n=19), mais il faut rappeler qu'il s'agit d'un syndrome rare (146 patients CMMRD issus de 91 familles à travers le monde), et notre étude représente la plus grande série de patients CMMRD (n=24) décrite à ce jour. L'avantage indéniable de nos tests fonctionnels basés sur deux caractéristiques fonctionnelles, le phénotype MSI et la tolérance aux agents méthylants, est de permettre de classer les VSI en deux catégories: les variants dont la pathogénicité est hautement probable, et ceux probablement non pathogènes.

La mise en évidence d'un phénotype MSI n'est jamais observée dans l'ADN germinal issu des lymphocytes primaires des patients CMMRD avec la méthode classiquement utilisée dans les tumeurs (PCR globale à l'aide de marqueurs mononucléotidiques). Le phénotype MSI étant fonction du nombre de divisions cellulaires (accumulation d'erreurs réplicatives), notre hypothèse de travail était qu'on pourrait forcer l'expression d'un phénotype MSI *ex vivo* (*ev*MSI) en utilisant des LCL qui prolifèrent à l'infini. Effectivement, nos résultats montrent que l'acquisition d'un phénotype *ev*MSI survient dans les LCL issues des patients CMMRD mais jamais dans les lignées issues de patients contrôles, ce qui montre la très grande spécificité de ce test. Le phénotype *ev*MSI est objectivable par un décalage d'au moins une paire de bases sur

l'un des trois marqueurs mononucléotidiques (NR21, NR27 et BAT26), entre l'ADN germinal et l'ADN issu de la LCL. Il faut noter que l'obtention d'une LCL n'est pas toujours possible ; par exemple dans notre étude, nous ne disposons pas de lignées pour 5 patients (patients décédés ou échecs d'établissement de la lignée). Ce phénotype *ev*MSI est observé après 45 jours de culture au plus tôt (patients C20.1 et C20.2) et 270 jours au plus tard (patient C21). Dans notre série, 20/22 des patients testés présentent un phénotype *ev*MSI avant 130 jours de culture. Ainsi, comme attendu, la sensibilité du test *ev*MSI est fonction du temps de culture des LCL.

Le second test utilise la tolérance des cellules MMR déficientes à certains agents génotoxiques. Nous avons testé la 6-TG qui appartient à la classe des thiopurines, et le MNNG qui est un agent méthylant. Les agents méthylants sont plus discriminants que les thiopurines, respectivement d'un facteur 10 et 100 (Stojic et al, 2004a). Cette observation n'est pas fonction du type cellulaire car nous l'avons retrouvée dans les lignées cancéreuses coliques et les LCL. Cette différence pourrait s'expliquer par les modes d'action de ces deux agents génotoxiques. La 6-TG nécessite deux cycles de réplication avant que le métabolite n'entraîne un effet cytotoxique médié par le système MMR, ce qui n'est pas le cas du MNNG (1 seul cycle). Ainsi dans nos conditions expérimentales, le 6-TG ne permet pas de discriminer les cellules MMR-déficientes et MMR-proficientes, contrairement au MNNG.

Par ailleurs, dans les LCL issues de patients atteints du syndrome de Lynch nous avons observé une hétérogénéité de réponse au MNNG selon le gène muté. Une étude avait déjà rapporté que les LCL *Msh2*$^{+/-}$ étaient moins sensibles que les LCL *Mlh1*$^{+/-}$, ces dernières répondant de manière comparable à celle des lignées MMR^{wt} (Marra et al, 2001). Nos travaux confirment ces observations, et ont permis de montrer que les LCL *Msh6*$^{+/-}$ sont encore plus résistantes. Quant aux LCL *Pms2*$^{+/-}$, nous avons trop peu de cas (n=4) pour conclure. Il faut noter que le test de tolérance à la méthylation a l'avantage de ne pas être fonction du temps de culture des LCL. Cependant, en raison de la résistance accrue de certaines LCL issues de patients Lynch, le test de tolérance à la méthylation présente un risque de résultat faux positif, notamment pour *MSH6*, ce qui en fait une méthode très sensible mais moins spécifique.

Nous avons observé une très bonne concordance (54/56; 96,4%) entre nos deux tests fonctionnels sur l'ensemble des patients. Les deux patients (C21 et C23) qui ont montré des résultats contradictoires aux tests fonctionnels présentent une tolérance à la méthylation mais pas de phénotype *ev*MSI. Puisque nous avons fixé une durée de culture maximale des LCL (4 mois), ce dernier point est susceptible d'être attribué à un temps de culture trop court. Cependant, dans le cadre d'un test diagnostique, il ne parait pas raisonnable de proposer un délai plus long. Une hypothèse alternative est celle d'un découplage entre les fonctions de réparation des mésappariements et de signalisation des dommages induits de l'ADN comme rapporté pour certaines mutations MMR chez la souris (Lin et al, 2004; Yang et al, 2004).

En conclusion, les deux tests fonctionnels présentent des caractéristiques complémentaires : l'un est très spécifique (*ev*MSI), l'autre très sensible (tolérance à la méthylation), le premier est fonction du temps de culture mais pas le second. C'est pourquoi nous n'avons pas privilégié l'utilisation d'un test par rapport à l'autre, mais nous recommandons de continuer à les réaliser tous deux en parallèle.

La recherche d'un phénotype d'instabilité des microsatellites dans le tissu sain. Nous avons montré qu'il était possible de détecter un phénotype d'instabilité des microsatellites sur les marqueurs mononucléotidiques dans le tissu sain à condition d'utiliser les LCL (et non pas l'ADN germinal) des patients CMMRD. De manière intéressante, une publication récente a rapporté l'observation d'un pic surnuméraire spécifique des patients CMMRD, en utilisant des marqueurs dinucléotidiques à partir de l'ADN germinal (technique gMSI pour *germinal* MSI) (Ingham et al, 2013). Cette méthode, qui est très simple à mettre en œuvre et ne nécessite pas l'obtention d'une LCL, avait été testée sur un nombre très restreint de patients représentant seulement 3 génotypes MMR^{ko} différents. La principale limitation rapportée était qu'elle ne permet pas de détecter les patients ptésentant une inactivation du gène *MSH6* (deuxième gène le plus impliqué dans le syndrome CMMRD). Nous avons donc évalué la validité du test gMSI dans notre série de patients. Comme précédemment décrit, nous avons observé un test gMSI normal chez les patients porteurs de mutations du gène *MSH6*. De manière surprenante, un patient CMMRD porteur de mutation biallèlique du gène MMR *PMS2* n'a pas été détecté par le test gMSI (patient C18). Le manque de sensibilité de la technique gMSI semble donc ne pas

s'appliquer uniquement aux patients CMMRD présentant des mutations du gène *MSH6*, mais aussi à certaines mutations impliquant le gène *PMS2*. Par ailleurs, il faut également souligner que le test était non contributif dans 3/18 (16,7%) patients CMMRD avérés, 3/20 (15%) patients Lynch et 39/220 (17,7%) contrôles.

La recherche d'une perte d'expression de protéine MMR dans le tissu sain par IHC. Une publication récente a proposé l'utilisation de l'IHC comme outil de détection des patients CMMRD avec une sensibilité de 100% (Bakry et al, 2014). En raison de leur déficience MMR constitutionnelle, les patients CMMRD doivent effectivement présenter une absence d'expression de protéine MMR fonctionnelle, pouvant se traduire par un marquage IHC négatif dans tous les tissus. Cependant, l'étude de Bakry et al. a été réalisée sur un nombre restreint de cas (n=18 patients CMMRD avec données IHC, issus de 12 familles différentes, dont beaucoup présentent des VSI) et il est difficile d'évaluer de manière rigoureuse la sensibilité et la spécificité de cette technique à partir de cette seule étude. Notre étude n'a pas été initialement conçue dans le but d'étudier la valeur diagnostique de l'IHC, mais au vu des résultats de Bakry et al., nous avons également évalué ce paramètre dans notre série. Parmi les 22 patients pour lesquels les données d'IHC sur tissu sain étaient disponibles, 15 ont montré une perte d'expression de l'une des quatre protéines MMR (vrais positifs pour 14 des 16 patients CMMRD, et faux positif pour 1 des 6 des patients non-CMMRD); 7 ont montré une conservation de l'expression des quatre protéines MMR (faux négatifs pour 2 des 16 patients CMMRD, et vrais négatifs pour 5 des 6 patients non-CMMRD). Ces données indiquent que l'IHC sur tissu sain a une sensibilité de 87,5% (14/16) et une spécificité de 83,3% (5/6) dans notre série. Ces résultats peuvent s'expliquer par la difficulté d'interprétation du marquage IHC chez les patients CMMRD en absence de contrôle interne positif, et par la présence de mutations MMR faux-sens conduisant à la production d'une protéine inactive mais détectable par IHC (cf. Partie III. B. 3. b.).

Prise en charge des patients à risque pour le syndrome CMMRD. Il ne s'agit en aucun cas de supplanter les techniques diagnostiques déjà existantes, mais plutôt d'utiliser ces nouveaux outils que sont les tests fonctionnels, de manière complémentaire en vue d'améliorer le diagnostic du syndrome CMMRD. Dans notre série de patients, l'analyse génétique

constitutionnelle a montré une sensibilité de 67,3% et une spécificité de 98,8%; alors que le test de tolérance à la méthylation a montré une sensibilité de 95,5% et une spécificité de 96,8%. Si l'on combine ce dernier avec le test *ev*MSI ou gMSI, on obtient alors une sensibilité de 94,1% et une spécificité de 98,8%. Nos tests devraient être intégrés dans une stratégie diagnostique globale, englobant l'analyse génétique constitutionnelle, gMSI et l'IHC, et qui tient compte des avantages et limites de chacune de ces techniques, de leur facilité de mise en oeuvre et du matériel biologique disponible.

Contribution de notre série de patients, pour une meilleure connaissance du spectre clinique et des mutations délétères associées au syndrome CMMRD. Dans notre étude, nous avons trouvé des patients Lynch porteurs de mutations pathogènes *PMS2* ou *MSH2*, et atteints de cancers à un âge particulièrement précoce pour ce syndrome (cancer colique à 12, 17 ou 25 ans chez les patients C24, C26 and C25). Par ailleurs, certains patients CMMRD présentent un phénotype tumoral modéré bien qu'ayant un âge avancé (patient C21). C'est pourquoi même si les deux prédispositions héréditaires aux cancers MSI que sont le syndrome de Lynch et le syndrome CMMRD, sont bien distinctes d'un point de vue moléculaire, il est possible d'observer un continuum clinique entre ces deux syndromes.

Notre étude rapporte pour la première fois, la survenue d'un ostéosarcome chez un patient CMMRD (patient C05). Par conséquent, l'ostéosarcome devrait être ajouté au spectre des tumeurs associées au syndrome CMMRD. Dans notre série, nous décrivons 2 mutations PMS2, c.137G>T faux-sens prédit pathogénique et c.2007-2A>G variant d'épissage pathogène, qui ont été retrouvées chacune dans 3 familles non apparentées (patients C01.1, C01.2, C07, C08 et patients C06, C09.1 and C10.1). De plus, trois mutations PMS2 trouvées dans notre étude, c.137G>T, c.400C>T non-sens, et c.2249G>A VSI, ont été précédemment décrites dans respectivement 6, 1 et 1 famille(s) (Agostini et al, 2005; Auclair et al, 2007; De Vos et al, 2004; Giunti et al, 2009; Herkert et al, 2011; Jackson et al, 2008; Senter et al, 2008) ce qui suggère qu'en plus de l'effet fondateur de la mutation c.2404C>T décrite dans plusieurs familles Lynch originaires du Pakistan (De Vos et al, 2006), d'autres mutations telles que c.137G>T dont la prévalence reste à déterminer, seraient de bons candidats pour des mutations fondatrices.

Perspectives

Mise au point *in vitro* d'un test fonctionnel à visée diagnostic du syndrome de Lynch

La majorité des mutations MMR détectées chez les patients atteints du syndrome de Lynch, conduit à des troncatures ou délétions de la protéine, et par conséquent leur pathogénicité ne fait aucun doute. Cependant une proportion significative des altérations MMR observées sont des mutations faux-sens ou des variants d'épissage pour lesquels la conséquence biologique fonctionnelle reste à déterminer (VSI) (de la Chapelle, 2004). Tous gènes MMR confondus, près de 2 950 VSI ont été rapportés jusqu'à présent dans la base de données InSiGHT (Sijmons et al, 2013). De plus, le nombre de VSI devrait augmenter avec l'avènement du séquençage de nouvelle génération. Certains tests fonctionnels permettent déjà d'évaluer la pathogénicité des transcrits anormaux, les interactions entre les protéines, la stabilité ou la localisation subcellulaire de la protéine MMR (Heinen & Juel Rasmussen, 2012; Rasmussen et al, 2012; Wielders et al, 2014). Au cours de ma thèse, j'ai amorcé des travaux qui utilisent les deux mêmes propriétés fonctionnelles que celles exploitées dans le diagnostic du syndrome CMMRD, c'est-à-dire le phénotype MSI et la résistance à certains agents méthylants (MNNG), afin de tenter de mettre au point un test fonctionnel permettant d'apprécier le caractère pathogène ou non de VSI, ce qui pourrait constituer un outil supplémentaire d'aide au diagnostic du syndrome de Lynch. La mise au point d'un test de diagnostic moléculaire à la fois sensible et spécifique aurait un intérêt clinique évident, d'autant plus que le syndrome de Lynch est l'un des syndromes de prédisposition au cancer les plus fréquents.

L'objectif est de réaliser un test de complémentation fonctionnelle en synthétisant à façon une ADN copie double brin du variant à tester, cloné dans un vecteur couplé au gène rapporteur mCherry, en vue d'une lipotransfection (Turbofect Life Technologies) de ces ADNc *MLH1* ou *MSH2* variants, respectivement dans la lignée de cancer colique HCT116 (*MLH1*-déficiente) ou LoVo (*MSH2*-déficiente). Notre choix s'est porté sur les gènes *MLH1* et *MSH2*, car ce sont les principaux gènes mutés dans le syndrome de Lynch. La fonction de réparation du système MMR dans les cellules transfectées sera évaluée par des tests de formation de colonies en réponse à un agent méthylant (Franken et al, 2006). Le phénotype MSI sera évalué à l'aide de 2 vecteurs, (i) le vecteur contrôle pcDNA3.1-EGFP-$(CA/T)_{12}$ qui contient une séquence CA12 (répétition de 12 motifs) et permet l'expression constitutive de l'EGFP (*enhanced green fluorescent*

protein) sous le contrôle du promoteur du cytomegalovirus (CMV) et permet d'évaluer l'efficacité de transfection et (ii) le plasmide CA13 rapporteur de l'instabilité des microsatellites, puisqu'il nécessite un décalage du cadre de lecture pour permettre l'expression de l'EGFP (Gasche et al, 2003; Gasche et al, 2001; Hausner et al, 1999). Les résultats seront exprimés en fraction mutante normalisée par l'efficacité de transfection (cellules transfectées par $p(CA)_{13}$-EGFP positives x100/cellules transfectées par $p(CA/T)_{12}$-EGFP positives). Une restauration de la sensibilité des cellules cancéreuses coliques à l'agent méthylant et une perte du phénotype MSI sont attendues seulement si le variant est non pathogène. Ces études devront être poursuivies au laboratoire.

Chimioprévention des cancers associés au syndrome CMMRD: étude *in vivo* chez la souris *Msh2* déficiente

Après le diagnostic d'un syndrome CMMRD, une prise en charge efficace doit être proposée au patient en termes de surveillance clinique, dans le but d'éviter la survenue de cancers. Néanmoins, aucune recommandation n'existe pour le moment concernant la chimioprévention des cancers chez les patients CMMRD, notamment parce qu'il s'agit d'un syndrome d'identification récente, dont le spectre tumoral est très large (lymphomes, leucémies, tumeurs cérébrales et/ou colorectales, …). De manière intéressante, deux études de cas suggèrent l'efficacité possible de l'acide rétinoïque dans la prévention des cancers chez des patients CMMRD. Gottschling et al. ont décrit un patient CMMRD de 7 ans, porteur d'une mutation délétère homozygote du gène PMS2, traité pour son glioblastome (grade IV) par radiothérapie et chimiothérapie (produit non précisé) puis par de l'acide rétinoïque (RA pour *retinoïc acid*) au long cours. Après 7 ans de traitement, ce patient âgé alors de 14 ans présente une sécheresse cutanée et une chéilite (inflammation, accompagnée de fissure des commissures des lèvres), effet secondaire du traitement par les RA qui conduisent à l'arrêt du traitement. Cet arrêt coïncide avec une rechute de la tumeur cérébrale, et l'apparition simultanée dans trois localisations différentes de tumeurs associées au spectre clinique du syndrome de Lynch. Trois ans plus tard, ce patient décède à l'âge de 17 ans (Gottschling et al, 2008). Le même type de longue rémission d'un patient CMMRD ayant développé un glioblastome, a été décrit chez un

patient traité au long cours par RA pour des raisons dermatologiques (Rutz et al, 1991).

On ne connaît pas les mécanismes par lesquels les RA seraient susceptibles de prévenir l'apparition de tumeurs MSI, spécifiquement. Plus globalement, il est montré que les acides rétinoïques sont capables de rediriger les cellules cancéreuses vers un phénotype normal, en inversant, ou en supprimant l'évolution des lésions, ou encore de prévenir l'invasion tumorale (Bartolini et al, 2004; Lotan, 1996a; Lotan, 1996b; Moon, 1994; Niles, 2007; Sporn et al, 1976; Sporn & Roberts, 1991; Tang & Gudas, 2011). Une variété de rétinoïdes inhibent *in vivo* le développement du cancer de la vessie, du sein, du foie, du poumon, du pancréas, de la prostate et de la peau (Cheepala et al, 2007; Lupulescu, 1993; Moon, 1994; Smith et al, 1992). Le faible taux de RA dans le cancer de la prostate pourrait être à l'origine d'un environnement favorisant la transformation cellulaire et plusieurs études ont rapporté une corrélation entre la sensibilité des cellules tumorales aux rétinoïdes et le taux d'expression des récepteurs nucléaires des rétinoïdes (Miller, 1998). De plus, l'emploi de RA dans le traitement de la leucémie promyélocytique aiguë est un succès (Parisotto et al, 2006). Divers rétinoïdes sont utilisés en clinique, dans des approches de chimioprévention chez des patients porteurs de lésions pré-malignes ou après le traitement de tumeurs primaires (Lotan, 1996a; Lotan, 1996b; Lupulescu, 1993; Moon, 1994; Siddikuzzaman et al, 2011; Smith et al, 1992).

Bien que les rétinoïdes exogènes se soient avérés significativement efficaces contre certains cancers, les doses nécessaires sont associées à des toxicités aiguës et chroniques pouvant se traduire par une sécheresse cutanée. C'est pourquoi une approche alternative aux RA, telle que l'utilisation d'antagonistes tels que les RAMBA (*retinoïc acid metabolism blocking agent*), qui permettent d'augmenter le taux d'acide retinoïque endogène en inhibant leur voie de dégradation, pourrait également être envisagée (De Coster et al, 1992; Njar et al, 2006).

Au laboratoire, nous disposons de souris déficientes pour le gène *Msh2* (*Msh2*^{ko}), sur deux fonds génétiques FVB et B6. Spontanément, ces souris développent respectivement, des lymphomes MSI pour le fonds FVB et des lymphomes MSI associés à des tumeurs coliques MSI, pour le fonds B6. Si les souris *Msh2*^{ko} ne développent pas de cancers représentatifs de l'ensemble du spectre tumoral du syndrome CMMRD, ces animaux constituent tout de même un modèle d'étude *in vivo* intéressant des patients CMMRD. En administrant à des souris

Msh2^{ko} un RA, associé ou non à un RAMBA, dans un protocole point limite, il serait possible d'évaluer la capacité du traitement à retarder la survenue des tumeurs chez les souris.

Utilisation du modèle de xénogreffe sur souris *nude* afin d'évaluer la sensibilité des cancers associés au syndrome CMMRD aux traitements

Certains cancers survenant dans le contexte du syndrome CMMRD sont traités par des agents alkylants (témozolomide) ou des thiopurines (6-MP). C'est notamment le cas des gliomes dont le traitement de référence est le témozolomide. Cependant, des formes très agressives de gliomes sont décrites comme résistantes au traitement; par ailleurs, pour traiter certaines leucémies, on administre aux patients de la 6-MP. Or ces molécules (témozolomide et 6-MP) ont une activité médiée par le système MMR. Par conséquent, on peut supposer qu'en raison de l'inactivation constitutive du système MMR, les cellules de ces patients ne prennent pas en charge les lésions induites par ces agents. Le traitement serait donc au mieux inefficace, voire délétère puisqu'il pourrait induire une accumulation de mutations pouvant conduire à une récidive ou le développement de nouvelles tumeurs. Une étude rapporte le cas de deux patients CMMRD présentant une progression rapide de leur glioblastome sous traitement par le TMZ. Ces patients ont montré une survie très diminuée, de l'ordre de 4 mois, alors qu'elle est habituellement de 12 à 24 mois pour ce type tumoral (Ilencikova et al, 2011).

Pour tester cette hypothèse et tester des chimiothérapies alternatives, il serait intéressant d'effectuer des xénogreffes subcutanées ou orthotopiques de tumeurs humaines issues de patients CMMRD (échantillons de tumeurs non nécessaires pour le diagnostic clinique) dans des souris *nude*. Ces souris sont caractérisées par une immunodéficience due à une atrophie du thymus. Ainsi, grâce à un système immunitaire très faible, la souris *nude* peut recevoir des greffons tumoraux humains sans risque de rejet, ce qui en fait un modèle pré-clinique pertinent dans le développement de thérapies anticancéreuses plus efficaces, permettant notamment d'évaluer l'impact de chimiothérapies alternatives.

Caractérisation du spectre d'événements mutationnels dans les CRC et autres tumeurs primaires développées chez les patients CMMRD

La constitution de bases de données répertoriant les altérations génétiques est un outil précieux et indispensable à la recherche de corrélation génotype/phénotype ou l'étude des mécanismes qui sont à l'origine du processus oncogénique. Le but de cette étude est d'identifier, pour la première fois, les évènements mutationnels somatiques majeurs générés par un processus MSI dans les tumeurs issues de patients CMMRD, en comparaison avec ceux trouvés dans les tumeurs MSI sporadiques ou issues de patients atteints du syndrome de Lynch, afin de rechercher une signature moléculaire spécifique du syndrome CMMRD. A terme, cette signature est susceptible de présenter plusieurs intérêts cliniques, tels que mieux orienter le choix de la stratégie thérapeutique à proposer aux patients CMMRD, mieux définir les indications de surveillance, et anticiper le risque de rechute ou décès après une chirurgie.

Conclusion générale

Dans mon travail de thèse, j'ai étudié l'induction d'un processus oncogénique MSI dans un modèle murin, afin de démontrer l'impact oncogénique de l'azathioprine, un immunosuppresseur fréquemment utilisé en clinique. Nos résultats constituent la première démonstration *in vivo* que l'azathioprine est capable d'induire un lymphome MSI, en l'absence de prédisposition génétique (souris de génotype sauvage). Il s'agit d'un élément à prendre en compte dans la balance bénéfice/risque, quant au choix de traiter des patients avec une thiopurine. Compte tenu du statut particulier de ces cancers MSI en termes de réponse à la chimiothérapie, nous recommandons un criblage systématique du statut MSI parmi les lymphomes et autres tumeurs susceptibles de survenir chez des patients ayant reçu de l'azathioprine.

Lorsque ces travaux de thèse ont débuté en 2011, 78 patients atteints du syndrome CMMRD avaient été décrits dans la littérature. Trois ans plus tard, on en dénombre 146 issus de 91 familles. Cette prédisposition majeure aux cancers reste très rare, cependant la détection s'est grandement améliorée, notamment dans le cadre du consortium Européen *Care for CMMRD* (C4CMMRD) dont les objectifs ont été d'établir des critères d'identification des sujets à risque, d'améliorer le diagnostic de ce syndrome, et de mettre en place des traitements appropriés. Dans le but d'améliorer le diagnostic de ce syndrome, nous avons développé une nouvelle approche *via* deux tests fonctionnels utilisant des lignées cellulaires lymphoblastoïdes, basés sur la détection des caractéristiques déjà rapportées dans le tissu tumoral, mais induit pour la première fois dans du tissu sain issu des patients CMMRD. Nous préconisons l'utilisation de cette approche, hautement sensible et spécifique, dans une stratégie diagnostique globale du syndrome CMMRD.

Annexe

Article 3

« Hsp110 T17, a next generation marker for the detection of microsatellite instability in colorectal cancer »

Olivier Buhard, Anaïs Lagrange, Mouna Souissi, Kristell Wanherdrick, Chrystelle Colas, Florence Coulet, Coralie Dorard, Laetitia Marisa, Nizar El-murr, **Sahra Bodo**, Martine Muleris, Magali Svrcek, Hélène Blanché, Howard Cann, Jérémie Lefevre, Yann Parc, Come Lepage, Caroline Chapusot, Anne-Marie Bouvier, Marie-Pierre Gaub, Gérard Milano, Janick Selves, Kerryn Garret, Nikolajs Zeps, Barry Iacopetta, Richie Soong, Richard Hamelin, Olivier Lascols, Jean-François Fléjou, Carmen Garrido, Ada Collura, Alex Duval

En préparation

HSP110 T17, un marqueur de nouvelle génération pour la détection de l'instabilité des microsatellites dans les cancers colorectaux

Introduction

Les critères et méthodes de détermination du statut MSI dans les cancers colorectaux (CRC) et autres types de tumeurs solides ont constamment évolué depuis que ce phénotype MSI a été décrit pour la première fois. Actuellement, le criblage des tumeurs est basé sur la recherche de délétions dans des longs marqueurs microsatellites non codants (mononucléotidiques ou dinucléotidiques). En 2006, notre groupe a proposé un panel de 5 marqueurs mononucléotidiques (pentaplex) qui ne nécessite pas l'analyse simultanée de l'ADN germinal de chaque patient. L'utilisation de ce panel, qui offre une grande sensibilité et spécificité, a été approuvée par le NCI (National Cancer Institute) (Buhard et al, 2006; Umar et al, 2004) (au moins deux marqueurs sur cinq doivent être instables (Goel et al, 2010)). Dans une précédente étude menée au laboratoire, nous avons rapporté que le microsatellite mononucléotidique T17, situé dans l'intron 8 de HSP110 (HT17), était très fréquemment délété dans les CCR de phénotype MSI (Dorard et al, 2011). A l'inverse des marqueurs de la pentaplex utilisés en routine qui n'ont pas de rôle fonctionnel connu, un raccourcissement de HT17 dans l'ADN tumoral a été corrélé avec une augmentation de la synthèse du variant de HSP110. L'expression de ce variant se fait au détriment de la forme sauvage et une perte d'expression de la protéine HSP110 sauvage due à une délétion somatique biallélique dans HT17 a été corrélée à une augmentation de la sensibilité des lignées cellulaires cancéreuses aux agents anticancéreux tels que l'oxaliplatine et le 5-FU.

Dans cette étude, nous avons évalué la robustesse de l'utilisation du marqueur HT17 pour la détection du phénotype MSI dans les CRC. En raison de son rôle fonctionnel, cette séquence microsatellite hautement conservée au cours de l'évolution, pourrait présenter moins de polymorphisme que l'actuel panel de marqueurs de référence. Nous avons analysé HT17 dans l'ADN germinal de 1 037 individus issus de 61 populations différentes à travers le monde. De plus, nous avons évalué la sensibilité et la spécificité de HT17 pour la détection de MSI dans

une série de 685 CRC dont le statut MSI avait été précédemment établi par la méthode de référence (pentaplex). En cas de discordance entre les 2 méthodes, le statut MSI a été évalué par l'expression des protéines MMR en immunohistochimie et la recherche de mutations microsatellites dans d'autres gènes cibles.

Résultats

HT17 est un marqueur quasi-monomorphe dans l'ADN germinal. L'analyse morphométrique des profils alléliques de HT17 qui consiste dans le calcul de deux ratios R1 et R2 (R1=T14/T16, R2=T15/T16, ratios entre les hauteurs des alléles), qui sont considérés comme anormaux s'ils excèdent respectivement 0,15 et 0,5. Les 366 ADN tumoraux classés comme microsatellites stables en utilisant le pentaplex, ont montré un profil HT17 normal excepté 14 cas qui ont été confirmés comme étant MMR-déficients par les autres approches complémentaire. Les 313 ADN tumoraux classés MSI en utilisant le pentaplex, ont montré un profil HT17 anormal excepté 4 cas qui ont été confirmés comme étant MMR-déficients. L'analyse de HT17 a permis de classifier correctement 6 cas douteux avec la pentaplex.

Conclusion

HT17 est un marqueur de nouvelle génération hautement sensible et spécifique, pour la détection d'un phénotype MSI dans les cancers colorectaux.

HSP110 T17, a next generation marker for the detection of microsatellite instability in colorectal cancer

Olivier Buhard[1,2], Anaïs Lagrange[1,2], Mouna Souissi[1,2], Kristell Wanherdrick[1,2], Chrystelle Colas[1,2], Florence Coulet[1,2], Coralie Dorard[1,2], Laetitia Marisa[3], Nizar El-Murr[1,2], Sahra Bodo[1,2], Martine Muleris[1,2], Magali Svrcek[1,2,4], Hélène Blanché[5], Howard Cann[5], Jérémie H Lefevre[1,2,6], Yann Parc[1,2,6], Come Lepage[7,8], Caroline Chapusot[7,8], Anne-Marie Bouvier[7,8], Marie-Pierre Gaub[9], Gérard Milano[10], Janick Selves[11], Kerryn Garret[12,13], Nikolajs Zeps[12,13], Barry Iacopetta[13], Richie Soong[14], Richard Hamelin[1,2], Olivier Lascols[2], Jean-François Fléjou[1,2,4], Carmen Garrido[8,15], Ada Collura[1,2,€], Alex Duval[1,2,€, £]

[1] INSERM, UMR_S 938, CDR Saint-Antoine, F-75012 Paris, France

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

[3] Programme "Cartes d'Identité des Tumeurs", Ligue Nationale Contre le Cancer, Paris, France

[4] AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Service d'Anatomie Pathologique, F-75012 Paris, France Plateforme de microdissection de l'Institut Fédératif de Recherche 65 et Tumorothèque des Hôpitaux Universitaires Paris- Est, Paris, France

[5] Fondation Jean Dausset, CEPH, France

[6] AP-HP, Service de Chirurgie Générale et Digestive, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France

[7] Burgundy Cancer Registry, INSERM U866, Burgundy University, Dijon University Hospital, BP 87900 21079 Dijon, France

[8] University of Burgundy, Esplanade Erasme, 21078 Dijon, France

[9] INSERM, U682, Développement et Physiopathologie de l'Intestin et du Pancréas, 67200 Strasbourg, France

[10] Laboratoire d'Oncopharmacologie, EA 3836, Centre Antoine Lacassagne, Nice, France

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

[12] Bendat Family Comprehensive Cancer Centre, St John of God HealthCare, Subiaco, 6008 Australia

[13] School of Surgery M507, University of Western Australia, 35 Stirling Hwy, Nedlands, 6009, Australia

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

[15] INSERM, UMRS 866, 21033 Dijon, France

€ Co-leadership

£ Address for correspondence: Alex Duval

Emails: alex.duval@inserm.fr

Conflict of interest: the authors have declared that no conflict of interest exists

ABSTRACT

Purpose : We reported somatic deletions of an intronic T17 DNA repeat (HT17) in mismatch repair (MMR) deficient colorectal cancers with microsatellite instability (MSI CRCs). In contrast to other DNA repeats that are routinely used to identify MSI in CRC and which have no known functional role, the HT17 repeat is relevant for correct splicing of the chaperone HSP110. Furthermore, HT17 deletion is a putative predictive marker in MSI colon tumors. Here we investigated whether HT17 might also be relevant for diagnosis of the MSI phenotype in CRC.

Patients and Methods : HT17 was analyzed in 1,037 germline control DNAs and in 685 primary CRCs that were previously analyzed using a standard reference panel (pentaplex) for the determination of MSI. The HT17 status was analyzed without taking into account previous pentaplex results. Discordant HT17/pentaplex cases were further examined to confirm their MMR-deficient status by evaluating MMR protein expression and additional microsatellite mutations.

Results : HT17 displayed no germline allelic variations outside a narrow, quasimonomorphic range. For the 366 tumor DNAs determined by pentaplex to show microsatellite stability, the HT17 profiles were normal for all cases except 14 that were subsequently confirmed to be MMR- deficient. The 313 MSI tumors by pentaplex all showed aberrant HT17 profiles with the exception of 4 cases that were subsequently confirmed as MMR-deficient. Analysis of HT17 allowed the correct classification of 6 samples that showed doubtful status using pentaplex.

Conclusion : We propose HT17 as a new and highly sensitive and specific reference marker for routine detection of the MSI phenotype in CRC.

INTRODUCTION

Approximately 10-15% of sporadic colorectal cancers (CRCs) show the microsatellite instability phenotype (MSI), characterized by widespread somatic alterations in the length of nucleotide repeat sequences (1) (2) (3). MSI is also found in the great majority of tumors from the Lynch cancer syndrome (HNPCC, hereditary non polyposis colorectal cancer) (for review, see (4)). This phenotype is a marker of an underlying mismatch repair (MMR) defect that fails to recognize errors introduced during the replication of DNA, especially at repetitive DNA sequences such as microsatellites. CRC with MSI have distinctive molecular and clinicopathological profiles and are often associated with favorable prognosis (4) (5) (6). Additionally, it is now established that the majority CRCs displaying MSI show bad response to 5-Fluorouracil based chemotherapy (7) (8) (9).

The methods and criteria to determine the MSI phenotype in CRC and other solid tumors have constantly evolved since this phenotype was initially described at the beginning of the 1990s. It is currently based on the screening of tumor DNA for somatic deletions in long, non-coding DNA markers that are either mononucleotide or dinucleotide repeats. These markers are somewhat polymorphic in the general population, although we and others have demonstrated that some mononucleotide markers show less variation compared to dinucleotide repeats (10). In an effort to standardize MSI analysis in CRC, a workshop at the National Cancer Institute (NCI) in 1998 recommended the use of a panel of 5 markers comprising of 2 mononucleotide repeats (BAT26 and BAT25) and 3 dinucleotide repeats (D2S123, D5S346 and D17S250) (11). Tumors with instability at two or more of these markers were defined as being MSI-H (high) due to underlying MMR deficiency. Tumors showing instability at one MSI-L (low) or none (MSS) of the repeats were defined as MMR- proficient. Due to the polymorphic nature of dinucleotide markers, our group proposed in 2006 a panel of 5 mononucleotide repeats (pentaplex) that obviated the need to simultaneously analyze the germline DNA from each CRC patient. The pentaplex panel was demonstrated to offer better specificity and sensitivity than the NCI panel of markers for the screening of MSI (12). This panel was subsequently approved by the NCI (13) and the minimum number of unstable markers required to define colon tumors as MSI was 2 out of 5 (14).

More recently, we showed that the T17 mononucleotide repeat located within intron 8 of HSP110 (HT17) was mutated at high frequency in MSI primary tumors (15). In contrast to deletions in markers from the NCI and pentaplex panels, shortening of the HT17 repeat in tumor DNA correlated with increased synthesis of a variant HSP110 isoform due to exon 9 skipping (HSP110DE9). The aberrant expression of HSP110DE9 was to the detriment of the common wild-type HSP110 protein. HSP110 is a conserved and abundant molecular chaperone whose expression is induced by a specific set of stress conditions. Loss of HSP110 expression due to bi-allelic somatic deletions in HT17 was shown to increase the sensitivity of cancer cell lines to anticancer agents such as oxaliplatin and 5-FU. In line with these results, we showed that large HT17 deletions (≥ 5 bp) observed in about 25% of all MSI CRC patients were predictive of good response to 5-FU based chemotherapy.

In the present work, we investigated whether HT17 might be useful for the diagnosis of MSI in CRC patients. We hypothesized that because this functional DNA repeat has been highly conserved throughout evolution, it should therefore be less polymorphic than the currently used microsatellite markers for the detection of MSI in tumor DNA. We conducted an extensive genotype analysis of the HT17 microsatellite in germline DNA from 1,037 individuals encompassing 61 different populations worldwide. In addition, we evaluated the sensitivity and specificity of HT17 for the detection of MSI in a large series of 685 colorectal tumor samples whose MSI status had previously been analyzed using the standard pentaplex PCR method.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement, patients and DNA samples. This study was approved by the institutional review board/ethics committee of the participating centers. Clinical and pathological data were extracted from the medical records and centrally reviewed for the purpose of this study. The Human Genome Diversity panel is a collection of immortalized lymphoblastoid cell lines (LCL) developed by the Human Genome Diversity Project/Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (HGDP/CEPH), as already reported (12). All DNAs were extracted using the QIAamp DNA Tissue Kit (Qiagen) from fresh or paraffin-embedded tumor/LCL samples. Both MSI and MSS tumors were selected from a larger series of primary colorectal tumors obtained from

patients undergoing surgery at one of the centers involved in the study (Hôpital Saint-Antoine, Paris, France; CHU de Dijon, Dijon, France; CHU de Toulouse Purpan, Toulouse, France; Centre Antoine Lacassagne, Nice, France; St John of God Pathology, Subiaco, Australia; National University Hospital, Singapore). The study was conducted according to the recommendations of the institutional authorities.

Mutation analysis of HT17 and pentaplex markers. All markers were analyzed on an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's instructions. MSI determination was carried out using pentaplex PCR as described earlier (12). Samples showing at least 2 unstable pentaplex markers were classified as MSI, while samples with 0 or 1 unstable markers were considered as MSS. Samples with incomplete pentaplex profiles were considered as doubtful (Supplementary Table S1). Determination of HT17 status was carried out independently and without knowledge of results from the pentaplex genotyping.

Determination of the HT17 status of samples. Gene Mapper software was used to analyze HT17 traces, applying an AFLP (Automated Fragment Length Polymorphism) standard method that was parameterized for the automatic annotation of all peaks detected. HT17 traces were considered as acceptable when amplitudes of the major peaks were between 100 and 6,000 fluorescence units. Traces presenting with at least one saturated peak were excluded from the analysis. The HT17 status of samples was determined in both the HGDP control panel (training set) and in tumor DNAs, regardless of their microsatellite status from the pentaplex panel (test set). Additionally, we also calculated height ratios between peaks, especially between T14 and T16 (R1) and between T15 and T16 (R2) (see Supplementary Materials to download the free software we developed for calculating R1 and R2 ratios from AFLPs). Maximum threshold values for R1 and R2 were evaluated on the training set of samples and then analyzed in the test set.

Mutation analysis of coding microsatellite sequences contained in target genes for MSI. A total of 15 genes containing a mononucleotide repeat sequence in the coding region (ATR, BAX, BLM, CDX2, GRB14, GRK4, MBD4, MSH3, MSH6, RAD50, RECQL, RIZ, SLC35F5, TFDP2, and TGFBR2) were further analyzed in tumor samples that displayed discordant pentaplex/HT17

profiles in order to confirm their MSI status. These candidate genes were previously reported as targets for MSI-driven mutation in MMR-deficient colon tumors (4).

Immunohistochemical analysis of MMR protein expression. The expression of MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 was assessed as described (16). Briefly, four-micrometer tissue sections from tumor samples were stained with antibody to MLH1 (clone G168-728, PharMingen, San Diego, California, USA 1:70 dilution), MSH2 (clone FE11, Calbiochem, Cambridge, Massachusetts, USA, 1:100 dilution), MSH6 (clone 44, Becton Dickinson, Lexington, North Carolina, USA, 1:100 dilution) and PMS2 (clone A16-4, BD PharMingen, Le Pont de Claix, France, 1:150 dilution).

RESULTS

Multiethnic Germline DNA Profiling of the HT17 Microsatellite. HT17 genotyping was performed in 1,037 samples from the HGDP/CEPH diversity panel representing 61 worldwide populations from 29 geographic regions (Table 1). Overall, the HT17 DNA repeat was remarkably monomorphic, with the size of normal alleles ranging from 145 bp (T16) to 147 bp (T18). The quasimonomorphic variation range (QMVR) was therefore 3 bp. Only 3 individuals (3/1,037, 0.3%) displayed T18 alleles (147 bp), with one each from New Guinea, China and Nigeria. For all remaining individuals, HT17 allelic lengths were either T16 (145 bp) or T17 (146 bp) (Table 1 and Supplementary Figure S1). Overall, 3 canonic profiles corresponding to the 3 genotypes observed in the worldwide population were observed: T16/T16 (135/1,034; 13%), T16/T17 (304/1,034; 29.4%), and T17/T17 (595/1,034; 57.6%) (Fig. 1A). The 3 individuals displaying the T17/T18 genotype are not represented. The extent of stuttering by Taq polymerase observed for HT17 (2 bp) was only half that observed for the longer MSI markers from the pentaplex panel (4 bp, Fig. 1B). Moreover, the QMVR for each marker from the pentaplex panel was much larger than for HT17 (Table 2 and Fig. 1C). Additionally, all 5 pentaplex markers displayed allelic variants outside the QMVR, whereas no amplification products were observed outside the narrow QMVR for HT17 in the same worldwide populations (Table 2 and Fig. 1D). The data analysis pertains to all samples and thus concerns 2,074 alleles. Table 1 indicates the distribution of HT17 genotypes in the worldwide population. T16/T16, T16/T17, and T17/T17 genotypes were not uniformly distributed according to a

north-south gradient of the T16 allele (see also Supplementary Figure S1). Table 2 summarizes the percentage of each allelic size variant within or outside the QMVR for HT17 and for each of the 5 pentaplex markers in the complete worldwide series.

Sensitivity and Specificity of the HT17 Marker for the Detection of Microsatellite Instability in Colon Tumors. In the complete worldwide series, 3 distinct traces were observed and are representative of individuals with the T16/T16, T16/T17 or T17/T17 genotype (Fig. 1A). The height ratios between the T14 and T15 stutter peaks and the T16 peak never exceeded 0.15 and 0.5, respectively, regardless of the HT17 genotype (R1=T14/T16, R2=T15/T16; Supplementary Fig. 2A). In the present series of 685 tumors (666 CRCs, 19 adenomas), the HT17 status was analyzed independently and without taking into account previous results from pentaplex genotyping. No aberrant HT17 profiles were detected in 352 of the 366 tumors that displayed unambiguous MSS status with the pentaplex panel (i.e. 0/5 or 1/5 unstable markers). Amongst the remaining 14 cases, 9 tumor samples displayed aberrant HT17 alleles that fell outside the QMVR (Fig. 2B, Supplementary Figure S2A and Table 3), while 5 tumors showed no aberrant peaks but abnormal R1 and/or R2 ratios (see above; Fig.2C, Supplementary Figure S2A and Table 3). These 14 tumors were all confirmed to be MMR-deficient by immunohistochemistry (IHC) (Table 3 and data not shown).

With the exception of 4 cases, all 313 tumors classified as MSI with the pentaplex (at least 2 unstable DNA markers) showed aberrant HT17 profiles. Aberrant peaks outside the QMVR and measuring up to 7 base pairs were detected in 307 cases, while 2 cases displayed aberrant R1 and R2 ratios (MSI (R) cases, Supplementary Table S1). The 4 MSI samples for which an aberrant HT17 profile was not detected showed low to very low tumor DNA content (Supplementary Figure S2B).

Six tumor samples in this series displayed "doubtful" MSI profiles with the pentaplex panel, as defined by the detection of one unstable marker outside the QMVR and at least one other marker that was not informative due to PCR failure (Table 3). Amongst these, aberrant deletions in HT17 were detected in 4 cases and MMR deficiency was confirmed by IHC in the one case with available tissue (Table 3). Nevertheless, all 4 cases were confirmed as having MSI since they displayed frameshift alteration(s) in at least one coding DNA repeat contained in

relevant target genes for MSI (Table 3). In the remaining 2 samples, neither aberrant HT17 allelic profile nor frameshift target gene mutations were detected and hence it was concluded they were probably MSS (Table 3).

In summary, HT17 was a highly sensitive and specific marker for the detection of MSI in CRC. The comparative analysis concerning sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values for the HT17 and each pentaplex marker is shown in Table 4 and Supplementary Table S2.

DISCUSSION

The screening of CRC for MSI status is recommended for all newly diagnosed colon tumors and in many institutes this has become routine for CRC patients diagnosed under the age of 60 years. The pentaplex method is one of the most widely used MSI screening techniques in the clinic and allows the detection of MSI without the requirement for matching normal DNA. Nevertheless, pentaplex markers sometimes display germline allelic variants outside QMVRs, thus mimicking MSI (false positive cases). Moreover, a small proportion of the somatic mutations that occur in these markers do not lead to a diagnosis of MSI since they cause only short deletions or insertions that remain within the QMVR (false negative cases) (12) (14). In contrast, HT17 was found here to be highly monomorphic, showing a narrower QMVR than all 5 pentaplex markers and displaying only 2 alleles in 99.7% of individuals from the same HGDP panel. Since no allelic variants were detected outside of the narrow polymorphic zone of HT17, all signals found outside the QMVR in tumor DNAs were considered to be aberrant and due to MSI. From a total of 366 tumors initially diagnosed as MSS using the standard pentaplex PCR method, we were able to diagnose an additional 14 tumors as being MSI using HT17. These were all subsequently confirmed as MMR deficient by IHC. Furthermore, an aberrant HT17 profile was detected in 309 of 313 tumors (98.7%) classified as MSI with the pentaplex approach. Finally, HT17 allowed us to clarify the status of 6 tumor samples (4 MSI, 2 MSS) that showed ambiguous MSI status using the pentaplex panel. We thus conclude that HT17, even when used alone and without matching normal DNA, is more sensitive and specific than the pentaplex method to detect the MSI phenotype in CRC.

HT17 is highly conserved throughout evolution and hence we speculate this lack of variation may be due to its functional role in HSP110 splicing (15). The quasi monomorphism demonstrated here for HT17 is likely to account for the very high sensitivity and specificity of this marker for the detection of MSI in CRC. In contrast to the pentaplex markers, deletions in tumor DNA of even 1 bp in HT17 generate aberrant peaks outside the QMVR that cannot be interpreted as rare allelic variants. Furthermore, the stuttering of Taq polymerase at the HT17 DNA repeat was significantly less than for the pentaplex markers, probably due to the difference in repeat size (16/17 nucleotides vs 21-27 nucleotides). This allowed us to further increase the sensitivity of HT17 for MSI detection by developing a quantitative method that evaluates the ratio between peaks for the QMVR and stutter bands (R method). A recent publication based on the analysis of dinucleotide repeats described a similar quantitative approach to detect the MSI phenotype in the germline DNA of patients with constitutive MMR-deficiency (17). It is important to note the R method must only be applied when no aberrant peaks are present outside the QMVR, otherwise it may lead to false negative results (see Supplementary Figure S3 for further details). For several reasons, this approach cannot be used to detect MSI with DNA repeats from the pentaplex panel.

In conclusion, the exceptional sensitivity and specificity of HT17 make it an ideal DNA marker for the detection of MSI in CRC. It can be used alone and without the requirement for matching germline DNA. In contrast to the pentaplex markers, reading of the HT17 profile is relatively straightforward and easy to interpret. We have also developed open access software to assist future users with the R method (see Supplementary Materials). HT17 was recently proposed by our group as a putative predictive marker for the response of MSI colon cancer patients to 5-FU based therapies (15). Hence there is a strong rationale to include this next generation DNA marker not only for future screening of Lynch syndrome but also for the prediction of response of CRC to adjuvant therapies.

REFERENCES

1. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, et al. 1993. Science 260: 812-6

2. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, et al. 1993. Cell 75: 1027-38

3. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. 1993. Nature 363: 558-61

4. Duval A, Hamelin R. 2002. Cancer Res 62: 2447-54

5. Vasen HF, Moslein G, Alonso A, Bernstein I, Bertario L, et al. 2007. J Med Genet 44: 353-62

6. Gruber SB. 2006. Gastroenterology 130: 577-87

7. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, et al. 2003. N Engl J Med 349: 247-57

8. Carethers JM, Smith EJ, Behling CA, Nguyen L, Tajima A, et al. 2004. Gastroenterology 126: 394-401

9. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, Thibodeau SN, Labianca R, et al. 2010. J Clin Oncol 28: 3219-26

10. Suraweera N, Duval A, Reperant M, Vaury C, Furlan D, et al. 2002. Gastroenterology 123: 1804-11

11. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, et al. 1998. Cancer Res 58: 5248-57

12. Buhard O, Cattaneo F, Wong YF, Yim SF, Friedman E, et al. 2006. J Clin Oncol 24: 241- 51

13. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, et al. 2004. J Natl Cancer Inst 96: 261-8

14. Goel A, Nagasaka T, Hamelin R, Boland CR. 2010. PLoS ONE 5: e9393

15. Dorard C, de Thonel A, Collura A, Marisa L, Svrcek M, et al. 2011. Nat Med 17: 1283-89

16. Svrcek M, El-Bchiri J, Chalastanis A, Capel E, Dumont S, et al. 2007. J Clin Oncol 25: 4231-8

17. Ingham D, Diggle CP, Berry I, Bristow CA, Hayward BE, et al. 2013. Hum Mutat 34: 847-52

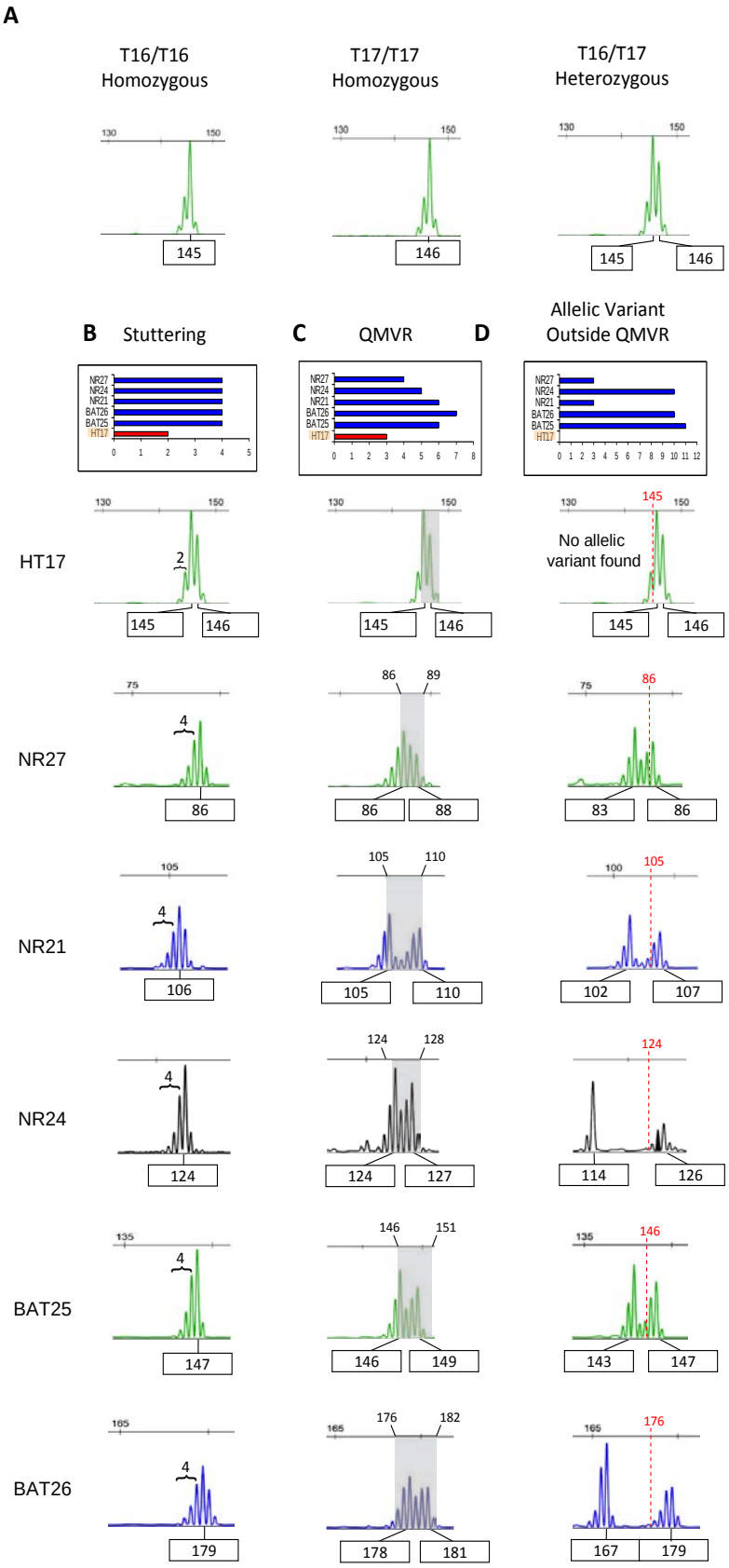


Figure 1. Ratio analysis of traces for HT17 and for the 5 pentaplex markers. A: Canonical traces for the three main HT17 genotypes encountered in the control population are shown, with the respective amplicon sizes indicated in base pairs. **B**: Comparative representation of stuttering artefacts for the six markers, including stutters for peaks shorter than the shortest allele annotated in each trace. **C**: Comparative representation of the QMVRs for the 6 markers. The grey band covers all possible amplicon sizes for each quasi- monomorphic marker. **D**: Sample traces of allelic variants outside the QMVR for the 6 markers. The red-dotted lines indicate the minimum size of the QMVR. In B, C and D, the blue bars are for the pentaplex markers and the red bar for HT17. The values shown for the bar graphs (B, C, D) indicate the size in base pairs (stuttering, QMVR) or the shortest size (allelic variant outside QMVR).

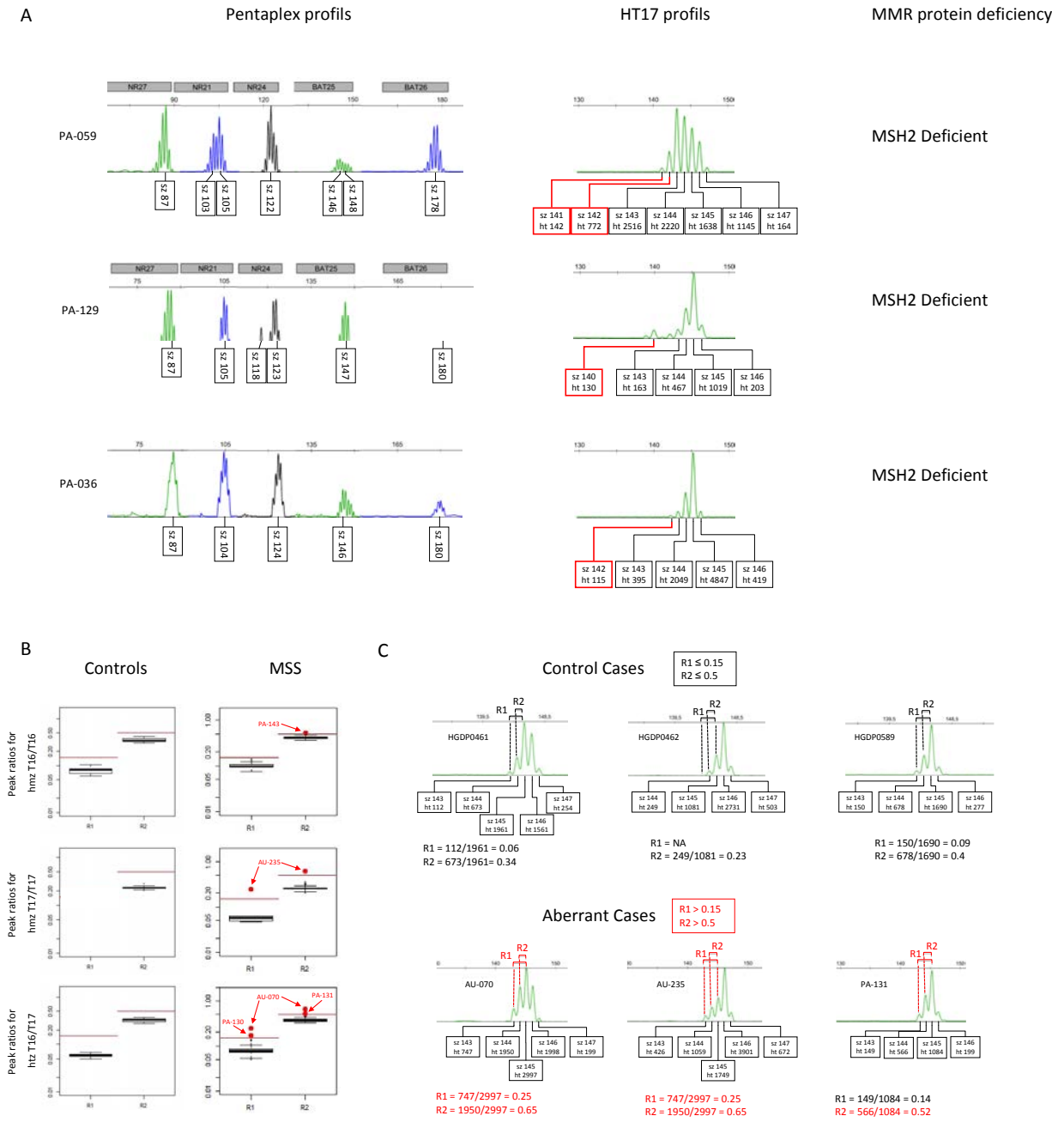


Figure 2. Analysis of discordant results between the pentaplex panel (false negatives) and HT17. A: Traces for the pentaplex markers and HT17 are shown for three representative cases. The loss of MMR protein expression deduced from IHC is shown alongside. **B**: Distribution of R1 and R2 ratios for controls and the MSS series, plotted separately according to the 3 main genotypes for HT17. The red lines indicate thresholds for the determination of instability (0.15 for R1, 0.5 for R2). The red dots represent the position of 5 false negative cases when MSI was evaluated with the pentaplex panel. **C**: Traces of 3 aberrant cases for the R1 and/or R2 ratios, plotted below traces of 3 controls of the same genotype given for comparison. The R1/R2 values shown in red exceed the respective thresholds.

Geographic origin	Region	Nb of cases	T16/T16	T17/T17	T16/T17	T17/T18
Algeria (Mzab)	North Africa	27	8 (29.6)	7 (25.9)	12 (44.4)	0 (0)
Bougainville	Oceania	12	0 (0)	10 (83.3)	2 (16.7)	0 (0)
Brazil	America	22	0 (0)	21 (95.5)	1 (4.5)	0 (0)
Cambodia	Asia	10	0 (0)	9 (90)	1 (10)	0 (0)
Central African Republic	Subsaharan Africa	26	0 (0)	24 (92.3)	2 (7.7)	0 (0)
Venezuela	America	4	1 (25)	2 (50)	1 (25)	0 (0)
China	Asia	172	1 (0.6)	162 (94.2)	8 (4.7)	1 (0.6)
Colombia	America	7	0 (0)	4 (57.1)	3 (42.9)	0 (0)
Democratic Republic of Congo	Subsaharan Africa	13	0 (0)	11 (84.6)	2 (15.4)	0 (0)
France	Europe	68	18 (26.5)	16 (23.5)	34 (50)	0 (0)
Israel (Carmel)	Middle East	36	4 (11.1)	9 (25)	23 (63.9)	0 (0)
Israel (Central)	Middle East	38	5 (13.2)	15 (39.5)	18 (47.4)	0 (0)
Israel (Negev)	Middle East	41	6 (14.6)	20 (48.8)	15 (36.6)	0 (0)
Italy	Europe	33	10 (30.3)	7 (21.2)	16 (48.5)	0 (0)
Italy (Bergamo)	Europe	12	5 (41.7)	1 (8.3)	6 (50)	0 (0)
Japan	Asia	24	0 (0)	24 (100)	0 (0)	0 (0)
Kenya	Subsaharan Africa	11	0 (0)	9 (81.8)	2 (18.2)	0 (0)
Mexico	America	31	0 (0)	28 (90.3)	3 (9.7)	0 (0)
Namibia	Subsaharan Africa	6	0 (0)	6 (100)	0 (0)	0 (0)
New Guinea	Oceania	16	0 (0)	15 (93.8)	0 (0)	1 (6.3)
Nigeria	Subsaharan Africa	22	0 (0)	12 (54.5)	9 (40.9)	1 (4.5)
North America	America	129	39 (30.2)	32 (24.8)	58 (45)	0 (0)
Orkney Islands	Europe	11	2 (18.2)	3 (27.3)	6 (54.5)	0 (0)
Pakistan	Asia	175	19 (10.9)	100 (57.1)	56 (32)	0 (0)
Russia	Europe	23	7 (30.4)	7 (30.4)	9 (39.1)	0 (0)
Russia Caucasus	Europe	17	3 (17.6)	6 (35.3)	8 (47.1)	0 (0)
Senegal	Subsaharan Africa	22	4 (18.2)	12 (54.5)	6 (27.3)	0 (0)
Siberia	Asia	21	3 (14.3)	18 (85.7)	0 (0)	0 (0)
South Africa	Subsaharan Africa	8	0 (0)	5 (62.5)	3 (37.5)	0 (0)

Table 1. Distribution of the 4 genotypes identified for HT17 in 1,037 individuals from the worldwide training set. The absolute and relative number of cases is shown for each geographic origin.

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

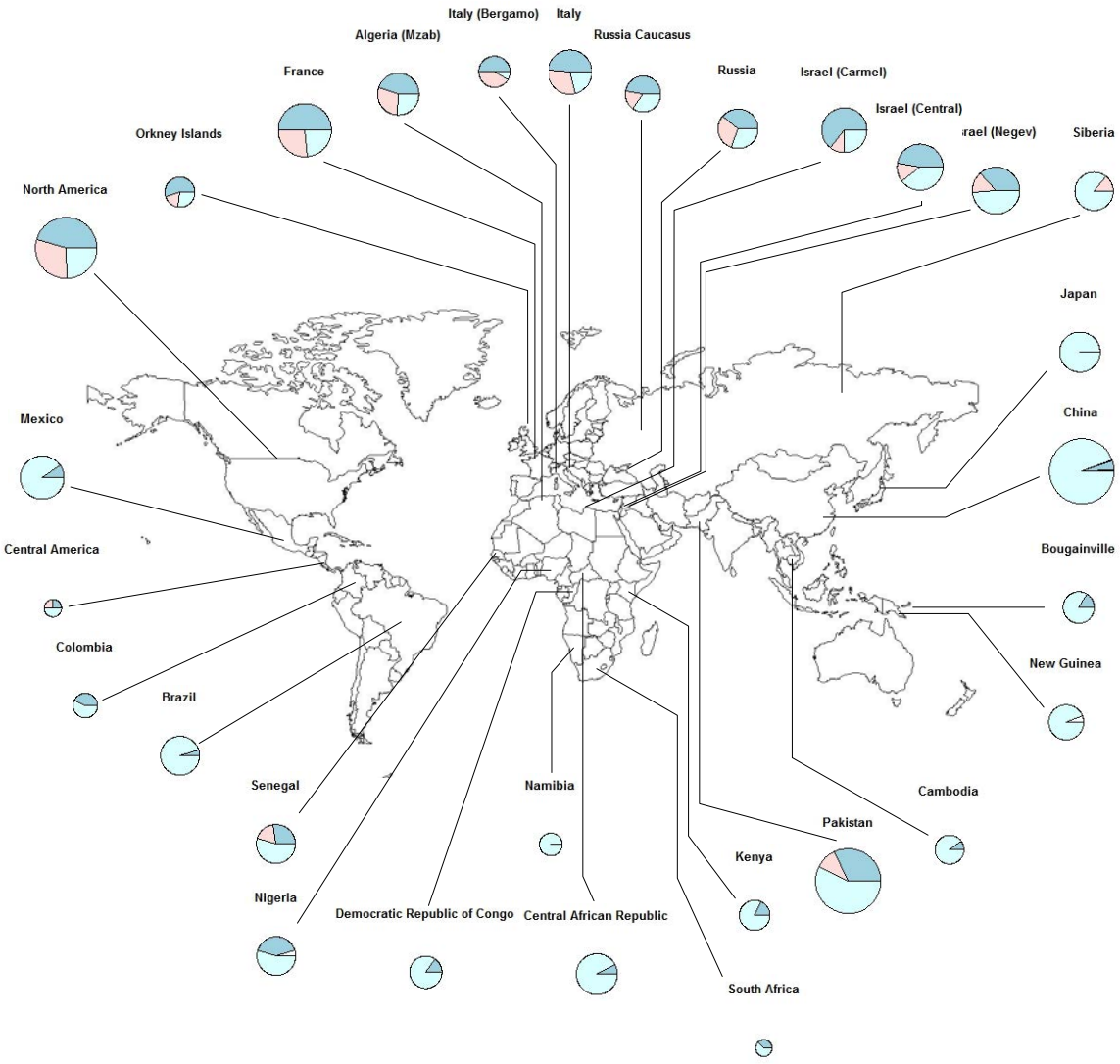
Table 2. Allelic sizes for each marker. Allelic sizes for HT17 were measured from the entire worldwide germline DNA series. Allelic sizes for the pentaplex markers were reported in our previous study on the same HGD panel. For each marker, alleles in the quasi-monomorphic variation ranges (QMVR) are shown in the dark gray boxes, while polymorphic alleles are in the light gray boxes.

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

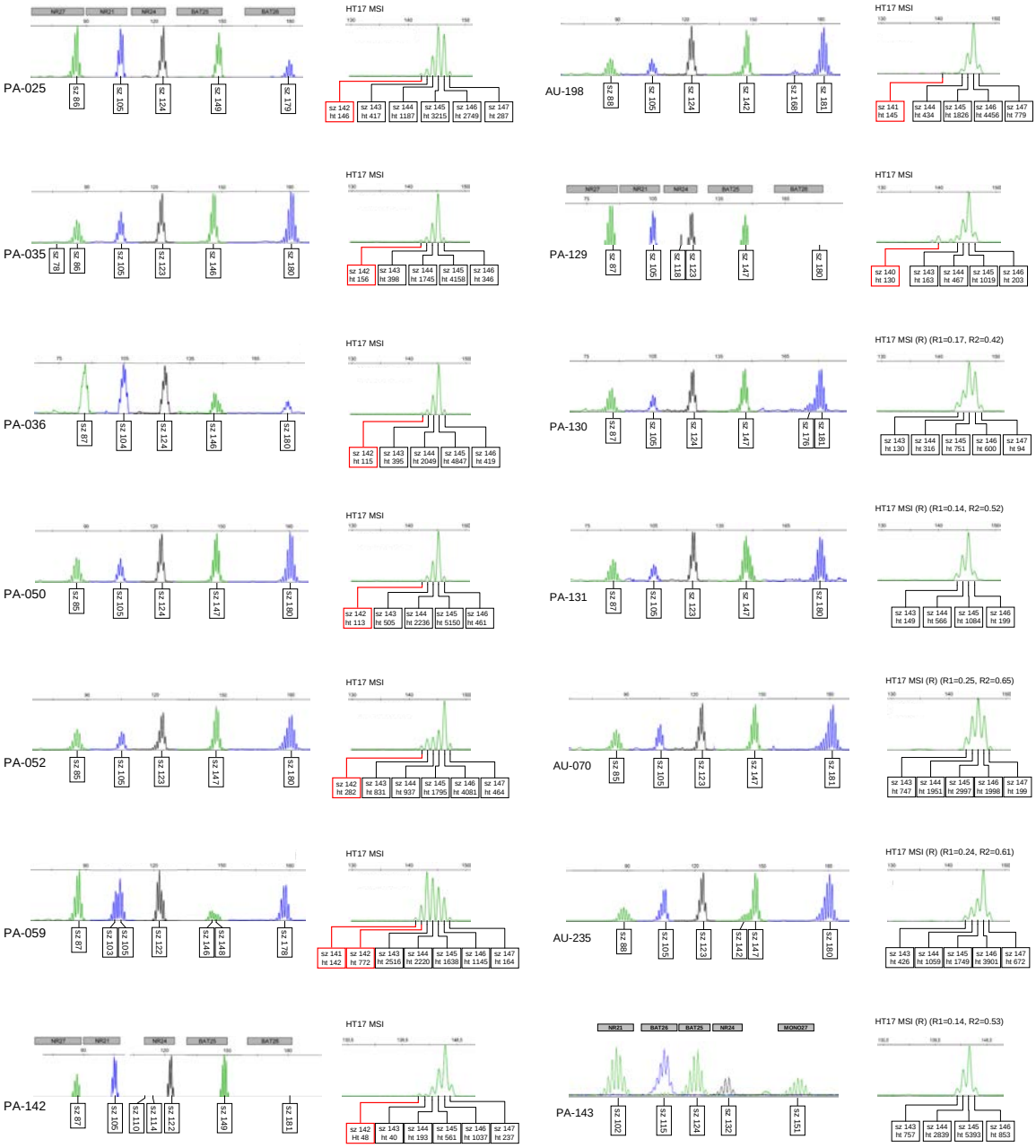
Table 3. Summary of discordant cases between the pentaplex markers and HT17. Results are shown for four false negative cases with HT17, 6 inconclusive cases annotated as "doubtful" with pentaplex markers, and 14 false negative cases with pentaplex markers. The two final rows report the R1 and R2 values for the 2 concordant cases presenting with an aberrant profile for HT17. The two final columns show the validation parameters for MSI diagnosis: occurrence of mutations in coding microsatellites (No. of mutated target genes) and loss of expression of MMR proteins (MMR status by IHC).

Markers	Sensitivity	Specificity	Positive Predictive Value	Negative Predictive Value
NR27	96.5	95.3	86.3	98.9
NR21	89.8	95.3	86.6	96.5
NR24	84.8	99.9	99.5	96.7
BAT25	89.7	96.2	84.1	97.7
BAT26	91.5	97.3	91.7	97.2
HT17	98.7	100.0	100.0	99.6

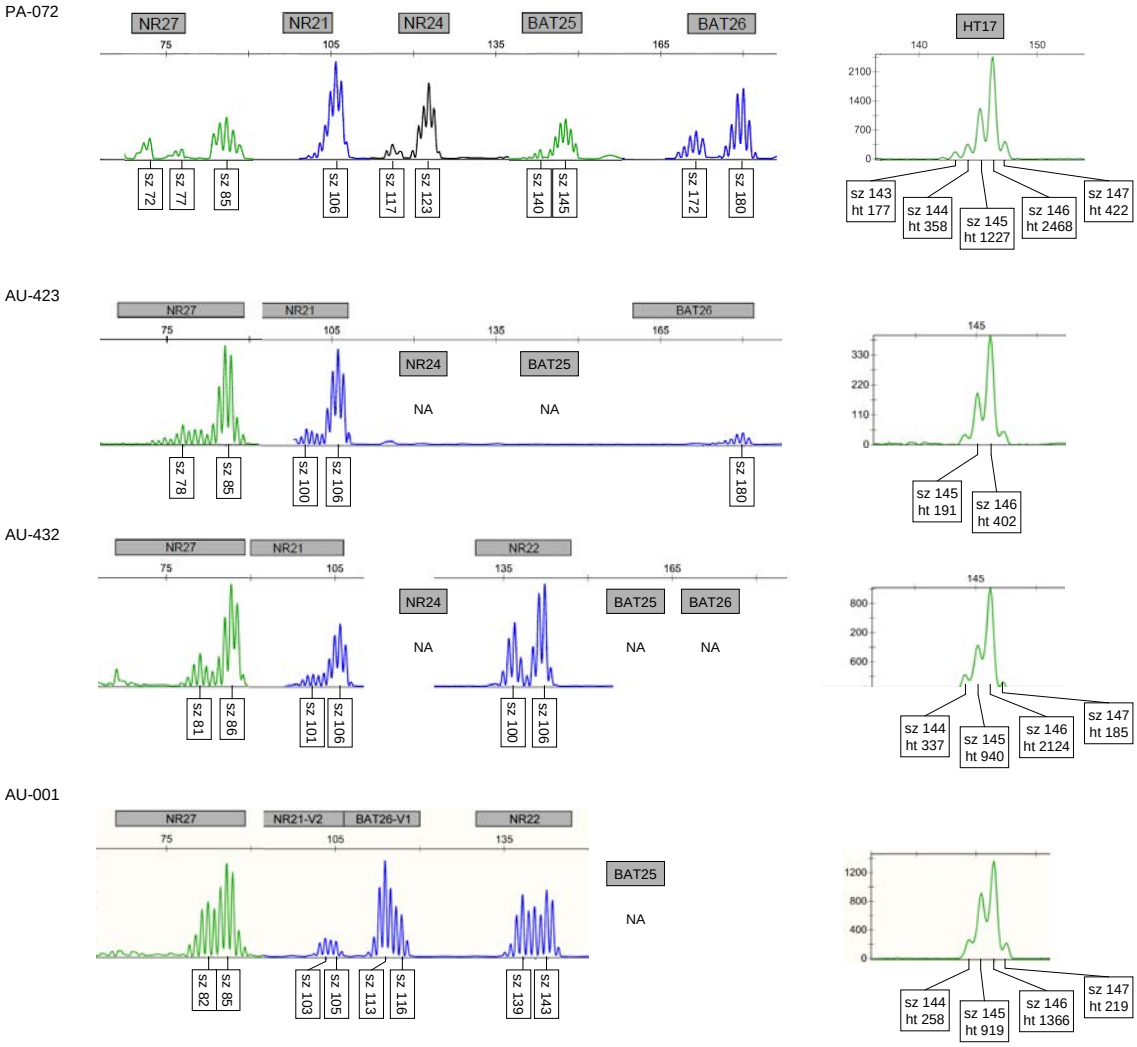
Table 4. Sensitivity, specificity and positive and negative predictive values for the determination of MSI by each of the 5 pentaplex markers and by HT17.



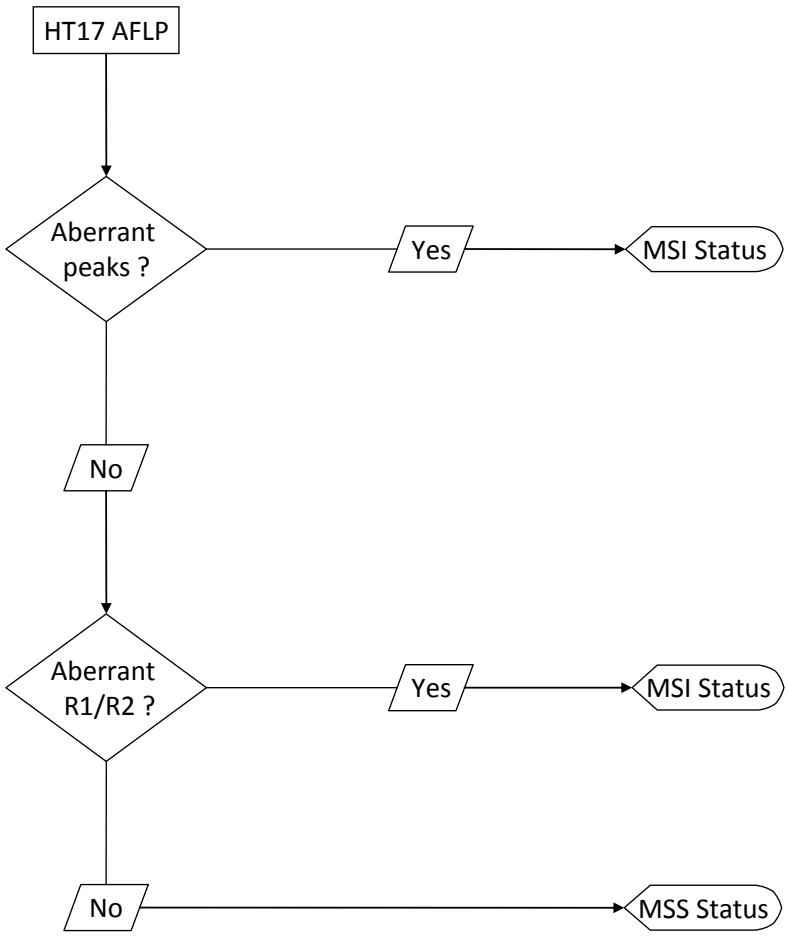
Supplementary Figure S1. Worldwide distribution of the 3 main HT17 genotypes according to the geographic origin from the whole training set. The genotypes are annotated as follow: green is for the T17 homozygous, blue for the T16/T17 heterozygous and orange for the T16 homozygous. The sizes of the pie charts are proportional to the number of individuals for each considered population.



Supplementary Figure S2A. Traces details of the pentaplex markers and HT17 for the discordant cases. **(A)** traces for the 14 false negative cases when MSI status is determined with the pentaplex.



Supplementary Figure S2B. (B) traces for the 4 false negative cases when MSI status is determined using HT17. R1 and R2 values are indicated for HT17 traces presenting with aberrant profiles (i.e. higher than their respective threshold). For both figures, the sz annotation indicates the size of the amplicon in base pairs, and the ht annotation reports the height of the peak measured as an arbitrary fluorescent unit (AFU).



Supplementary Figure S3. Operational diagram for MSI determination using HT17. Importantly, the chart reports the order by which the analysis of the HT17 must be done to assign the MSI status, that is to investigate the presence of a peak less than 143 bp before eventually taking into account the values of the R1 and R2 ratios.

Supplementary Table S1.

Samples Series	Samples Name	Samples Type	Instable pentaplex markers / Informative markers	MSI Status (pentaplex)	HT17 Genotype	MSI Status (HT17)
PARIS_SA	PA-001	CRC	2 / 5	MSI	141 / 142 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-002	CRC	4 / 5	MSI	141 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-003	CRC	5 / 5	MSI	142 / 144	MSI
PARIS_SA	PA-004	CRC	5 / 5	MSI	141 / 142 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-005	CRC	5 / 5	MSI	141 / 142 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-006	CRC	5 / 5	MSI	140 / 144	MSI
PARIS_SA	PA-007	CRC	5 / 5	MSI	141 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-008	CRC	5 / 5	MSI	142 / 143 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-009	CRC	4 / 5	MSI	142 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-010	CRC	5 / 5	MSI	141 / 145 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-011	CRC	5 / 5	MSI	143 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-013	CRC	5 / 5	MSI	141 / 144	MSI
PARIS_SA	PA-014	CRC	5 / 5	MSI	140 / 142 / 144	MSI
PARIS_SA	PA-015	CRC	3 / 5	MSI	140 / 143 / 144	MSI
PARIS_SA	PA-016	CRC	5 / 5	MSI	140 / 144	MSI
PARIS_SA	PA-024	CRC	5 / 5	MSI	141 / 142 / 145 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-026	CRC	5 / 5	MSI	141 / 144 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-029	CRC	5 / 5	MSI	140 / 143 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-030	CRC	5 / 5	MSI	138 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-031	CRC	5 / 5	MSI	141 / 144 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-033	CRC	4 / 5	MSI	140 / 142 / 144	MSI
PARIS_SA	PA-037	CRC	5 / 5	MSI	140 / 142 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-038	CRC	4 / 5	MSI	141 / 143 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-039	CRC	5 / 5	MSI	142 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-040	CRC	5 / 5	MSI	140 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-041	CRC	5 / 5	MSI	139 / 140 / 144 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-042	CRC	5 / 5	MSI	142 / 143 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-043	CRC	5 / 5	MSI	139 / 143 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-044	CRC	5 / 5	MSI	141 / 142 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-045	CRC	5 / 5	MSI	140 / 143 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-046	CRC	5 / 5	MSI	142 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-047	CRC	5 / 5	MSI	142 / 143 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-048	CRC	5 / 5	MSI	140 / 141 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-049	CRC	5 / 5	MSI	140 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-051	CRC	4 / 5	MSI	143 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-054	CRC	5 / 5	MSI	141 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-055	CRC	5 / 5	MSI	138 / 142 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-056	CRC	4 / 4	MSI	141 / 145 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-057	CRC	5 / 5	MSI	141 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-058	CRC	5 / 5	MSI	140 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-061	CRC	5 / 5	MSI	141 / 144	MSI
STRASBOURG	ST-020	CRC	5 / 5	MSI	141 / 145	MSI
STRASBOURG	ST-021	CRC	4 / 5	MSI	144 / 146	MSI
STRASBOURG	ST-022	CRC	5 / 5	MSI	144 / 145	MSI

STRASBOURG	ST-023	CRC	5 / 5	MSI	144 / 146	MSI
STRASBOURG	ST-024	CRC	5 / 5	MSI	143	MSI
STRASBOURG	ST-025	CRC	5 / 5	MSI	142 / 144	MSI
NICE	NI-001	CRC	5 / 5	MSI	141 / 146	MSI
NICE	NI-002	CRC	5 / 5	MSI	143 / 146	MSI
NICE	NI-003	CRC	5 / 5	MSI	143 / 145	MSI
NICE	NI-004	CRC	5 / 5	MSI	141 / 145	MSI
NICE	NI-005	CRC	5 / 5	MSI	141 / 146	MSI
NICE	NI-006	CRC	5 / 5	MSI	142 / 145	MSI
NICE	NI-007	CRC	4 / 5	MSI	141 / 144	MSI
NICE	NI-008	CRC	4 / 5	MSI	142 / 144	MSI
NICE	NI-009	CRC	5 / 5	MSI	140 / 143 / 146	MSI
NICE	NI-010	CRC	5 / 5	MSI	142 / 145	MSI
NICE	NI-011	CRC	4 / 5	MSI	143 / 145	MSI
NICE	NI-012	CRC	5 / 5	MSI	142 / 144	MSI
NICE	NI-013	CRC	5 / 5	MSI	140 / 143 / 146	MSI
NICE	NI-014	CRC	4 / 5	MSI	141 / 145	MSI
NICE	NI-015	CRC	5 / 5	MSI	140 / 146	MSI
NICE	NI-016	CRC	4 / 5	MSI	143 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-062	CRC	5 / 5	MSI	141 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-063	CRC	4 / 5	MSI	143 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-064	CRC	5 / 5	MSI	142 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-065	CRC	5 / 5	MSI	138 / 140 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-066	CRC	5 / 5	MSI	140 / 143 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-067	CRC	5 / 5	MSI	142 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-068	CRC	5 / 5	MSI	144 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-069	CRC	5 / 5	MSI	142 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-070	CRC	5 / 5	MSI	141 / 143 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-071	CRC	3 / 5	MSI	144	MSI
PARIS_SA	PA-073	CRC	5 / 5	MSI	140 / 143 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-074	CRC	4 / 5	MSI	142 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-075	CRC	5 / 5	MSI	140 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-076	CRC	5 / 5	MSI	141 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-077	CRC	4 / 4	MSI	140 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-078	CRC	4 / 4	MSI	140_2? / 144 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-079	CRC	4 / 4	MSI	142 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-080	CRC	4 / 4	MSI	141 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-081	CRC	5 / 5	MSI	143 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-082	CRC	5 / 5	MSI	140 / 142 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-083	CRC	5 / 5	MSI	143 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-084	CRC	4 / 5	MSI	143 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-085	CRC	5 / 5	MSI	144 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-086	CRC	5 / 5	MSI	140 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-087	CRC	4 / 4	MSI	143 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-088	CRC	5 / 5	MSI	142 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-089	CRC	4 / 4	MSI	141 / 144 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-090	CRC	5 / 5	MSI	140 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-091	CRC	5 / 5	MSI	141 / 145	MSI

PARIS_SA	PA-092	CRC	5 / 5	MSI	140 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-093	CRC	5 / 5	MSI	141 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-094	CRC	3 / 4	MSI	143 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-095	CRC	3 / 3	MSI	143 / 144	MSI
PARIS_SA	PA-096	CRC	4 / 5	MSI	140 / 142 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-097	CRC	4 / 5	MSI	141 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-098	CRC	5 / 5	MSI	141 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-099	CRC	5 / 5	MSI	143 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-100	CRC	5 / 5	MSI	140 / 142 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-101	CRC	4 / 5	MSI	141 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-102	CRC	5 / 5	MSI	141 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-103	CRC	5 / 5	MSI	142 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-104	CRC	5 / 5	MSI	140 / 144 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-105	CRC	5 / 5	MSI	141 / 143 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-106	CRC	5 / 5	MSI	141 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-107	CRC	5 / 5	MSI	140 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-108	CRC	5 / 5	MSI	142 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-109	CRC	3 / 5	MSI	142 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-110	CRC	5 / 5	MSI	143 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-111	CRC	4 / 5	MSI	142 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-112	CRC	5 / 5	MSI	143	MSI
PARIS_SA	PA-113	CRC	4 / 5	MSI	142 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-114	CRC	5 / 5	MSI	143 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-115	CRC	4 / 4	MSI	141 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-116	CRC	5 / 5	MSI	140 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-117	CRC	3 / 5	MSI	144	MSI
PARIS_SA	PA-118	CRC	5 / 5	MSI	140 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-119	CRC	5 / 5	MSI	142 / 144	MSI
PARIS_SA	PA-120	CRC	5 / 5	MSI	139 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-121	CRC	5 / 5	MSI	142 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-122	CRC	5 / 5	MSI	144 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-123	CRC	5 / 5	MSI	143 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-124	CRC	5 / 5	MSI	141 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-125	CRC	4 / 5	MSI	141 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-126	CRC	5 / 5	MSI	139 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-127	CRC	4 / 5	MSI	143 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-128	CRC	5 / 5	MSI	141 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-139	CRC	5 / 5	MSI	139 / 145 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-140	CRC	4 / 5	MSI	139 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-141	CRC	3 / 4	MSI	141 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-020	CRC	3 / 3	MSI	143 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-024	CRC	3 / 3	MSI	141 / 144 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-030	CRC	3 / 3	MSI	142 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-034	CRC	3 / 3	MSI	142 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-042	CRC	3 / 3	MSI	141 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-044	CRC	3 / 3	MSI	140 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-045	CRC	3 / 3	MSI	143 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-057	CRC	3 / 3	MSI	141 / 145	MSI

AUSTRALIA	AU-062	CRC	3 / 3	MSI	141 / 142 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-064	CRC	3 / 3	MSI	140 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-065	CRC	3 / 3	MSI	141 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-068	CRC	3 / 3	MSI	141 / 143 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-075	CRC	3 / 3	MSI	141 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-076	CRC	3 / 3	MSI	142 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-077	CRC	3 / 4	MSI	141 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-080	CRC	3 / 3	MSI	139 / 142 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-091	CRC	3 / 3	MSI	141 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-098	CRC	3 / 3	MSI	143 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-101	CRC	2 / 2	MSI	141 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-140	CRC	3 / 3	MSI	140 / 141 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-141	CRC	3 / 3	MSI	139 / 143 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-149	CRC	3 / 3	MSI	140 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-155	CRC	3 / 3	MSI	142 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-157	CRC	3 / 3	MSI	143 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-173	CRC	3 / 3	MSI	142 / 143 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-181	CRC	3 / 3	MSI	141 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-184	CRC	3 / 3	MSI	141 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-199	CRC	3 / 3	MSI	142 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-212	CRC	2 / 3	MSI	139 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-216	CRC	3 / 3	MSI	140 / 142 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-218	CRC	3 / 3	MSI	144 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-221	CRC	3 / 3	MSI	140 / 143 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-233	CRC	3 / 3	MSI	141 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-240	CRC	3 / 3	MSI	142 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-241	CRC	3 / 4	MSI	142 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-245	CRC	3 / 3	MSI	139 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-258	CRC	3 / 3	MSI	142 / 144	MSI
AUSTRALIA	AU-269	CRC	3 / 3	MSI	140 / 142 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-271	CRC	2 / 4	MSI	142 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-272	CRC	3 / 3	MSI	142 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-288	CRC	3 / 3	MSI	142 / 144 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-290	CRC	3 / 3	MSI	141 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-301	CRC	3 / 3	MSI	141 / 143 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-311	CRC	3 / 3	MSI	143 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-315	CRC	3 / 4	MSI	142 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-322	CRC	3 / 3	MSI	142 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-340	CRC	2 / 3	MSI	140 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-345	CRC	3 / 3	MSI	140 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-353	CRC	3 / 3	MSI	141 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-358	CRC	3 / 3	MSI	143 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-385	CRC	3 / 3	MSI	141 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-388	CRC	3 / 3	MSI	143 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-392	CRC	3 / 3	MSI	142 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-394	CRC	3 / 3	MSI	141 / 144 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-395	CRC	3 / 3	MSI	141 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-396	CRC	2 / 3	MSI	143 / 145	MSI

AUSTRALIA	AU-397	CRC	3 / 3	MSI	143 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-398	CRC	3 / 3	MSI	141 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-399	CRC	3 / 3	MSI	143 / 145 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-400	CRC	3 / 3	MSI	144	MSI
AUSTRALIA	AU-401	CRC	3 / 3	MSI	141 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-402	CRC	3 / 3	MSI	140 / 143 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-403	CRC	3 / 3	MSI	143? / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-404	CRC	3 / 3	MSI	142 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-405	CRC	3 / 3	MSI	141 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-406	CRC	3 / 3	MSI	141 / 143 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-407	CRC	3 / 3	MSI	143 / 144	MSI
AUSTRALIA	AU-002	CRC	3 / 3	MSI	139 / 141 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-003	CRC	3 / 3	MSI	144 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-004	CRC	2 / 3	MSI	142 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-005	CRC	2 / 3	MSI	142 / 143 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-006	CRC	4 / 4	MSI	144 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-007	CRC	3 / 3	MSI	142 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-408	CRC	3 / 5	MSI	143 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-409	CRC	5 / 5	MSI	143 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-410	CRC	4 / 4	MSI	143 / 144	MSI
AUSTRALIA	AU-411	CRC	2 / 2	MSI	144 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-412	CRC	4 / 5	MSI	142 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-414	CRC	5 / 5	MSI	141 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-415	CRC	4 / 4	MSI	142 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-416	CRC	2 / 4	MSI	141 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-417	CRC	3 / 3	MSI	142 / 143 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-418	CRC	3 / 3	MSI	141 / 144 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-419	CRC	3 / 3	MSI	141 / 144 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-420	CRC	3 / 3	MSI	139 / 141 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-421	CRC	3 / 3	MSI	144 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-422	CRC	3 / 3	MSI	141 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-424	CRC	2 / 2	MSI	144 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-425	CRC	3 / 3	MSI	142 / 144 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-427	CRC	3 / 3	MSI	142 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-428	CRC	3 / 3	MSI	142 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-429	CRC	3 / 3	MSI	141 / 144 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-430	CRC	3 / 3	MSI	141 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-431	CRC	2 / 3	MSI	144 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-433	CRC	2 / 3	MSI	141 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-434	CRC	3 / 3	MSI	141 / 143 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-435	CRC	3 / 3	MSI	141 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-436	CRC	3 / 3	MSI	141 / 143 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-437	CRC	3 / 3	MSI	141 / 144 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-438	CRC	3 / 3	MSI	141 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-439	CRC	2 / 2	MSI	141 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-442	CRC	3 / 3	MSI	141 / 144 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-443	CRC	3 / 3	MSI	143 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-444	CRC	3 / 3	MSI	144 / 146	MSI

AUSTRALIA	AU-445	CRC	2 / 3	MSI	144 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-446	CRC	3 / 3	MSI	144 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-447	CRC	2 / 2	MSI	142 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-448	CRC	3 / 3	MSI	141 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-449	CRC	3 / 3	MSI	143 / 144 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-450	CRC	2 / 3	MSI	138 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-451	CRC	3 / 3	MSI	141 / 144 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-453	CRC	3 / 4	MSI	143 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-454	CRC	4 / 4	MSI	141 / 144 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-455	CRC	4 / 5	MSI	141 / 143 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-456	CRC	4 / 4	MSI	142 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-457	CRC	5 / 5	MSI	142 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-458	CRC	5 / 5	MSI	142 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-459	CRC	3 / 3	MSI	143 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-460	CRC	3 / 4	MSI	140 / 142 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-461	CRC	3 / 3	MSI	142 / 144 / 146	MSI
TOULOUSE	TO-001	CRC	5 / 5	MSI	142 / 146	MSI
TOULOUSE	TO-002	CRC	5 / 5	MSI	142 / 143 / 145	MSI
TOULOUSE	TO-003	CRC	5 / 5	MSI	142 / 143 / 146	MSI
TOULOUSE	TO-004	CRC	5 / 5	MSI	141 / 142 / 145	MSI
TOULOUSE	TO-005	CRC	5 / 5	MSI	141 / 145	MSI
TOULOUSE	TO-006	CRC	5 / 5	MSI	140 / 142 / 146	MSI
TOULOUSE	TO-007	CRC	5 / 5	MSI	139 / 141 / 145	MSI
TOULOUSE	TO-008	CRC	4 / 5	MSI	140 / 143 / 145 / 146	MSI
TOULOUSE	TO-009	CRC	4 / 5	MSI	141 / 145 / 146	MSI
TOULOUSE	TO-010	CRC	5 / 5	MSI	141 / 145 / 146	MSI
TOULOUSE	TO-011	CRC	5 / 5	MSI	142 / 145 / 146	MSI
TOULOUSE	TO-012	CRC	5 / 5	MSI	141 / 146	MSI
TOULOUSE	TO-013	CRC	5 / 5	MSI	141 / 142 / 145	MSI
TOULOUSE	TO-014	CRC	4 / 5	MSI	142 / 146	MSI
TOULOUSE	TO-015	CRC	4 / 5	MSI	140 / 142 / 145	MSI
TOULOUSE	TO-016	CRC	3 / 5	MSI	142	MSI
TOULOUSE	TO-017	CRC	5 / 5	MSI	141 / 145	MSI
TOULOUSE	TO-018	CRC	5 / 5	MSI	141 / 146	MSI
TOULOUSE	TO-019	CRC	5 / 5	MSI	141 / 145	MSI
TOULOUSE	TO-020	CRC	5 / 5	MSI	144 / 146	MSI
TOULOUSE	TO-021	CRC	4 / 5	MSI	140 / 145	MSI
TOULOUSE	TO-022	CRC	4 / 5	MSI	142 / 145	MSI
TOULOUSE	TO-023	CRC	5 / 5	MSI	142 / 145	MSI
TOULOUSE	TO-024	CRC	4 / 5	MSI	141 / 145	MSI
TOULOUSE	TO-025	CRC	4 / 5	MSI	141 / 145	MSI
TOULOUSE	TO-026	CRC	5 / 5	MSI	139 / 145	MSI
TOULOUSE	TO-027	CRC	4 / 5	MSI	140 / 145	MSI
TOULOUSE	TO-028	CRC	5 / 5	MSI	136 / 142 / 145	MSI
TOULOUSE	TO-029	CRC	5 / 5	MSI	142 / 145	MSI
TOULOUSE	TO-030	CRC	4 / 5	MSI	144 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-072	CRC	4 / 5	MSI	146	MSS
AUSTRALIA	AU-001	CRC	3 / 3	MSI	146	MSS

AUSTRALIA	AU-423	CRC	2 / 3	MSI	146	MSS
AUSTRALIA	AU-432	CRC	2 / 3	MSI	146	MSS
STRASBOURG	ST-001	Adenomas	2 / 5	MSI	142 / 145	MSI
STRASBOURG	ST-005	Adenomas	5 / 5	MSI	143 / 146	MSI
STRASBOURG	ST-006	Adenomas	4 / 4	MSI	141 / 145	MSI
STRASBOURG	ST-007	Adenomas	4 / 5	MSI	142 / 144	MSI
STRASBOURG	ST-008	Adenomas	3 / 3	MSI	144 / 145	MSI
STRASBOURG	ST-009	Adenomas	5 / 5	MSI	143 / 145	MSI
STRASBOURG	ST-010	Adenomas	4 / 5	MSI	143 / 146 / 145	MSI
STRASBOURG	ST-011	Adenomas	4 / 5	MSI	142 / 146	MSI
STRASBOURG	ST-012	Adenomas	3 / 3	MSI	144 / 145 / 146	MSI
STRASBOURG	ST-013	Adenomas	5 / 5	MSI	143 / 145	MSI
STRASBOURG	ST-014	Adenomas	5 / 5	MSI	141 / 144 / 145	MSI
STRASBOURG	ST-015	Adenomas	5 / 5	MSI	140 / 145	MSI
STRASBOURG	ST-016	Adenomas	5 / 5	MSI	144 / 146	MSI
STRASBOURG	ST-017	Adenomas	2 / 5	MSI	144 / 146	MSI
STRASBOURG	ST-019	Adenomas	2 / 3	MSI	144 / 146	MSI
NL-Niessen	NL-008	CRC	5 / 5	MSI	140 / 143 / 145 / 146	MSI
NL-Kets	NL-001	CRC	5 / 5	MSI	140 / 141 / 146	MSI
NL-Kets	NL-002	CRC	2 / 5	MSI	143 / 144 / 145	MSI
NL-Kets	NL-003	CRC	5 / 5	MSI	143 / 144 / 146	MSI
NL-Kets	NL-004	CRC	3 / 5	MSI	143 / 145 / 146	MSI
NL-Kets	NL-005	CRC	2 / 5	MSI	144 / 145 / 146 / 147	MSI
NL-Kets	NL-006	CRC	4 / 5	MSI	144 / 145	MSI
NL-Niessen	NL-007	CRC	4 / 4	MSI	143 / 145	MSI
NL-Niessen	NL-009	CRC	5 / 5	MSI	140 / 143 / 145 / 146	MSI
NL-Niessen	NL-010	CRC	3 / 3	MSI	142 / 145 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-050	CRC	4 / 5	MSI	145 / 146	MSI (R)
AUSTRALIA	AU-108	CRC	4 / 5	MSI	145	MSI (R)
AUSTRALIA	AU-154	CRC	1 / 1	MSI/DOUBDTFUL	144 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-426	CRC	1 / 2	MSI/DOUBDTFUL	141 / 143 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-441	CRC	1 / 2	MSI/DOUBDTFUL	140 / 143 / 146	MSI
AUSTRALIA	AU-452	CRC	1 / 3	MSI/DOUBDTFUL	144 / 145	MSI
AUSTRALIA	AU-413	CRC	1 / 4	MSI/DOUBDTFUL	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-440	CRC	1 / 3	MSI/DOUBDTFUL	146	MSS
AUSTRALIA	AU-198	CRC	1 / 5	MSS	141 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-025	CRC	0 / 5	MSS	143 / 145 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-052	CRC	0 / 5	MSS	143 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-059	CRC	1 / 5	MSS	143 / 145 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-035	CRC	1 / 5	MSS	142 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-036	CRC	0 / 5	MSS	142 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-050	CRC	0 / 5	MSS	141 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-129	CRC	1 / 5	MSS	140 / 145	MSI
PARIS_SA	PA-142	CRC	1 / 5	MSS	142 / 146	MSI
PARIS_SA	PA-130	CRC	1 / 5	MSS	145 / 146	MSI (R)
PARIS_SA	PA-131	CRC	0 / 5	MSS	145	MSI (R)
PARIS_SA	PA-143	CRC	0 / 5	MSS	145	MSI (R)
AUSTRALIA	AU-070	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSI (R)

AUSTRALIA	AU-235	CRC	1 / 5	MSS	146	MSI (R)
AUSTRALIA	AU-008	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-009	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-010	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-011	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-012	CRC	1 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-013	CRC	1 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-014	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-015	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-016	CRC	1 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-017	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-018	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-019	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-021	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-022	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-023	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-025	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-026	CRC	1 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-027	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-028	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-029	CRC	1 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-031	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-032	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-033	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-035	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-036	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-037	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-038	CRC	1 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-039	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-040	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-041	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-043	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-046	CRC	1 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-047	CRC	1 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-048	CRC	1 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-049	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-051	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-052	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-053	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-054	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-055	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-056	CRC	1 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-058	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-059	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-060	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-061	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-063	CRC	1 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-066	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS

AUSTRALIA	AU-067	CRC	1 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-069	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-071	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-072	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-073	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-074	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-078	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-079	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-081	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-082	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-083	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-084	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-085	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-086	CRC	1 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-087	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-088	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-089	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-090	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-092	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-093	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-094	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-095	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-096	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-097	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-099	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-100	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-102	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-103	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-104	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-105	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-106	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-107	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-109	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-110	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-111	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-112	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-113	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-114	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-115	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-116	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-117	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-118	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-119	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-120	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-121	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-122	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-123	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-124	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS

AUSTRALIA	AU-125	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-126	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-127	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-128	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-129	CRC	1 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-130	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-131	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-132	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-133	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-134	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-135	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-136	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-137	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-138	CRC	1 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-139	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-142	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-143	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-144	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-145	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-146	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-147	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-148	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-150	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-151	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-152	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-153	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-156	CRC	1 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-158	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-159	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-160	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-161	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-162	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-163	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-164	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-165	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-166	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-167	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-168	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-169	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-170	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-171	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-172	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-174	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-175	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-176	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-177	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-178	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-179	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS

AUSTRALIA	AU-180	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-182	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-183	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-185	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-186	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-187	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-188	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-189	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-190	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-191	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-192	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-193	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-194	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-195	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-196	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-197	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-200	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-201	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-202	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-203	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-204	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-205	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-206	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-207	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-208	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-209	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-210	CRC	1 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-211	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-213	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-214	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-215	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-217	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-219	CRC	1 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-220	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-222	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-223	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-224	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-225	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-226	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-227	CRC	1 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-228	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-229	CRC	1 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-230	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-231	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-232	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-234	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-236	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-237	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS

AUSTRALIA	AU-238	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-239	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-242	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-243	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-244	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-246	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-247	CRC	0 / 5	MSS	145 / 147	MSS
AUSTRALIA	AU-248	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-249	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-250	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-251	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-252	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-253	CRC	1 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-254	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-255	CRC	1 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-256	CRC	1 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-257	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-259	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-260	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-261	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-262	CRC	1 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-263	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-264	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-265	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-266	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-267	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-268	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-270	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-273	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-274	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-275	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-276	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-277	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-278	CRC	1 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-279	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-280	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-281	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-282	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-283	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-284	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-285	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-286	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-287	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-289	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-291	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-292	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-293	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-294	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS

AUSTRALIA	AU-295	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-296	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-297	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-298	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-299	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-300	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-302	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-303	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-304	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-305	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-306	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-307	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-308	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-309	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-310	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-312	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-313	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-314	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-316	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-317	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-318	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-319	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-320	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-321	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-323	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-324	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-325	CRC	1 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-326	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-327	CRC	1 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-328	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-329	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-330	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-331	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-332	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-333	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-334	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-335	CRC	1 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-336	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-337	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-338	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-339	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-341	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-342	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-343	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-344	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-346	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-347	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-348	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS

AUSTRALIA	AU-349	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-350	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-351	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-352	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-354	CRC	1 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-355	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-356	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-357	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-359	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-360	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-361	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-362	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-363	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-364	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-365	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-366	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-367	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-368	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-369	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-370	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-371	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-372	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-373	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-374	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-375	CRC	1 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-376	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-377	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-378	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-379	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-380	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-381	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-382	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
AUSTRALIA	AU-383	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-384	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-386	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
AUSTRALIA	AU-387	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-389	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-390	CRC	1 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-391	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
AUSTRALIA	AU-393	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
PARIS_SA	PA-012	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
PARIS_SA	PA-017	CRC	1 / 5	MSS	145 / 146	MSS
PARIS_SA	PA-018	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
PARIS_SA	PA-019	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
PARIS_SA	PA-020	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
PARIS_SA	PA-021	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
PARIS_SA	PA-022	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
PARIS_SA	PA-023	CRC	1 / 5	MSS	145 / 146	MSS

PARIS_SA	PA-027	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
PARIS_SA	PA-028	CRC	1 / 5	MSS	146	MSS
PARIS_SA	PA-032	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
PARIS_SA	PA-034	CRC	0 / 5	MSS	145	MSS
PARIS_SA	PA-053	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
PARIS_SA	PA-060	CRC	0 / 5	MSS	146	MSS
PARIS_SA	PA-132	CRC	1 / 5	MSS	145	MSS
PARIS_SA	PA-133	CRC	0 / 4	MSS	145 / 146	MSS
PARIS_SA	PA-134	CRC	1 / 5	MSS	145	MSS
PARIS_SA	PA-135	CRC	1 / 5	MSS	145	MSS
PARIS_SA	PA-136	CRC	1 / 5	MSS	146	MSS
PARIS_SA	PA-137	CRC	1 / 5	MSS	146	MSS
PARIS_SA	PA-138	CRC	0 / 5	MSS	145 / 146	MSS
STRASBOURG	ST-002	Adenomas	1 / 5	MSS	146	MSS
STRASBOURG	ST-003	Adenomas	1 / 5	MSS	146	MSS
STRASBOURG	ST-004	Adenomas	0 / 5	MSS	146	MSS
STRASBOURG	ST-018	Adenomas	1 / 5	MSS	145	MSS

Supplementary Table S1. The complete colorectal cancer series tested for MSI determination via the pentaplex and HT17. The columns report the clinical center from which tumors originate, the number of instable pentaplex markers and the sizes of the HT17 alleles. The greyed lines highlight the doubtful and discordant cases of the study, the boxed values in the last column indicate the tumors presenting with aberrant R1 and/or R2 ratios (annotated as MSI (R)).

	CONTROLS (1037 individuals)			TUMOURS (314 cases)						
Markers	Informative controls	Genotypes without variant	Genotypes with variant outside QMVR	Informative tumours	Genotypes with instable allele	Genotypes without instable allele	Se	Sp	PPV	NPV
NR27	1011	963	48	303	292	11	96.5	95.3	86.3	98.9
NR21	1016	968	48	309	274	35	89.8	95.3	86.6	96.5
NR24	1026	1025	1	196	161	35	84.8	99.9	99.5	96.7
BAT25	1008	970	38	201	178	23	89.7	96.2	84.1	97.7
BAT26	1011	984	27	300	272	28	91.5	97.3	91.7	97.2
HT17	1037	1037	0	308	304	4	98.7	100.0	100.0	99.6

Supplementary Table S2. Details of the data used for the comparison of the predictive values of the pentaplex markers and HT17 for the determination of MSI. For each marker, the controls panel reports the total number of interpretable genotypes with non saturated traces and presenting with peak intensities higher than 100 AFU, the number of genotypes without and with variants outside the respective QMVRs. In the same manner, the tumors panel reports the interpretable tumoral genotypes, then the number of genotypes with and without alleles outside the QMVRs (=instable). The statistical parameters at the end of the table were calculated using controls and tumors data once the adenomas cases have been removed. Se, sensitivity; Sp, specificity; PPV, Positive Predictive Value; NPV, Negative Predictive Value.

Références bibliographiques

Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, et al. (1993) Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* **260:** 812-816

Abbott PJ, Saffhill R (1979) DNA synthesis with methylated poly(dC-dG) templates. Evidence for a competitive nature to miscoding by O(6)-methylguanine. *Biochim Biophys Acta* **562:** 51-61

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature methods* **7:** 248-249

Aebi S, Fink D, Gordon R, Kim HK, Zheng H, Fink JL, Howell SB (1997) Resistance to cytotoxic drugs in DNA mismatch repair-deficient cells. *Clin Cancer Res* **3:** 1763-1767

Agoff SN, Brentnall TA, Crispin DA, Taylor SL, Raaka S, Haggitt RC, Reed MW, Afonina IA, Rabinovitch PS, Stevens AC, Feng Z, Bronner MP (2000) The role of cyclooxygenase 2 in ulcerative colitis-associated neoplasia. *Am J Pathol* **157:** 737-745

Agostini M, Tibiletti MG, Lucci-Cordisco E, Chiaravalli A, Morreau H, Furlan D, Boccuto L, Pucciarelli S, Capella C, Boiocchi M, Viel A (2005) Two PMS2 mutations in a Turcot syndrome family with small bowel cancers. *Am J Gastroenterol* **100:** 1886-1891

Akiyama Y, Sato H, Yamada T, Nagasaki H, Tsuchiya A, Abe R, Yuasa Y (1997) Germ-line mutation of the hMSH6/GTBP gene in an atypical hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindred. *Cancer research* **57:** 3920-3923

Allan JM, Travis LB (2005) Mechanisms of therapy-related carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* **5:** 943-955

Alotaibi H, Ricciardone MD, Ozturk M (2008) Homozygosity at variant MLH1 can lead to secondary mutation in NF1, neurofibromatosis type I and early onset leukemia. *Mutation research* **637:** 209-214

Amoli MM, Carthy D, Platt H, Ollier WE (2008) EBV Immortalization of human B lymphocytes separated from small volumes of cryo-preserved whole blood. *Int J Epidemiol* **37 Suppl 1:** i41-45

Aquilina G, Giammarioli AM, Zijno A, Di Muccio A, Dogliotti E, Bignami M (1990) Tolerance to O6-methylguanine and 6-thioguanine cytotoxic effects: a cross-resistant phenotype in N-methylnitrosourea-resistant Chinese hamster ovary cells. *Cancer research* **50:** 4248-4253

Atreya I, Neurath MF (2008a) Azathioprine in inflammatory bowel disease: improved molecular insights and resulting clinical implications. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* **2:** 23-34

Atreya R, Neurath MF (2008b) New therapeutic strategies for treatment of inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunol* **1:** 175-182

Au KG, Welsh K, Modrich P (1992) Initiation of methyl-directed mismatch repair. *J Biol Chem* **267:** 12142-12148

Auclair J, Leroux D, Desseigne F, Lasset C, Saurin JC, Joly MO, Pinson S, Xu XL, Montmain G, Ruano E, Navarro C, Puisieux A, Wang Q (2007) Novel biallelic mutations in MSH6 and PMS2 genes: gene conversion as a likely cause of PMS2 gene inactivation. *Human mutation* **28:** 1084-1090

Aust DE, Haase M, Dobryden L, Markwarth A, Lohrs U, Wittekind C, Baretton GB, Tannapfel A (2005) Mutations of the BRAF gene in ulcerative colitis-related colorectal carcinoma. *Int J Cancer* **115:** 673-677

Baker SM, Bronner CE, Zhang L, Plug AW, Robatzek M, Warren G, Elliott EA, Yu J, Ashley T, Arnheim N, Flavell RA, Liskay RM (1995) Male mice defective in the DNA mismatch repair gene PMS2 exhibit abnormal chromosome synapsis in meiosis. *Cell* **82:** 309-319

Baker SM, Plug AW, Prolla TA, Bronner CE, Harris AC, Yao X, Christie DM, Monell C, Arnheim N, Bradley A, Ashley T, Liskay RM (1996) Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. *Nat Genet* **13:** 336-342

Bakry D, Aronson M, Durno C, Rimawi H, Farah R, Alharbi QK, Alharbi M, Shamvil A, Ben-Shachar S, Mistry M, Constantini S, Dvir R, Qaddoumi I, Gallinger S, Lerner-Ellis J, Pollett A, Stephens D, Kelies S, Chao E, Malkin D, Bouffet E, Hawkins C, Tabori U (2014) Genetic and clinical determinants of constitutional mismatch repair deficiency syndrome: report from the constitutional mismatch repair deficiency consortium. *Eur J Cancer* **50:** 987-996

Bandipalliam P (2005) Syndrome of early onset colon cancers, hematologic malignancies & features of neurofibromatosis in HNPCC families with homozygous mismatch repair gene mutations. *Fam Cancer* **4:** 323-333

Bartolini G, Ammar K, Mantovani B, Scanabissi F, Ferreri AM, Rocchi P, Orlandi M (2004) Retinoids and cancer: antitumor effect of ATRA and of a new derivative of retinoic acid, IIF, on colon carcinoma cell lines CaCo-2 and HT-29. *Anticancer Res* **24:** 1779-1783

Bartsch H, O'Neill, I. K, Schlte-Hermann, R. (1987) Relevance of N-nitroso compounds to human cancer: exposures and mechanisms. Proceedings of the IXth International Symposium on N-Nitroso Compounds. Baden, Austria, 1-5 September 1986. *IARC Sci Publ***:** 1-663

Basu A, Contreras AG, Datta D, Flynn E, Zeng L, Cohen HT, Briscoe DM, Pal S (2008) Overexpression of vascular endothelial growth factor and the development of post-transplantation cancer. *Cancer research* **68:** 5689-5698

Beaugerie L, Brousse N, Bouvier AM, Colombel JF, Lemann M, Cosnes J, Hebuterne X, Cortot A, Bouhnik Y, Gendre JP, Simon T, Maynadie M, Hermine O, Faivre J, Carrat F (2009) Lymphoproliferative disorders in patients receiving thiopurines for inflammatory bowel disease: a prospective observational cohort study. *Lancet* **374:** 1617-1625

Bedi GC, Westra WH, Farzadegan H, Pitha PM, Sidransky D (1995) Microsatellite instability in primary neoplasms from HIV + patients. *Nat Med* **1:** 65-68

Bellizzi AM, Frankel WL (2009) Colorectal cancer due to deficiency in DNA mismatch repair function: a review. *Adv Anat Pathol* **16:** 405-417

Berends MJ, Wu Y, Sijmons RH, Mensink RG, van der Sluis T, Hordijk-Hos JM, de Vries EG, Hollema H, Karrenbeld A, Buys CH, van der Zee AG, Hofstra RM, Kleibeuker JH (2002) Molecular and clinical characteristics of MSH6 variants: an analysis of 25 index carriers of a germline variant. *Am J Hum Genet* **70:** 26-37

Bernacki SH, Beck JC, Muralidharan K, Schaefer FV, Shrimpton AE, Richie KL, Levin BC, Pont-Kingdon G, Stenzel TT (2005) Characterization of publicly available lymphoblastoid cell lines for disease-associated mutations in 11 genes. *Clin Chem* **51:** 2156-2159

Berry SE, Davis TW, Schupp JE, Hwang HS, de Wind N, Kinsella TJ (2000) Selective radiosensitization of drug-resistant MutS homologue-2 (MSH2) mismatch repair-deficient cells by halogenated thymidine (dThd) analogues: Msh2 mediates dThd analogue DNA levels and the differential cytotoxicity and cell cycle effects of the dThd analogues and 6-thioguanine. *Cancer research* **60:** 5773-5780

Bertino JR (1991) Modulation of fluorouracil by methotrexate. *J Clin Oncol* **9:** 1511-1512

Bignami M, O'Driscoll M, Aquilina G, Karran P (2000) Unmasking a killer: DNA O(6)-methylguanine and the cytotoxicity of methylating agents. *Mutation research* **462:** 71-82

Bleibel WK, Duan S, Huang RS, Kistner EO, Shukla SJ, Wu X, Badner JA, Dolan ME (2009) Identification of genomic regions contributing to etoposide-induced cytotoxicity. *Hum Genet* **125:** 173-180

Boland CR, Lynch HT (2013) The history of Lynch syndrome. *Fam Cancer* **12:** 145-157

Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S (1998) A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer research* **58:** 5248-5257

Boland CR, Troncale FJ (1984) Familial colonic cancer without antecedent polyposis. *Ann Intern Med* **100:** 700-701

Bordea C, Wojnarowska F, Millard PR, Doll H, Welsh K, Morris PJ (2004) Skin cancers in renal-transplant recipients occur more frequently than previously recognized in a temperate climate. *Transplantation* **77:** 574-579

Borgdorff V, van Hees-Stuivenberg S, Meijers CM, de Wind N (2005) Spontaneous and mutagen-induced loss of DNA mismatch repair in Msh2-heterozygous mammalian cells. *Mutation research* **574:** 50-57

Borie C, Colas C, Dartigues P, Lazure T, Rince P, Buhard O, Folliot P, Chalastanis A, Muleris M, Hamelin R, Mercier D, Oliveira C, Seruca R, Chadburn A, Leblond V, Barete S, Gaidano G, Martin A, Gaulard P, Flejou JF, Raphael M, Duval A (2009) The mechanisms underlying MMR deficiency in immunodeficiency-related non-Hodgkin lymphomas are different from those in other sporadic microsatellite instable neoplasms. *Int J Cancer* **125:** 2360-2366

Borie C, Euvrard S, Verola O, Buhard O, Barete S, Molina JM, Kanitakis J, Kerob D, Lebbe C, Duval A (2010) No evidence for microsatellite instability in immunodeficiency-related skin cancers. *Am J Transplant* **10:** 192-193

Borie C, Raphael M, Hamelin R, Duval A (2004) Microsatellite instability: a new mechanism of carcinogenesis associated with immunodepression in non Hodgkin lymphomas in humans. *Med Sci (Paris)* **20:** 641-642

Borza CM, Hutt-Fletcher LM (2002) Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nat Med* **8:** 594-599

Bougeard G, Olivier-Faivre L, Baert-Desurmont S, Tinat J, Martin C, Bouvignies E, Vasseur S, Huet F, Couillault G, Vabres P, Le Pessot F, Chapusot C, Malka D, Bressac-de Paillerets B, Tosi M, Frebourg T (2014) Diversity of the clinical presentation of the MMR gene biallelic mutations. *Fam Cancer* **13:** 131-135

Boyd KP, Korf BR, Theos A (2009) Neurofibromatosis type 1. *J Am Acad Dermatol* **61:** 1-14; quiz 15-16

Branch P, Aquilina G, Bignami M, Karran P (1993) Defective mismatch binding and a mutator phenotype in cells tolerant to DNA damage. *Nature* **362:** 652-654

Branch P, Hampson R, Karran P (1995) DNA mismatch binding defects, DNA damage tolerance, and mutator phenotypes in human colorectal carcinoma cell lines. *Cancer research* **55:** 2304-2309

Brems H, Legius E (2013) Legius syndrome, an Update. Molecular pathology of mutations in SPRED1. *Keio J Med* **62:** 107-112

Brentnall TA, Crispin DA, Bronner MP, Cherian SP, Hueffed M, Rabinovitch PS, Rubin CE, Haggitt RC, Boland CR (1996) Microsatellite instability in nonneoplastic mucosa from patients with chronic ulcerative colitis. *Cancer research* **56:** 1237-1240

Buermeyer AB, Wilson-Van Patten C, Baker SM, Liskay RM (1999) The human MLH1 cDNA complements DNA mismatch repair defects in Mlh1-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Cancer research* **59:** 538-541

Buhard O, Cattaneo F, Wong YF, Yim SF, Friedman E, Flejou JF, Duval A, Hamelin R (2006) Multipopulation analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability status of human tumors. *J Clin Oncol* **24:** 241-251

Burchenal JH, Murphy ML, Ellison RR, Sykes MP, Tan TC, Leone LA, Karnofsky DA, Craver LF, Dargeon HW, Rhoads CP (1953) Clinical evaluation of a new antimetabolite, 6-mercaptopurine, in the treatment of leukemia and allied diseases. *Blood* **8:** 965-999

Burkitt D (1958) A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg* **46:** 218-223

Burkitt D (1962) Determining the climatic limitations of a children's cancer common in Africa. *Br Med J* **2:** 1019-1023

Calabrese P, Tsao JL, Yatabe Y, Salovaara R, Mecklin JP, Jarvinen HJ, Aaltonen LA, Tavare S, Shibata D (2004) Colorectal pretumor progression before and after loss of DNA mismatch repair. *Am J Pathol* **164:** 1447-1453

Callaway E (2013) Deal done over HeLa cell line. *Nature* **500:** 132-133

Cawkwell L, Sutherland F, Murgatroyd H, Jarvis P, Gray S, Cross D, Shepherd N, Day D, Quirke P (2000) Defective hMSH2/hMLH1 protein expression is seen infrequently in ulcerative colitis associated colorectal cancers. *Gut* **46:** 367-369

Chai H, Brown RE (2009) Field effect in cancer-an update. *Annals of clinical and laboratory science* **39:** 331-337

Chalastanis A, Penard-Lacronique V, Svrcek M, Defaweux V, Antoine N, Buhard O, Dumont S, Fabiani B, Renault I, Tubacher E, Flejou JF, Te Riele H, Duval A, Muleris M (2010) Azathioprine-induced carcinogenesis in mice according to Msh2 genotype. *Journal of the National Cancer Institute* **102:** 1731-1740

Chang CL, Marra G, Chauhan DP, Ha HT, Chang DK, Ricciardiello L, Randolph A, Carethers JM, Boland CR (2002) Oxidative stress inactivates the human DNA mismatch repair system. *Am J Physiol Cell Physiol* **283:** C148-154

Chao EC, Velasquez JL, Witherspoon MS, Rozek LS, Peel D, Ng P, Gruber SB, Watson P, Rennert G, Anton-Culver H, Lynch H, Lipkin SM (2008) Accurate classification of MLH1/MSH2 missense variants with multivariate analysis of protein polymorphisms-mismatch repair (MAPP-MMR). *Human mutation* **29:** 852-860

Chapusot C, Martin L, Puig PL, Ponnelle T, Cheynel N, Bouvier AM, Rageot D, Roignot P, Rat P, Faivre J, Piard F (2004) What is the best way to assess microsatellite instability status in colorectal cancer? Study on a population base of 462 colorectal cancers. *Am J Surg Pathol* **28:** 1553-1559

Charbonnier F, Raux G, Wang Q, Drouot N, Cordier F, Limacher JM, Saurin JC, Puisieux A, Olschwang S, Frebourg T (2000) Detection of exon deletions and duplications of the mismatch repair genes in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families using multiplex polymerase chain reaction of short fluorescent fragments. *Cancer research* **60:** 2760-2763

Cheepala SB, Syed Z, Trutschl M, Cvek U, Clifford JL (2007) Retinoids and skin: microarrays shed new light on chemopreventive action of all-trans retinoic acid. *Mol Carcinog* **46:** 634-639

Chen PC, Dudley S, Hagen W, Dizon D, Paxton L, Reichow D, Yoon SR, Yang K, Arnheim N, Liskay RM, Lipkin SM (2005) Contributions by MutL homologues Mlh3 and Pms2 to DNA mismatch repair and tumor suppression in the mouse. *Cancer research* **65:** 8662-8670

Choy E, Yelensky R, Bonakdar S, Plenge RM, Saxena R, De Jager PL, Shaw SY, Wolfish CS, Slavik JM, Cotsapas C, Rivas M, Dermitzakis ET, Cahir-McFarland E, Kieff E, Hafler D, Daly MJ, Altshuler D (2008) Genetic analysis of human traits in vitro: drug response and gene expression in lymphoblastoid cell lines. *PLoS genetics* **4:** e1000287

Claij N, Te Riele H (2002) Methylation tolerance in mismatch repair proficient cells with low MSH2 protein level. *Oncogene* **21:** 2873-2879

Claij N, van der Wal A, Dekker M, Jansen L, te Riele H (2003) DNA mismatch repair deficiency stimulates N-ethyl-N-nitrosourea-induced mutagenesis and lymphomagenesis. *Cancer research* **63:** 2062-2066

Clark AB, Valle F, Drotschmann K, Gary RK, Kunkel TA (2000) Functional interaction of proliferating cell nuclear antigen with MSH2-MSH6 and MSH2-MSH3 complexes. *J Biol Chem* **275:** 36498-36501

Claverys JP, Lacks SA (1986) Heteroduplex deoxyribonucleic acid base mismatch repair in bacteria. *Microbiol Rev* **50:** 133-165

Coolbaugh-Murphy M, Maleki A, Ramagli L, Frazier M, Lichtiger B, Monckton DG, Siciliano MJ, Brown BW (2004) Estimating mutant microsatellite allele frequencies in somatic cells by small-pool PCR. *Genomics* **84:** 419-430

Coolbaugh-Murphy MI, Xu JP, Ramagli LS, Ramagli BC, Brown BW, Lynch PM, Hamilton SR, Frazier ML, Siciliano MJ (2010) Microsatellite instability in the peripheral blood leukocytes of HNPCC patients. *Human mutation* **31:** 317-324

Cooper DL, Lahue RS, Modrich P (1993) Methyl-directed mismatch repair is bidirectional. *J Biol Chem* **268:** 11823-11829

Couch FJ, Rasmussen LJ, Hofstra R, Monteiro AN, Greenblatt MS, de Wind N (2008) Assessment of functional effects of unclassified genetic variants. *Human mutation* **29:** 1314-1326

Coulthard SA, Hogarth LA, Little M, Matheson EC, Redfern CP, Minto L, Hall AG (2002) The effect of thiopurine methyltransferase expression on sensitivity to thiopurine drugs. *Mol Pharmacol* **62:** 102-109

Crespo-Leiro MG, Alonso-Pulpon L, Vazquez de Prada JA, Almenar L, Arizon JM, Brossa V, Delgado JF, Fernandez-Yanez J, Manito N, Rabago G, Lage E, Roig E, Diaz-Molina B, Pascual D, Muniz J (2008) Malignancy after heart transplantation: incidence, prognosis and risk factors. *Am J Transplant* **8:** 1031-1039

Cuffari C, Li DY, Mahoney J, Barnes Y, Bayless TM (2004) Peripheral blood mononuclear cell DNA 6-thioguanine metabolite levels correlate with decreased interferon-gamma production in patients with Crohn's disease on AZA therapy. *Digestive diseases and sciences* **49:** 133-137

Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ, Kim CY, Roche PC, Burgart LJ, Thibodeau SN (1998) Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer research* **58:** 3455-3460

Curkovic I, Rentsch KM, Frei P, Fried M, Rogler G, Kullak-Ublick GA, Jetter A (2013) Low allopurinol doses are sufficient to optimize azathioprine therapy in inflammatory bowel disease patients with inadequate thiopurine metabolite concentrations. *Eur J Clin Pharmacol* **69:** 1521-1531

Das KK, Nishino HT, Chan AT (2010) Treatment-associated acute myeloid leukemia in a patient with Crohn's disease on 6-mercaptopurine. *Inflammatory bowel diseases* **16:** 1454-1456

Datta D, Contreras AG, Basu A, Dormond O, Flynn E, Briscoe DM, Pal S (2009) Calcineurin inhibitors activate the proto-oncogene Ras and promote protumorigenic signals in renal cancer cells. *Cancer research* **69:** 8902-8909

Datta D, Contreras AG, Grimm M, Waaga-Gasser AM, Briscoe DM, Pal S (2008) Calcineurin inhibitors modulate CXCR3 splice variant expression and mediate renal cancer progression. *J Am Soc Nephrol* **19:** 2437-2446

Davis TW, Wilson-Van Patten C, Meyers M, Kunugi KA, Cuthill S, Reznikoff C, Garces C, Boland CR, Kinsella TJ, Fishel R, Boothman DA (1998) Defective expression of the DNA mismatch repair protein, MLH1, alters G2-M cell cycle checkpoint arrest following ionizing radiation. *Cancer research* **58:** 767-778

De Coster R, Wouters W, Van Ginckel R, End D, Krekels M, Coene MC, Bowden C (1992) Experimental studies with liarozole (R 75,251): an antitumoral agent which inhibits retinoic acid breakdown. *J Steroid Biochem Mol Biol* **43:** 197-201

De la Chapelle A (2004) Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* **10:** 769-780

De Rosa M, Fasano C, Panariello L, Scarano MI, Belli G, Iannelli A, Ciciliano F, Izzo P (2000) Evidence for a recessive inheritance of Turcot's syndrome caused by compound heterozygous mutations within the PMS2 gene. *Oncogene* **19:** 1719-1723

De Vos M, Hayward BE, Charlton R, Taylor GR, Glaser AW, Picton S, Cole TR, Maher ER, McKeown CM, Mann JR, Yates JR, Baralle D, Rankin J, Bonthron DT, Sheridan E (2006) PMS2 mutations in childhood cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **98:** 358-361

De Vos M, Hayward BE, Picton S, Sheridan E, Bonthron DT (2004) Novel PMS2 pseudogenes can conceal recessive mutations causing a distinctive childhood cancer syndrome. *Am J Hum Genet* **74:** 954-964

de Wind N, Dekker M, Berns A, Radman M, te Riele H (1995) Inactivation of the mouse Msh2 gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer. *Cell* **82:** 321-330

de Wind N, Dekker M, van Rossum A, van der Valk M, te Riele H (1998) Mouse models for hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer research* **58:** 248-255

Dervieux T, Blanco JG, Krynetski EY, Vanin EF, Roussel MF, Relling MV (2001) Differing contribution of thiopurine methyltransferase to mercaptopurine versus thioguanine effects in human leukemic cells. *Cancer research* **61:** 5810-5816

Dolan ME, Pegg AE (1997) O6-benzylguanine and its role in chemotherapy. *Clin Cancer Res* **3:** 837-847

Dorard C, de Thonel A, Collura A, Marisa L, Svrcek M, Lagrange A, Jego G, Wanherdrick K, Joly AL, Buhard O, Gobbo J, Penard-Lacronique V, Zouali H, Tubacher E, Kirzin S, Selves J, Milano G, Etienne-Grimaldi MC, Bengrine-Lefevre L, Louvet C, Tournigand C, Lefevre JH, Parc Y, Tiret E, Flejou JF, Gaub MP, Garrido C, Duval A (2011) Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. *Nat Med* **17:** 1283-1289

Doss CG, Sethumadhavan R (2009) Investigation on the role of nsSNPs in HNPCC genes--a bioinformatics approach. *J Biomed Sci* **16:** 42

Duan S, Bleibel WK, Huang RS, Shukla SJ, Wu X, Badner JA, Dolan ME (2007) Mapping genes that contribute to daunorubicin-induced cytotoxicity. *Cancer research* **67:** 5425-5433

Durno CA, Aronson M, Tabori U, Malkin D, Gallinger S, Chan HS (2012) Oncologic surveillance for subjects with biallelic mismatch repair gene mutations: 10 year follow-up of a kindred. *Pediatr Blood Cancer* **59:** 652-656

Duval A, Hamelin R (2003) Replication error repair, microsatellites, and cancer. *Med Sci (Paris)* **19:** 55-62

Duval A, Raphael M, Brennetot C, Poirel H, Buhard O, Aubry A, Martin A, Krimi A, Leblond V, Gabarre J, Davi F, Charlotte F, Berger F, Gaidano G, Capello D, Canioni D, Bordessoule D, Feuillard J, Gaulard P, Delfau MH, Ferlicot S, Eclache V, Prevot S, Guettier C, Lefevre PC, Adotti F, Hamelin R (2004) The mutator pathway is a feature of immunodeficiency-related lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101:** 5002-5007

Dzantiev L, Constantin N, Genschel J, Iyer RR, Burgers PM, Modrich P (2004) A defined human system that supports bidirectional mismatch-provoked excision. *Mol Cell* **15:** 31-41

Edelmann L, Edelmann W (2004) Loss of DNA mismatch repair function and cancer predisposition in the mouse: animal models for human hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **129C:** 91-99

Edelmann W, Cohen PE, Kane M, Lau K, Morrow B, Bennett S, Umar A, Kunkel T, Cattoretti G, Chaganti R, Pollard JW, Kolodner RD, Kucherlapati R (1996) Meiotic pachytene arrest in MLH1-deficient mice. *Cell* **85:** 1125-1134

Edelmann W, Cohen PE, Kneitz B, Winand N, Lia M, Heyer J, Kolodner R, Pollard JW, Kucherlapati R (1999a) Mammalian MutS homologue 5 is required for chromosome pairing in meiosis. *Nat Genet* **21:** 123-127

Edelmann W, Umar A, Yang K, Heyer J, Kucherlapati M, Lia M, Kneitz B, Avdievich E, Fan K, Wong E, Crouse G, Kunkel T, Lipkin M, Kolodner RD, Kucherlapati R (2000) The DNA mismatch repair genes Msh3 and Msh6 cooperate in intestinal tumor suppression. *Cancer research* **60:** 803-807

Edelmann W, Yang K, Kuraguchi M, Heyer J, Lia M, Kneitz B, Fan K, Brown AM, Lipkin M, Kucherlapati R (1999b) Tumorigenesis in Mlh1 and Mlh1/Apc1638N mutant mice. *Cancer research* **59:** 1301-1307

Edelmann W, Yang K, Umar A, Heyer J, Lau K, Fan K, Liedtke W, Cohen PE, Kane MF, Lipford JR, Yu N, Crouse GF, Pollard JW, Kunkel T, Lipkin M, Kolodner R, Kucherlapati R (1997) Mutation in the mismatch repair gene Msh6 causes cancer susceptibility. *Cell* **91:** 467-477

Elion EB, Callahan SW, Hitchings GH, Rundles RW, Laszlo J (1962) Experimental, clinical, and metabolic studies of thiopurines. *Cancer Chemother Rep* **16:** 197-202

Elion GB (1969) Actions of purine analogs: enzyme specificity studies as a basis for interpretation and design. *Cancer research* **29:** 2448-2453

Elion GB (1972) Significance of azathioprine metabolites. *Proc R Soc Med* **65:** 257-260

Elion GB, Callahan S, Rundles RW, Hitchings GH (1963) Relationship between Metabolic Fates and Antitumor Activities of Thiopurines. *Cancer research* **23:** 1207-1217

Elion GB, Callahan SW, Hitchings GH, Rundles RW (1960) The metabolism of 2-amino-6-[(1-methyl-4-nitro-5-imidazolyl)thio]purine (B.W. 57-323) in man. *Cancer Chemother Rep* **8:** 47-52

Elion GB, Singer S, Hitchings GH (1953a) The purine metabolism of a 6-mercaptopurine-resistant Lactobacillus casei. *J Biol Chem* **204:** 35-41

Elion GB, Singer S, Hitchings GH, Balis ME, Drown GB (1953b) Effects of purine antagonists on a diaminopurine-resistant strain of Lactobacillus casei. *J Biol Chem* **202:** 647-654

Epstein MA, Achong BG, Barr YM (1964) Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* **1:** 702-703

Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG (2000) Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* **343:** 1350-1354

Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG (1999) Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer research* **59:** 793-797

Esteller M, Herman JG (2004) Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer. *Oncogene* **23:** 1-8

Etzler J, Peyrl A, Zatkova A, Schildhaus HU, Ficek A, Merkelbach-Bruse S, Kratz CP, Attarbaschi A, Hainfellner JA, Yao S, Messiaen L, Slavc I, Wimmer K (2008) RNA-based mutation analysis identifies an unusual MSH6 splicing defect and circumvents PMS2 pseudogene interference. *Human mutation* **29:** 299-305

Euvrard S, Kanitakis J, Pouteil-Noble C, Dureau G, Touraine JL, Faure M, Claudy A, Thivolet J (1995) Comparative epidemiologic study of premalignant and malignant epithelial cutaneous lesions developing after kidney and heart transplantation. *J Am Acad Dermatol* **33:** 222-229

Fabry TL, Sachar DB, Janowitz HD (1980) Acute myelogenous leukemia in patients with ulcerative colitis. *Journal of clinical gastroenterology* **2:** 225-227

Fedier A, Fink D (2004) Mutations in DNA mismatch repair genes: implications for DNA damage signaling and drug sensitivity (review). *Int J Oncol* **24:** 1039-1047

Felton KE, Gilchrist DM, Andrew SE (2007) Constitutive deficiency in DNA mismatch repair: is it time for Lynch III? *Clinical genetics* **71:** 499-500

Fingeroth JD, Weis JJ, Tedder TF, Strominger JL, Biro PA, Fearon DT (1984) Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81:** 4510-4514

Fishel R (1999) Signaling mismatch repair in cancer. *Nat Med* **5:** 1239-1241

Fleisher AS, Esteller M, Harpaz N, Leytin A, Rashid A, Xu Y, Liang J, Stine OC, Yin J, Zou TT, Abraham JM, Kong D, Wilson KT, James SP, Herman JG, Meltzer SJ (2000) Microsatellite instability in inflammatory bowel disease-associated neoplastic lesions is associated with hypermethylation and diminished expression of the DNA mismatch repair gene, hMLH1. *Cancer research* **60:** 4864-4868

Flores-Rozas H, Clark D, Kolodner RD (2000) Proliferating cell nuclear antigen and Msh2p-Msh6p interact to form an active mispair recognition complex. *Nat Genet* **26:** 375-378

Flores-Rozas H, Kolodner RD (1998) The Saccharomyces cerevisiae MLH3 gene functions in MSH3-dependent suppression of frameshift mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95:** 12404-12409

Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C (2006) Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols* **1:** 2315-2319

Frei P, Biedermann L, Nielsen OH, Rogler G (2013) Use of thiopurines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **19:** 1040-1048

Friedman HS, Dolan ME, Pegg AE, Marcelli S, Keir S, Catino JJ, Bigner DD, Schold SC, Jr. (1995) Activity of temozolomide in the treatment of central nervous system tumor xenografts. *Cancer research* **55:** 2853-2857

Friedman HS, Kerby T, Calvert H (2000) Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clin Cancer Res* **6:** 2585-2597

Fu D, Calvo JA, Samson LD (2012) Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nat Rev Cancer* **12:** 104-120

Gaidano G, Pastore C, Gloghini A, Capello D, Tirelli U, Saglio G, Carbone A (1997) Microsatellite instability in KSHV/HHV-8 positive body-cavity-based lymphoma. *Hum Pathol* **28:** 748-750

Gallinger S, Aronson M, Shayan K, Ratcliffe EM, Gerstle JT, Parkin PC, Rothenmund H, Croitoru M, Baumann E, Durie PR, Weksberg R, Pollett A, Riddell RH, Ngan BY, Cutz E, Lagarde AE, Chan HS (2004) Gastrointestinal cancers and neurofibromatosis type 1 features in children with a germline homozygous MLH1 mutation. *Gastroenterology* **126:** 576-585

Gamberi B, Gaidano G, Parsa N, Carbone A, Roncella S, Knowles DM, Louie DC, Shibata D, Chaganti RS, Dalla-Favera R (1997) Microsatellite instability is rare in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* **89:** 975-979

Ganster C, Wernstedt A, Kehrer-Sawatzki H, Messiaen L, Schmidt K, Rahner N, Heinimann K, Fonatsch C, Zschocke J, Wimmer K (2010) Functional PMS2 hybrid alleles containing a pseudogene-specific missense variant trace back to a single ancient intrachromosomal recombination event. *Human mutation* **31:** 552-560

Gasche C, Chang CL, Natarajan L, Goel A, Rhees J, Young DJ, Arnold CN, Boland CR (2003) Identification of frame-shift intermediate mutant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100:** 1914-1919

Gasche C, Chang CL, Rhees J, Goel A, Boland CR (2001) Oxidative stress increases frameshift mutations in human colorectal cancer cells. *Cancer research* **61:** 7444-7448

Genschel J, Bazemore LR, Modrich P (2002) Human exonuclease I is required for 5' and 3' mismatch repair. *J Biol Chem* **277:** 13302-13311

Genschel J, Littman SJ, Drummond JT, Modrich P (1998) Isolation of MutSbeta from human cells and comparison of the mismatch repair specificities of MutSbeta and MutSalpha. *J Biol Chem* **273:** 19895-19901

Gerson SL (1989) Modulation of human lymphocyte O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase by streptozotocin in vivo. *Cancer research* **49:** 3134-3138

Gerson SL (2002) Clinical relevance of MGMT in the treatment of cancer. *J Clin Oncol* **20:** 2388-2399

Gilman A (1963) The initial clinical trial of nitrogen mustard. *Am J Surg* **105:** 574-578

Giovannucci E, Ogino S (2005) DNA methylation, field effects, and colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **97:** 1317-1319

Giunti L, Cetica V, Ricci U, Giglio S, Sardi I, Paglierani M, Andreucci E, Sanzo M, Forni M, Buccoliero AM, Genitori L, Genuardi M (2009) Type A microsatellite instability in pediatric gliomas as an indicator of Turcot syndrome. *Eur J Hum Genet* **17:** 919-927

Glassner BJ, Weeda G, Allan JM, Broekhof JL, Carls NH, Donker I, Engelward BP, Hampson RJ, Hersmus R, Hickman MJ, Roth RB, Warren HB, Wu MM, Hoeijmakers JH, Samson LD (1999) DNA repair

methyltransferase (Mgmt) knockout mice are sensitive to the lethal effects of chemotherapeutic alkylating agents. *Mutagenesis* **14:** 339-347

Glickman B, van den Elsen P, Radman M (1978) Induced mutagenesis in dam- mutants of Escherichia coli: a role for 6-methyladenine residues in mutation avoidance. *Mol Gen Genet* **163:** 307-312

Glickman BW, Radman M (1980) Escherichia coli mutator mutants deficient in methylation-instructed DNA mismatch correction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77:** 1063-1067

Goel A, Nagasaka T, Hamelin R, Boland CR (2010) An optimized pentaplex PCR for detecting DNA mismatch repair-deficient colorectal cancers. *PLoS One* **5:** e9393

Goel A, Nguyen TP, Leung HC, Nagasaka T, Rhees J, Hotchkiss E, Arnold M, Banerji P, Koi M, Kwok CT, Packham D, Lipton L, Boland CR, Ward RL, Hitchins MP (2011) De novo constitutional MLH1 epimutations confer early-onset colorectal cancer in two new sporadic Lynch syndrome cases, with derivation of the epimutation on the paternal allele in one. *Int J Cancer* **128:** 869-878

Gologan A, Sepulveda AR (2005) Microsatellite instability and DNA mismatch repair deficiency testing in hereditary and sporadic gastrointestinal cancers. *Clin Lab Med* **25:** 179-196

Gottschling S, Reinhard H, Pagenstecher C, Kruger S, Raedle J, Plotz G, Henn W, Buettner R, Meyer S, Graf N (2008) Hypothesis: Possible role of retinoic acid therapy in patients with biallelic mismatch repair gene defects. *Eur J Pediatr* **167:** 225-229

Greene CN, Jinks-Robertson S (1997) Frameshift intermediates in homopolymer runs are removed efficiently by yeast mismatch repair proteins. *Mol Cell Biol* **17:** 2844-2850

Grindedal EM, Aarset H, Bjornevoll I, Royset E, Maehle L, Stormorken A, Heramb C, Medvik H, Moller P, Sjursen W (2014) The Norwegian PMS2 founder mutation c.989-1G > T shows high penetrance of microsatellite instable cancers with normal immunohistochemistry. *Hered Cancer Clin Pract* **12:** 12

Gu L, Hong Y, McCulloch S, Watanabe H, Li GM (1998) ATP-dependent interaction of human mismatch repair proteins and dual role of PCNA in mismatch repair. *Nucleic acids research* **26:** 1173-1178

Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, Bruns CJ, Zuelke C, Farkas S, Anthuber M, Jauch KW, Geissler EK (2002) Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med* **8:** 128-135

Guerrette S, Wilson T, Gradia S, Fishel R (1998) Interactions of human hMSH2 with hMSH3 and hMSH2 with hMSH6: examination of mutations found in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Mol Cell Biol* **18:** 6616-6623

Halling KC, Harper J, Moskaluk CA, Thibodeau SN, Petroni GR, Yustein AS, Tosi P, Minacci C, Roviello F, Piva P, Hamilton SR, Jackson CE, Powell SM (1999) Origin of microsatellite instability in gastric cancer. *Am J Pathol* **155:** 205-211

Hamelin R, Chalastanis A, Colas C, El Bchiri J, Mercier D, Schreurs AS, Simon V, Svrcek M, Zaanan A, Borie C, Buhard O, Capel E, Zouali H, Praz F, Muleris M, Flejou JF, Duval A (2008) Clinical and molecular consequences of microsatellite instability in human cancers. *Bull Cancer* **95:** 121-132

Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, Papadopoulos N, Jen J, Powell SM, Krush AJ, Berk T, Cohen Z, Tetu B, et al. (1995) The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med* **332:** 839-847

Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, Nakagawa H, Sotamaa K, Prior TW, Westman J, Panescu J, Fix D, Lockman J, Comeras I, de la Chapelle A (2005) Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med* **352:** 1851-1860

Hanauer SB (1996) Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* **334:** 841-848

Hartevelt MM, Bavinck JN, Kootte AM, Vermeer BJ, Vandenbroucke JP (1990) Incidence of skin cancer after renal transplantation in The Netherlands. *Transplantation* **49:** 506-509

Hausner P, Venzon DJ, Grogan L, Kirsch IR (1999) The "comparative growth assay": examining the interplay of anti-cancer agents with cells carrying single gene alterations. *Neoplasia* **1:** 356-367

Hawn MT, Umar A, Carethers JM, Marra G, Kunkel TA, Boland CR, Koi M (1995) Evidence for a connection between the mismatch repair system and the G2 cell cycle checkpoint. *Cancer research* **55:** 3721-3725

Hegan DC, Narayanan L, Jirik FR, Edelmann W, Liskay RM, Glazer PM (2006) Differing patterns of genetic instability in mice deficient in the mismatch repair genes Pms2, Mlh1, Msh2, Msh3 and Msh6. *Carcinogenesis* **27:** 2402-2408

Hegde M, Ferber M, Mao R, Samowitz W, Ganguly A (2014) ACMG technical standards and guidelines for genetic testing for inherited colorectal cancer (Lynch syndrome, familial adenomatous polyposis, and MYH-associated polyposis). *Genet Med* **16:** 101-116

Hegde MR, Chong B, Blazo ME, Chin LH, Ward PA, Chintagumpala MM, Kim JY, Plon SE, Richards CS (2005) A homozygous mutation in MSH6 causes Turcot syndrome. *Clin Cancer Res* **11:** 4689-4693

Heinen CD, Juel Rasmussen L (2012) Determining the functional significance of mismatch repair gene missense variants using biochemical and cellular assays. *Hered Cancer Clin Pract* **10:** 9

Hemmens VJ, Moore DE (1986) Photochemical sensitization by azathioprine and its metabolites--I. 6-Mercaptopurine. *Photochem Photobiol* **43:** 247-255

Henle G, Henle W (1966) Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. *J Bacteriol* **91:** 1248-1256

Henle G, Henle W, Diehl V (1968) Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-ytpe virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **59:** 94-101

Henle W, Diehl V, Kohn G, Zur Hausen H, Henle G (1967) Herpes-type virus and chromosome marker in normal leukocytes after growth with irradiated Burkitt cells. *Science* **157:** 1064-1065

Henle W, Henle G (1969) The relation between the Epstein-Barr virus and infectious mononucleosis, Burkitt's lymphoma and cancer of the postnasal space. *East Afr Med J* **46:** 402-406

Henle W, Henle G (1970) Evidence for a relation of Epstein-Barr virus to Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. *Bibl Haematol***:** 706-713

Her C, Doggett NA (1998) Cloning, structural characterization, and chromosomal localization of the human orthologue of Saccharomyces cerevisiae MSH5 gene. *Genomics* **52:** 50-61

Herkert JC, Niessen RC, Olderode-Berends MJ, Veenstra-Knol HE, Vos YJ, van der Klift HM, Scheenstra R, Tops CM, Karrenbeld A, Peters FT, Hofstra RM, Kleibeuker JH, Sijmons RH (2011) Paediatric intestinal cancer and polyposis due to bi-allelic PMS2 mutations: case series, review and follow-up guidelines. *Eur J Cancer* **47:** 965-982

Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB (1998) Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95:** 6870-6875

Heyer J, Yang K, Lipkin M, Edelmann W, Kucherlapati R (1999) Mouse models for colorectal cancer. *Oncogene* **18:** 5325-5333

Hitchings GH, Elion GB (1954) The chemistry and biochemistry of purine analogs. *Ann N Y Acad Sci* **60:** 195-199

Hitchings GH, Elion GB, Falco EA, Russell PB, Vanderwerff H (1950) Studies on analogs of purines and pyrimidines. *Ann N Y Acad Sci* **52:** 1318-1335

Hodges KB, Vnencak-Jones CL, Larson RS, Kinney MC (1999) Rarity of genomic instability in pathogenesis of systemic anaplastic large cell lymphoma (ALCL) in immunocompetent patients. *Hum Pathol* **30:** 173-177

Hofseth LJ, Khan MA, Ambrose M, Nikolayeva O, Xu-Welliver M, Kartalou M, Hussain SP, Roth RB, Zhou X, Mechanic LE, Zurer I, Rotter V, Samson LD, Harris CC (2003) The adaptive imbalance in base excision-repair enzymes generates microsatellite instability in chronic inflammation. *J Clin Invest* **112:** 1887-1894

Hollingsworth NM, Ponte L, Halsey C (1995) MSH5, a novel MutS homolog, facilitates meiotic reciprocal recombination between homologs in Saccharomyces cerevisiae but not mismatch repair. *Genes Dev* **9:** 1728-1739

Hsieh P, Yamane K (2008) DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mech Ageing Dev* **129:** 391-407

Huang RS, Kistner EO, Bleibel WK, Shukla SJ, Dolan ME (2007) Effect of population and gender on chemotherapeutic agent-induced cytotoxicity. *Mol Cancer Ther* **6:** 31-36

Hunter C, Smith R, Cahill DP, Stephens P, Stevens C, Teague J, Greenman C, Edkins S, Bignell G, Davies H, O'Meara S, Parker A, Avis T, Barthorpe S, Brackenbury L, Buck G, Butler A, Clements J, Cole J, Dicks E, Forbes S, Gorton M, Gray K, Halliday K, Harrison R, Hills K, Hinton J, Jenkinson A, Jones D, Kosmidou V, Laman R, Lugg R, Menzies A, Perry J, Petty R, Raine K, Richardson D, Shepherd R, Small A, Solomon H, Tofts C, Varian J, West S, Widaa S, Yates A, Easton DF, Riggins G, Roy JE, Levine KK, Mueller W, Batchelor TT, Louis DN, Stratton MR, Futreal PA, Wooster R (2006) A hypermutation phenotype and somatic MSH6 mutations in recurrent human malignant gliomas after alkylator chemotherapy. *Cancer research* **66:** 3987-3991

Huson SM, Compston DA, Clark P, Harper PS (1989) A genetic study of von Recklinghausen neurofibromatosis in south east Wales. I. Prevalence, fitness, mutation rate, and effect of parental transmission on severity. *Journal of medical genetics* **26:** 704-711

Hussain T, Mulherkar R (2012) Lymphoblastoid Cell lines: a Continuous in Vitro Source of Cells to Study Carcinogen Sensitivity and DNA Repair. *Int J Mol Cell Med* **1:** 75-87

Ilencikova D, Sejnova D, Jindrova J, Babal P (2011) High-grade brain tumors in siblings with biallelic MSH6 mutations. *Pediatr Blood Cancer* **57:** 1067-1070

Ingham D, Diggle CP, Berry I, Bristow CA, Hayward BE, Rahman N, Markham AF, Sheridan EG, Bonthron DT, Carr IM (2013) Simple detection of germline microsatellite instability for diagnosis of constitutional mismatch repair cancer syndrome. *Human mutation* **34:** 847-852

Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M (1993) Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* **363:** 558-561

Ishikawa T, Fujita T, Suzuki Y, Okabe S, Yuasa Y, Iwai T, Kawakami Y (2003) Tumor-specific immunological recognition of frameshift-mutated peptides in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer research* **63:** 5564-5572

Jackson AL, Chen R, Loeb LA (1998) Induction of microsatellite instability by oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95:** 12468-12473

Jackson CC, Holter S, Pollett A, Clendenning M, Chou S, Senter L, Ramphal R, Gallinger S, Boycott K (2008) Cafe-au-lait macules and pediatric malignancy caused by biallelic mutations in the DNA mismatch repair (MMR) gene PMS2. *Pediatr Blood Cancer* **50:** 1268-1270

Jagmohan-Changur S, Poikonen T, Vilkki S, Launonen V, Wikman F, Orntoft TF, Moller P, Vasen H, Tops C, Kolodner RD, Mecklin JP, Jarvinen H, Bevan S, Houlston RS, Aaltonen LA, Fodde R, Wijnen J, Karhu A (2003) EXO1 variants occur commonly in normal population: evidence against a role in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer research* **63:** 154-158

Jarvinen HJ, Renkonen-Sinisalo L, Aktan-Collan K, Peltomaki P, Aaltonen LA, Mecklin JP (2009) Ten years after mutation testing for Lynch syndrome: cancer incidence and outcome in mutation-positive and mutation-negative family members. *J Clin Oncol* **27:** 4793-4797

Jasperson KW, Samowitz WS, Burt RW (2010) Constitutional mismatch repair-deficiency syndrome presenting as colonic adenomatous polyposis: clues from the skin. *Clinical genetics* **80:** 394-397

Jiricny J (2006) The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7:** 335-346

Johnson RE, Kovvali GK, Guzder SN, Amin NS, Holm C, Habraken Y, Sung P, Prakash L, Prakash S (1996) Evidence for involvement of yeast proliferating cell nuclear antigen in DNA mismatch repair. *J Biol Chem* **271:** 27987-27990

Kadyrov FA, Dzantiev L, Constantin N, Modrich P (2006) Endonucleolytic function of MutLalpha in human mismatch repair. *Cell* **126:** 297-308

Kadyrov FA, Genschel J, Fang Y, Penland E, Edelmann W, Modrich P (2009) A possible mechanism for exonuclease 1-independent eukaryotic mismatch repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106:** 8495-8500

Kaina B, Margison GP, Christmann M (2010) Targeting O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase with specific inhibitors as a strategy in cancer therapy. *Cell Mol Life Sci* **67:** 3663-3681

Kaina B, Ziouta A, Ochs K, Coquerelle T (1997) Chromosomal instability, reproductive cell death and apoptosis induced by O6-methylguanine in Mex-, Mex+ and methylation-tolerant mismatch repair compromised cells: facts and models. *Mutation research* **381:** 227-241

Kallel L, Naijaa N, Fekih M, Frikha I, Boubaker J, Bellaaj H, Romdhane NB, Filali A (2010) Acute myeloid leukemia after one month of azathioprine therapy in a Crohn's disease patient. *Journal of clinical gastroenterology* **44:** 660

Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, Jessup JM, Kolodner R (1997) Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer research* **57:** 808-811

Karran P (2001) Mechanisms of tolerance to DNA damaging therapeutic drugs. *Carcinogenesis* **22:** 1931-1937

Karran P (2006) Thiopurines, DNA damage, DNA repair and therapy-related cancer. *Br Med Bull* **79-80:** 153-170

Karran P, Attard N (2008) Thiopurines in current medical practice: molecular mechanisms and contributions to therapy-related cancer. *Nat Rev Cancer* **8:** 24-36

Karran P, Bignami M (1992) Self-destruction and tolerance in resistance of mammalian cells to alkylation damage. *Nucleic acids research* **20:** 2933-2940

Karran P, Bignami M (1994) DNA damage tolerance, mismatch repair and genome instability. *Bioessays* **16:** 833-839

Karran P, Hampson R (1996) Genomic instability and tolerance to alkylating agents. *Cancer Surv* **28:** 69-85

Kawate H, Itoh R, Sakumi K, Nakabeppu Y, Tsuzuki T, Ide F, Ishikawa T, Noda T, Nawata H, Sekiguchi M (2000) A defect in a single allele of the Mlh1 gene causes dissociation of the killing and tumorigenic actions of an alkylating carcinogen in methyltransferase-deficient mice. *Carcinogenesis* **21:** 301-305

Khanna A, Cairns V, Hosenpud JD (1999) Tacrolimus induces increased expression of transforming growth factor-beta1 in mammalian lymphoid as well as nonlymphoid cells. *Transplantation* **67:** 614-619

Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR (1994) Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol* **145:** 148-156

Kim JH, Kang GH (2014) Molecular and prognostic heterogeneity of microsatellite-unstable colorectal cancer. *World J Gastroenterol* **20:** 4230-4243

Kim TM, Laird PW, Park PJ (2013) The landscape of microsatellite instability in colorectal and endometrial cancer genomes. *Cell* **155:** 858-868

Kinlen L (1992) Immunosuppressive therapy and acquired immunological disorders. *Cancer research* **52:** 5474s-5476s

Klausner RD (1999) Studying cancer in the mouse. *Oncogene* **18:** 5249-5252

Kneitz B, Cohen PE, Avdievich E, Zhu L, Kane MF, Hou H, Jr., Kolodner RD, Kucherlapati R, Pollard JW, Edelmann W (2000) MutS homolog 4 localization to meiotic chromosomes is required for chromosome pairing during meiosis in male and female mice. *Genes Dev* **14:** 1085-1097

Kohonen-Corish M, Ross VL, Doe WF, Kool DA, Edkins E, Faragher I, Wijnen J, Khan PM, Macrae F, St John DJ (1996) RNA-based mutation screening in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Am J Hum Genet* **59:** 818-824

Kolodner R (1996) Biochemistry and genetics of eukaryotic mismatch repair. *Genes Dev* **10:** 1433-1442

Kolodner RD, Marsischky GT (1999) Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr Opin Genet Dev* **9:** 89-96

Kolodner RD, Tytell JD, Schmeits JL, Kane MF, Gupta RD, Weger J, Wahlberg S, Fox EA, Peel D, Ziogas A, Garber JE, Syngal S, Anton-Culver H, Li FP (1999) Germ-line msh6 mutations in colorectal cancer families. *Cancer research* **59:** 5068-5074

Kondo E, Horii A, Fukushige S (2001) The interacting domains of three MutL heterodimers in man: hMLH1 interacts with 36 homologous amino acid residues within hMLH3, hPMS1 and hPMS2. *Nucleic acids research* **29:** 1695-1702

Krauer KG, Buck M, Sculley T (1999) Characterization of the transcriptional repressor RBP in Epstein-Barr virus-transformed B cells. *J Gen Virol* **80 (Pt 12):** 3217-3226

Kruger S, Kinzel M, Walldorf C, Gottschling S, Bier A, Tinschert S, von Stackelberg A, Henn W, Gorgens H, Boue S, Kolble K, Buttner R, Schackert HK (2008) Homozygous PMS2 germline mutations in two

families with early-onset haematological malignancy, brain tumours, HNPCC-associated tumours, and signs of neurofibromatosis type 1. *Eur J Hum Genet* **16:** 62-72

Krumbhaar EB, Krumbhaar HD (1919) The Blood and Bone Marrow in Yelloe Cross Gas (Mustard Gas) Poisoning: Changes produced in the Bone Marrow of Fatal Cases. *J Med Res* **40:** 497-508 493

Kucherlapati MH, Lee K, Nguyen AA, Clark AB, Hou H, Jr., Rosulek A, Li H, Yang K, Fan K, Lipkin M, Bronson RT, Jelicks L, Kunkel TA, Kucherlapati R, Edelmann W (2010) An Msh2 conditional knockout mouse for studying intestinal cancer and testing anticancer agents. *Gastroenterology* **138:** 993-1002 e1001

Kuiper RP, Vissers LE, Venkatachalam R, Bodmer D, Hoenselaar E, Goossens M, Haufe A, Kamping E, Niessen RC, Hogervorst FB, Gille JJ, Redeker B, Tops CM, van Gijn ME, van den Ouweland AM, Rahner N, Steinke V, Kahl P, Holinski-Feder E, Morak M, Kloor M, Stemmler S, Betz B, Hutter P, Bunyan DJ, Syngal S, Culver JO, Graham T, Chan TL, Nagtegaal ID, van Krieken JH, Schackert HK, Hoogerbrugge N, van Kessel AG, Ligtenberg MJ (2009) Recurrence and variability of germline EPCAM deletions in Lynch syndrome. *Human mutation* **32:** 407-414

Kumar P, Henikoff S, Ng PC (2009) Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature protocols* **4:** 1073-1081

Kunkel TA, Erie DA (2005) DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem* **74:** 681-710

Laghi L, Beghelli S, Spinelli A, Bianchi P, Basso G, Di Caro G, Brecht A, Celesti G, Turri G, Bersani S, Schumacher G, Rocken C, Grantzdorffer I, Roncalli M, Zerbi A, Neuhaus P, Bassi C, Montorsi M, Scarpa A, Malesci A (2012) Irrelevance of microsatellite instability in the epidemiology of sporadic pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS One* **7:** e46002

Lahue RS, Au KG, Modrich P (1989) DNA mismatch correction in a defined system. *Science* **245:** 160-164

Landau M, Krafchik BR (1999) The diagnostic value of cafe-au-lait macules. *J Am Acad Dermatol* **40:** 877-890; quiz 891-872

Larson RS, Scott MA, McCurley TL, Vnencak-Jones CL (1996) Microsatellite analysis of posttransplant lymphoproliferative disorders: determination of donor/recipient origin and identification of putative lymphomagenic mechanism. *Cancer research* **56:** 4378-4381

Leblond V, Dedhin N, Mamzer Bruneel MF, Choquet S, Hermine O, Porcher R, Nguyen Quoc S, Davi V, Charlotte F, Dorent R, Barrou B, Vernant JP, Raphael M, Levy V (2001) Identification of prognostic factors in 61 patients with posttransplantation lymphoproliferative disorders. *J Clin Oncol* **19:** 772–778

Lee SH, Hurwitz J (1990) Mechanism of elongation of primed DNA by DNA polymerase delta, proliferating cell nuclear antigen, and activator 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87:** 5672-5676

Li B, Krishnan VG, Mort ME, Xin F, Kamati KK, Cooper DN, Mooney SD, Radivojac P (2009) Automated inference of molecular mechanisms of disease from amino acid substitutions. *Bioinformatics (Oxford, England)* **25:** 2744-2750

Li F, Mao G, Tong D, Huang J, Gu L, Yang W, Li GM (2013) The histone mark H3K36me3 regulates human DNA mismatch repair through its interaction with MutSalpha. *Cell* **153:** 590-600

Li GM (2008) Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res* **18:** 85-98

Li GM, Modrich P (1995) Restoration of mismatch repair to nuclear extracts of H6 colorectal tumor cells by a heterodimer of human MutL homologs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92:** 1950-1954

Ligtenberg MJ, Kuiper RP, Chan TL, Goossens M, Hebeda KM, Voorendt M, Lee TY, Bodmer D, Hoenselaar E, Hendriks-Cornelissen SJ, Tsui WY, Kong CK, Brunner HG, van Kessel AG, Yuen ST, van Krieken JH, Leung SY, Hoogerbrugge N (2009) Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat Genet* **41:** 112-117

Lin DP, Wang Y, Scherer SJ, Clark AB, Yang K, Avdievich E, Jin B, Werling U, Parris T, Kurihara N, Umar A, Kucherlapati R, Lipkin M, Kunkel TA, Edelmann W (2004) An Msh2 point mutation uncouples DNA mismatch repair and apoptosis. *Cancer research* **64:** 517-522

Lin J, Johannsen E, Robertson E, Kieff E (2002) Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C putative repression domain mediates coactivation of the LMP1 promoter with EBNA-2. *J Virol* **76:** 232-242

Linnebacher M, Gebert J, Rudy W, Woerner S, Yuan YP, Bork P, von Knebel Doeberitz M (2001) Frameshift peptide-derived T-cell epitopes: a source of novel tumor-specific antigens. *Int J Cancer* **93:** 6-11

Liu B, Nicolaides NC, Markowitz S, Willson JK, Parsons RE, Jen J, Papadopolous N, Peltomaki P, de la Chapelle A, Hamilton SR, et al. (1995) Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nat Genet* **9:** 48-55

Liu Y, Fang Y, Shao H, Lindsey-Boltz L, Sancar A, Modrich P (2010) Interactions of human mismatch repair proteins MutSalpha and MutLalpha with proteins of the ATR-Chk1 pathway. *J Biol Chem* **285:** 5974-5982

Longley MJ, Pierce AJ, Modrich P (1997) DNA polymerase delta is required for human mismatch repair in vitro. *J Biol Chem* **272:** 10917-10921

Lopez A, Mounier M, Bouvier AM, Carrat F, Maynadie M, Beaugerie L, Peyrin-Biroulet L (2014) Increased risk of acute myeloid leukemias and myelodysplastic syndromes in patients who received thiopurine treatment for inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* **12:** 1324-1329

Lotan R (1996a) Retinoids and their receptors in modulation of differentiation, development, and prevention of head and neck cancers. *Anticancer Res* **16:** 2415-2419

Lotan R (1996b) Retinoids in cancer chemoprevention. *Faseb J* **10:** 1031-1039

Lothe RA, Peltomaki P, Meling GI, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M, Pylkkanen L, Heimdal K, Andersen TI, Moller P, Rognum TO, et al. (1993) Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer research* **53:** 5849-5852

Louis E, Irving P, Beaugerie L (2014) Use of azathioprine in IBD: modern aspects of an old drug. *Gut*

Lu AL, Clark S, Modrich P (1983) Methyl-directed repair of DNA base-pair mismatches in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80:** 4639-4643

Lupulescu A (1993) Estrogen use and cancer risk: a review. *Exp Clin Endocrinol* **101:** 204-214

Lyda MH, Noffsinger A, Belli J, Fenoglio-Preiser CM (2000) Microsatellite instability and K-ras mutations in patients with ulcerative colitis. *Hum Pathol* **31:** 665-671

Lynch HT, de la Chapelle A (2003) Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* **348:** 919-932

Lynch HT, Lynch PM (2013) Foreword for "100 years of Lynch syndrome". *Fam Cancer* **12:** 143-144

Lynch HT, Lynch PM, Pester J, Fusaro RM (1981) The cancer family syndrome. Rare cutaneous phenotypic linkage of Torre's syndrome. *Arch Intern Med* **141:** 607-611

Maluccio M, Sharma V, Lagman M, Vyas S, Yang H, Li B, Suthanthiran M (2003) Tacrolimus enhances transforming growth factor-beta1 expression and promotes tumor progression. *Transplantation* **76:** 597-602

Marinus MG, Konrad EB (1976) Hyper-recombination in dam mutants of Escherichia coli K-12. *Mol Gen Genet* **149:** 273-277

Marinus MG, Poteete A, Arraj JA (1984) Correlation of DNA adenine methylase activity with spontaneous mutability in Escherichia coli K-12. *Gene* **28:** 123-125

Marra G, D'Atri S, Corti C, Bonmassar L, Cattaruzza MS, Schweizer P, Heinimann K, Bartosova Z, Nystrom-Lahti M, Jiricny J (2001) Tolerance of human MSH2+/- lymphoblastoid cells to the methylating agent temozolomide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98:** 7164-7169

Marsischky GT, Filosi N, Kane MF, Kolodner R (1996) Redundancy of Saccharomyces cerevisiae MSH3 and MSH6 in MSH2-dependent mismatch repair. *Genes Dev* **10:** 407-420

Mello JA, Acharya S, Fishel R, Essigmann JM (1996) The mismatch-repair protein hMSH2 binds selectively to DNA adducts of the anticancer drug cisplatin. *Chem Biol* **3:** 579-589

Mercader P (2010) Muir-Torre syndrome. *Adv Exp Med Biol* **685:** 186-195

Middleton MR, Margison GP (2003) Improvement of chemotherapy efficacy by inactivation of a DNA-repair pathway. *Lancet Oncol* **4:** 37-44

Miller G (1974) The oncogenicity of Epstein-Barr virus. *J Infect Dis* **130:** 187-205

Miller N, Hutt-Fletcher LM (1988) A monoclonal antibody to glycoprotein gp85 inhibits fusion but not attachment of Epstein-Barr virus. *J Virol* **62:** 2366-2372

Miller WH, Jr. (1998) The emerging role of retinoids and retinoic acid metabolism blocking agents in the treatment of cancer. *Cancer* **83:** 1471-1482

Miyaki M, Konishi M, Tanaka K, Kikuchi-Yanoshita R, Muraoka M, Yasuno M, Igari T, Koike M, Chiba M, Mori T (1997) Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* **17:** 271-272

Modigliani R (2000) Immunosuppressors for inflammatory bowel disease: how long is long enough? *Inflammatory bowel diseases* **6:** 251-257; discussion 158

Modrich P (1989) Methyl-directed DNA mismatch correction. *J Biol Chem* **264:** 6597-6600

Modrich P (1991) Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annu Rev Genet* **25:** 229-253

Modrich P (2006) Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. *J Biol Chem* **281:** 30305-30309

Modrich P, Lahue R (1996) Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem* **65:** 101-133

Mohyuddin A, Ayub Q, Siddiqi S, Carvalho-Silva DR, Mazhar K, Rehman S, Firasat S, Dar A, Tyler-Smith C, Mehdi SQ (2004) Genetic instability in EBV-transformed lymphoblastoid cell lines. *Biochim Biophys Acta* **1670:** 81-83

Mojas N, Lopes M, Jiricny J (2007) Mismatch repair-dependent processing of methylation damage gives rise to persistent single-stranded gaps in newly replicated DNA. *Genes Dev* **21:** 3342-3355

Mojtahed A, Schrijver I, Ford JM, Longacre TA, Pai RK (2011) A two-antibody mismatch repair protein immunohistochemistry screening approach for colorectal carcinomas, skin sebaceous tumors, and gynecologic tract carcinomas. *Mod Pathol* **24:** 1004-1014

Molesworth SJ, Lake CM, Borza CM, Turk SM, Hutt-Fletcher LM (2000) Epstein-Barr virus gH is essential for penetration of B cells but also plays a role in attachment of virus to epithelial cells. *J Virol* **74:** 6324-6332

Monckton DG, Jeffreys AJ (1991) Minisatellite "isoallele" discrimination in pseudohomozygotes by single molecule PCR and variant repeat mapping. *Genomics* **11:** 465-467

Moon RC (1994) Vitamin A, retinoids and breast cancer. *Adv Exp Med Biol* **364:** 101-107

Moreland NJ, Illand M, Kim YT, Paul J, Brown R (1999) Modulation of drug resistance mediated by loss of mismatch repair by the DNA polymerase inhibitor aphidicolin. *Cancer research* **59:** 2102-2106

Moum B, Ekbom A, Vatn MH, Aadland E, Sauar J, Lygren I, Schulz T, Stray N, Fausa O (1997) Inflammatory bowel disease: re-evaluation of the diagnosis in a prospective population based study in south eastern Norway. *Gut* **40:** 328-332

Muir EG, Bell AJ, Barlow KA (1967) Multiple primary carcinomata of the colon, duodenum, and larynx associated with kerato-acanthomata of the face. *Br J Surg* **54:** 191-195

Nagasaka T, Rhees J, Kloor M, Gebert J, Naomoto Y, Boland CR, Goel A (2010) Somatic hypermethylation of MSH2 is a frequent event in Lynch Syndrome colorectal cancers. *Cancer research* **70:** 3098-3108

Nakagawa H, Lockman JC, Frankel WL, Hampel H, Steenblock K, Burgart LJ, Thibodeau SN, de la Chapelle A (2004) Mismatch repair gene PMS2: disease-causing germline mutations are frequent in patients whose tumors stain negative for PMS2 protein, but paralogous genes obscure mutation detection and interpretation. *Cancer research* **64:** 4721-4727

Natrajan G, Lamers MH, Enzlin JH, Winterwerp HH, Perrakis A, Sixma TK (2003) Structures of Escherichia coli DNA mismatch repair enzyme MutS in complex with different mismatches: a common recognition mode for diverse substrates. *Nucleic acids research* **31:** 4814-4821

Nemerow GR, Houghten RA, Moore MD, Cooper NR (1989) Identification of an epitope in the major envelope protein of Epstein-Barr virus that mediates viral binding to the B lymphocyte EBV receptor (CR2). *Cell* **56:** 369-377

Nemerow GR, Mold C, Schwend VK, Tollefson V, Cooper NR (1987) Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *J Virol* **61:** 1416-1420

Ng PC, Henikoff S (2002) Accounting for human polymorphisms predicted to affect protein function. *Genome research* **12:** 436-446

Niessen RC, Hofstra RM, Westers H, Ligtenberg MJ, Kooi K, Jager PO, de Groote ML, Dijkhuizen T, Olderode-Berends MJ, Hollema H, Kleibeuker JH, Sijmons RH (2009) Germline hypermethylation of MLH1 and EPCAM deletions are a frequent cause of Lynch syndrome. *Genes Chromosomes Cancer* **48:** 737-744

Niles RM (2007) Biomarker and animal models for assessment of retinoid efficacy in cancer chemoprevention. *Acta Pharmacol Sin* **28:** 1383-1391

Njar VC, Gediya L, Purushottamachar P, Chopra P, Vasaitis TS, Khandelwal A, Mehta J, Huynh C, Belosay A, Patel J (2006) Retinoic acid metabolism blocking agents (RAMBAs) for treatment of cancer and dermatological diseases. *Bioorg Med Chem* **14:** 4323-4340

Nosho K, Baba Y, Tanaka N, Shima K, Hayashi M, Meyerhardt JA, Giovannucci E, Dranoff G, Fuchs CS, Ogino S (2010) Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: cohort study and literature review. *J Pathol* **222:** 350-366

O'Donovan P, Perrett CM, Zhang X, Montaner B, Xu YZ, Harwood CA, McGregor JM, Walker SL, Hanaoka F, Karran P (2005) Azathioprine and UVA light generate mutagenic oxidative DNA damage. *Science* **309:** 1871-1874

O'Neill SC, Rini C, Goldsmith RE, Valdimarsdottir H, Cohen LH, Schwartz MD (2009) Distress among women receiving uninformative BRCA1/2 results: 12-month outcomes. *Psychooncology* **18:** 1088-1096

O'Sullivan JN, Bronner MP, Brentnall TA, Finley JC, Shen WT, Emerson S, Emond MJ, Gollahon KA, Moskovitz AH, Crispin DA, Potter JD, Rabinovitch PS (2002) Chromosomal instability in ulcerative colitis is related to telomere shortening. *Nat Genet* **32:** 280-284

Offman J, Opelz G, Doehler B, Cummins D, Halil O, Banner NR, Burke MM, Sullivan D, Macpherson P, Karran P (2004) Defective DNA mismatch repair in acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome after organ transplantation. *Blood* **104:** 822-828

Okkels H, Lindorff-Larsen K, Thorlasius-Ussing O, Vyberg M, Lindebjerg J, Sunde L, Bernstein I, Klarskov L, Holck S, Krarup HB (2012) MSH6 mutations are frequent in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families with normal pMSH6 expression as detected by immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **20:** 470-477

Ostergaard JR, Sunde L, Okkels H (2005) Neurofibromatosis von Recklinghausen type I phenotype and early onset of cancers in siblings compound heterozygous for mutations in MSH6. *Am J Med Genet A* **139A:** 96-105; discussion 196

Overbeek LI, Ligtenberg MJ, Willems RW, Hermens RP, Blokx WA, Dubois SV, van der Linden H, Meijer JW, Mlynek-Kersjes ML, Hoogerbrugge N, Hebeda KM, van Krieken JH (2008) Interpretation of immunohistochemistry for mismatch repair proteins is only reliable in a specialized setting. *Am J Surg Pathol* **32:** 1246-1251

Paquis-Flucklinger V, Santucci-Darmanin S, Paul R, Saunieres A, Turc-Carel C, Desnuelle C (1997) Cloning and expression analysis of a meiosis-specific MutS homolog: the human MSH4 gene. *Genomics* **44:** 188-194

Parisotto M, Brodeur H, Bhat PV, Mader S (2006) Retinoid metabolism and cancer. *Med Sci (Paris)* **22:** 1101-1106

Parsons R, Li GM, Longley M, Modrich P, Liu B, Berk T, Hamilton SR, Kinzler KW, Vogelstein B (1995) Mismatch repair deficiency in phenotypically normal human cells. *Science* **268:** 738-740

Pastrello C, Pin E, Marroni F, Bedin C, Fornasarig M, Tibiletti MG, Oliani C, Ponz de Leon M, Urso ED, Della Puppa L, Agostini M, Viel A (2011) Integrated analysis of unclassified variants in mismatch repair genes. *Genet Med* **13:** 115-124

Pegg AE (2000) Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutation research* **462:** 83-100

Pegg AE, Swenn K, Chae MY, Dolan ME, Moschel RC (1995) Increased killing of prostate, breast, colon, and lung tumor cells by the combination of inactivators of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and N,N'-bis(2-chloroethyl)-N-nitrosourea. *Biochem Pharmacol* **50:** 1141-1148

Peltomaki P (2003) Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol* **21:** 1174-1179

Perrett CM, Harwood CA, McGregor JM, Warwick J, Cerio R, Karran P (2010) Expression of DNA mismatch repair proteins and MSH2 polymorphisms in nonmelanoma skin cancers of organ transplant recipients. *Br J Dermatol* **162:** 732-742

Pinals RS (1976) Azathioprine in the treatment of chronic polyarthritis: longterm results and adverse effects in 25 patients. *J Rheumatol* **3:** 140-144

Pino MS, Mino-Kenudson M, Wildemore BM, Ganguly A, Batten J, Sperduti I, Iafrate AJ, Chung DC (2009) Deficient DNA mismatch repair is common in Lynch syndrome-associated colorectal adenomas. *J Mol Diagn* **11:** 238-247

Plazzer JP, Sijmons RH, Woods MO, Peltomaki P, Thompson B, Den Dunnen JT, Macrae F (2013) The InSiGHT database: utilizing 100 years of insights into Lynch syndrome. *Fam Cancer* **12:** 175-180

Podolsky DK (2002a) The current future understanding of inflammatory bowel disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **16:** 933-943

Podolsky DK (2002b) Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* **347:** 417-429

Pope JH, Horne MK, Scott W (1968) Transformation of foetal human keukocytes in vitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus. *Int J Cancer* **3:** 857-866

Potocnik U, Glavac D, Golouh R, Ravnik-Glavac M (2001) Causes of microsatellite instability in colorectal tumors: implications for hereditary non-polyposis colorectal cancer screening. *Cancer Genet Cytogenet* **126:** 85-96

Prolla TA, Baker SM, Harris AC, Tsao JL, Yao X, Bronner CE, Zheng B, Gordon M, Reneker J, Arnheim N, Shibata D, Bradley A, Liskay RM (1998) Tumour susceptibility and spontaneous mutation in mice deficient in Mlh1, Pms1 and Pms2 DNA mismatch repair. *Nat Genet* **18:** 276-279

Prolla TA, Christie DM, Liskay RM (1994) Dual requirement in yeast DNA mismatch repair for MLH1 and PMS1, two homologs of the bacterial mutL gene. *Mol Cell Biol* **14:** 407-415

Qian XC, Brent TP (1997) Methylation hot spots in the 5' flanking region denote silencing of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Cancer research* **57:** 3672-3677

Raevaara TE, Gerdes AM, Lonnqvist KE, Tybjaerg-Hansen A, Abdel-Rahman WM, Kariola R, Peltomaki P, Nystrom-Lahti M (2004) HNPCC mutation MLH1 P648S makes the functional protein unstable, and homozygosity predisposes to mild neurofibromatosis type 1. *Genes Chromosomes Cancer* **40:** 261-265

Raschle M, Marra G, Nystrom-Lahti M, Schar P, Jiricny J (1999) Identification of hMutLbeta, a heterodimer of hMLH1 and hPMS1. *J Biol Chem* **274:** 32368-32375

Rasmussen LJ, Heinen CD, Royer-Pokora B, Drost M, Tavtigian S, Hofstra RM, de Wind N (2012) Pathological assessment of mismatch repair gene variants in Lynch syndrome: past, present, and future. *Human mutation* **33:** 1617-1625

Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N (2008) Dose translation from animal to human studies revisited. *Faseb J* **22:** 659-661

Reitmair AH, Redston M, Cai JC, Chuang TC, Bjerknes M, Cheng H, Hay K, Gallinger S, Bapat B, Mak TW (1996) Spontaneous intestinal carcinomas and skin neoplasms in Msh2-deficient mice. *Cancer research* **56:** 3842-3849

Reitmair AH, Schmits R, Ewel A, Bapat B, Redston M, Mitri A, Waterhouse P, Mittrucker HW, Wakeham A, Liu B, et al. (1995) MSH2 deficient mice are viable and susceptible to lymphoid tumours. *Nat Genet* **11:** 64-70

Relling MV, Yanishevski Y, Nemec J, Evans WE, Boyett JM, Behm FG, Pui CH (1998) Etoposide and antimetabolite pharmacology in patients who develop secondary acute myeloid leukemia. *Leukemia* **12:** 346-352

Reva B, Antipin Y, Sander C (2011) Predicting the functional impact of protein mutations: application to cancer genomics. *Nucleic acids research* **39:** e118

Ricciardone MD, Ozcelik T, Cevher B, Ozdag H, Tuncer M, Gurgey A, Uzunalimoglu O, Cetinkaya H, Tanyeli A, Erken E, Ozturk M (1999) Human MLH1 deficiency predisposes to hematological malignancy and neurofibromatosis type 1. *Cancer research* **59:** 290-293

Robertson A, Pattishall SR, Matson SW (2006) The DNA binding activity of MutL is required for methyl-directed mismatch repair in Escherichia coli. *J Biol Chem* **281:** 8399-8408

Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JR, Khan PM, Lynch H, Perucho M, Smyrk T, Sobin L, Srivastava S (1997) A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *Journal of the National Cancer Institute* **89:** 1758-1762

Roos WP, Christmann M, Fraser ST, Kaina B (2007) Mouse embryonic stem cells are hypersensitive to apoptosis triggered by the DNA damage O(6)-methylguanine due to high E2F1 regulated mismatch repair. *Cell Death Differ* **14:** 1422-1432

Ross-Macdonald P, Roeder GS (1994) Mutation of a meiosis-specific MutS homolog decreases crossing over but not mismatch correction. *Cell* **79:** 1069-1080

Rutz HP, de Tribolet N, Calmes JM, Chapuis G (1991) Long-time survival of a patient with glioblastoma and Turcot's syndrome. Case report. *J Neurosurg* **74:** 813-815

Saeterdal I, Bjorheim J, Lislerud K, Gjertsen MK, Bukholm IK, Olsen OC, Nesland JM, Eriksen JA, Moller M, Lindblom A, Gaudernack G (2001) Frameshift-mutation-derived peptides as tumor-specific antigens in inherited and spontaneous colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98:** 13255-13260

Saffhill R, Margison GP, O'Connor PJ (1985) Mechanisms of carcinogenesis induced by alkylating agents. *Biochim Biophys Acta* **823:** 111-145

Sanada M, Takagi Y, Ito R, Sekiguchi M (2004) Killing and mutagenic actions of dacarbazine, a chemotherapeutic alkylating agent, on human and mouse cells: effects of Mgmt and Mlh1 mutations. *DNA Repair (Amst)* **3:** 413-420

Schlagman SL, Hattman S, Marinus MG (1986) Direct role of the Escherichia coli Dam DNA methyltransferase in methylation-directed mismatch repair. *J Bacteriol* **165:** 896-900

Schmutte C, Sadoff MM, Shim KS, Acharya S, Fishel R (2001) The interaction of DNA mismatch repair proteins with human exonuclease I. *J Biol Chem* **276:** 33011-33018

Schulmann K, Mori Y, Croog V, Yin J, Olaru A, Sterian A, Sato F, Wang S, Xu Y, Deacu E, Berki AT, Hamilton JP, Kan T, Abraham JM, Schmiegel W, Harpaz N, Meltzer SJ (2005) Molecular phenotype of inflammatory bowel disease-associated neoplasms with microsatellite instability. *Gastroenterology* **129:** 74-85

Schwitalle Y, Kloor M, Eiermann S, Linnebacher M, Kienle P, Knaebel HP, Tariverdian M, Benner A, von Knebel Doeberitz M (2008) Immune response against frameshift-induced neopeptides in HNPCC patients and healthy HNPCC mutation carriers. *Gastroenterology* **134:** 988-997

Scott RH, Homfray T, Huxter NL, Mitton SG, Nash R, Potter MN, Lancaster D, Rahman N (2007a) Familial T-cell non-Hodgkin lymphoma caused by biallelic MSH2 mutations. *Journal of medical genetics* **44:** e83

Scott RH, Mansour S, Pritchard-Jones K, Kumar D, MacSweeney F, Rahman N (2007b) Medulloblastoma, acute myelocytic leukemia and colonic carcinomas in a child with biallelic MSH6 mutations. *Nat Clin Pract Oncol* **4:** 130-134

Senter L, Clendenning M, Sotamaa K, Hampel H, Green J, Potter JD, Lindblom A, Lagerstedt K, Thibodeau SN, Lindor NM, Young J, Winship I, Dowty JG, White DM, Hopper JL, Baglietto L, Jenkins MA, de la Chapelle A (2008) The clinical phenotype of Lynch syndrome due to germ-line PMS2 mutations. *Gastroenterology* **135:** 419-428

Shen L, Kondo Y, Rosner GL, Xiao L, Hernandez NS, Vilaythong J, Houlihan PS, Krouse RS, Prasad AR, Einspahr JG, Buckmeier J, Alberts DS, Hamilton SR, Issa JP (2005) MGMT promoter methylation and field defect in sporadic colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **97:** 1330-1338

Shia J (2008) Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part I. The utility of immunohistochemistry. *J Mol Diagn* **10:** 293-300

Shukla SJ, Duan S, Badner JA, Wu X, Dolan ME (2008) Susceptibility loci involved in cisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis. *Pharmacogenet Genomics* **18:** 253-262

Siddikuzzaman, Guruvayoorappan C, Berlin Grace VM (2011) All trans retinoic acid and cancer. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **33:** 241-249

Sie L, Loong S, Tan EK (2009) Utility of lymphoblastoid cell lines. *J Neurosci Res* **87:** 1953-1959

Sijmons RH, Greenblatt MS, Genuardi M (2013) Gene variants of unknown clinical significance in Lynch syndrome. An introduction for clinicians. *Fam Cancer* **12:** 181-187

Silman AJ, Petrie J, Hazleman B, Evans SJ (1988) Lymphoproliferative cancer and other malignancy in patients with rheumatoid arthritis treated with azathioprine: a 20 year follow up study. *Ann Rheum Dis* **47:** 988-992

Simpkins SB, Bocker T, Swisher EM, Mutch DG, Gersell DJ, Kovatich AJ, Palazzo JP, Fishel R, Goodfellow PJ (1999) MLH1 promoter methylation and gene silencing is the primary cause of microsatellite instability in sporadic endometrial cancers. *Hum Mol Genet* **8:** 661-666

Sinicrope FA, Sargent DJ (2012) Molecular pathways: microsatellite instability in colorectal cancer: prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Clin Cancer Res* **18:** 1506-1512

Sjursen W, Bjornevoll I, Engebretsen LF, Fjelland K, Halvorsen T, Myrvold HE (2009) A homozygote splice site PMS2 mutation as cause of Turcot syndrome gives rise to two different abnormal transcripts. *Fam Cancer* **8:** 179-186

Smith MA, Parkinson DR, Cheson BD, Friedman MA (1992) Retinoids in cancer therapy. *J Clin Oncol* **10:** 839-864

Smits R, Hofland N, Edelmann W, Geugien M, Jagmohan-Changur S, Albuquerque C, Breukel C, Kucherlapati R, Kielman MF, Fodde R (2000) Somatic Apc mutations are selected upon their capacity to inactivate the beta-catenin downregulating activity. *Genes Chromosomes Cancer* **29:** 229-239

Smyrk TC, Watson P, Kaul K, Lynch HT (2001) Tumor-infiltrating lymphocytes are a marker for microsatellite instability in colorectal carcinoma. *Cancer* **91:** 2417-2422

Sporn MB, Dunlop NM, Newton DL, Smith JM (1976) Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). *Fed Proc* **35:** 1332-1338

Sporn MB, Roberts AB (1991) Interactions of retinoids and transforming growth factor-beta in regulation of cell differentiation and proliferation. *Mol Endocrinol* **5:** 3-7

Stark AL, Zhang W, Mi S, Duan S, O'Donnell PH, Huang RS, Dolan ME (2010) Heritable and non-genetic factors as variables of pharmacologic phenotypes in lymphoblastoid cell lines. *Pharmacogenomics J* **10:** 505-512

Stepkowski SM (2000) Molecular targets for existing and novel immunosuppressive drugs. *Expert Rev Mol Med* **2:** 1-23

Stojic L, Brun R, Jiricny J (2004a) Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA Repair (Amst)* **3:** 1091-1101

Stojic L, Mojas N, Cejka P, Di Pietro M, Ferrari S, Marra G, Jiricny J (2004b) Mismatch repair-dependent G2 checkpoint induced by low doses of SN1 type methylating agents requires the ATR kinase. *Genes Dev* **18:** 1331-1344

Stone EA, Sidow A (2005) Physicochemical constraint violation by missense substitutions mediates impairment of protein function and disease severity. *Genome research* **15:** 978-986

Su SS, Grilley M, Thresher R, Griffith J, Modrich P (1989) Gap formation is associated with methyl-directed mismatch correction under conditions of restricted DNA synthesis. *Genome* **31:** 104-111

Suraweera N, Duval A, Reperant M, Vaury C, Furlan D, Leroy K, Seruca R, Iacopetta B, Hamelin R (2002) Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology* **123:** 1804-1811

Suzuki H, Harpaz N, Tarmin L, Yin J, Jiang HY, Bell JD, Hontanosas M, Groisman GM, Abraham JM, Meltzer SJ (1994) Microsatellite instability in ulcerative colitis-associated colorectal dysplasias and cancers. *Cancer research* **54:** 4841-4844

Svrcek M, Buhard O, Colas C, Coulet F, Dumont S, Massaoudi I, Lamri A, Hamelin R, Cosnes J, Oliveira C, Seruca R, Gaub MP, Legrain M, Collura A, Lascols O, Tiret E, Flejou JF, Duval A (2010) Methylation tolerance due to an O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) field defect in the colonic mucosa: an initiating step in the development of mismatch repair-deficient colorectal cancers. *Gut* **59:** 1516-1526

Svrcek M, El-Bchiri J, Chalastanis A, Capel E, Dumont S, Buhard O, Oliveira C, Seruca R, Bossard C, Mosnier JF, Berger F, Leteurtre E, Lavergne-Slove A, Chenard MP, Hamelin R, Cosnes J, Beaugerie L, Tiret E, Duval A, Flejou JF (2007) Specific clinical and biological features characterize inflammatory bowel disease associated colorectal cancers showing microsatellite instability. *J Clin Oncol* **25:** 4231-4238

Swann PF, Waters TR, Moulton DC, Xu YZ, Zheng Q, Edwards M, Mace R (1996) Role of postreplicative DNA mismatch repair in the cytotoxic action of thioguanine. *Science* **273:** 1109-1111

Taketo MM, Edelmann W (2009) Mouse models of colon cancer. *Gastroenterology* **136:** 780-798

Takeuchi S, Seriu T, Tasaka T, Koike M, Cho SK, Park S, Slater J, Mufti I, Hatta Y, Miyoshi I, Bartram CR, Koeffler HP (1997) Microsatellite instability and other molecular abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* **98:** 134-139

Tang XH, Gudas LJ (2011) Retinoids, retinoic acid receptors, and cancer. *Annu Rev Pathol* **6:** 345-364

Tasaka T, Lee S, Spira S, Takeuchi S, Nagai M, Takahara J, Koeffler HP (1997) Microsatellite instability during the progression of acute myelocytic leukaemia. *Br J Haematol* **98:** 219-221

Tavtigian SV, Byrnes GB, Goldgar DE, Thomas A (2008) Classification of rare missense substitutions, using risk surfaces, with genetic- and molecular-epidemiology applications. *Human mutation* **29:** 1342-1354

Tavtigian SV, Deffenbaugh AM, Yin L, Judkins T, Scholl T, Samollow PB, de Silva D, Zharkikh A, Thomas A (2006) Comprehensive statistical study of 452 BRCA1 missense substitutions with classification of eight recurrent substitutions as neutral. *Journal of medical genetics* **43:** 295-305

Thibodeau SN, Bren G, Schaid D (1993) Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* **260:** 816-819

Thompson BA, Goldgar DE, Paterson C, Clendenning M, Walters R, Arnold S, Parsons MT, Michael DW, Gallinger S, Haile RW, Hopper JL, Jenkins MA, Lemarchand L, Lindor NM, Newcomb PA, Thibodeau SN, Young JP, Buchanan DD, Tavtigian SV, Spurdle AB (2013) A multifactorial likelihood model for MMR gene variant classification incorporating probabilities based on sequence bioinformatics and tumor characteristics: a report from the Colon Cancer Family Registry. *Human mutation* **34:** 200-209

Tishkoff DX, Boerger AL, Bertrand P, Filosi N, Gaida GM, Kane MF, Kolodner RD (1997) Identification and characterization of Saccharomyces cerevisiae EXO1, a gene encoding an exonuclease that interacts with MSH2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94:** 7487-7492

Tiu J, Li H, Rassekh C, van der Sloot P, Kovach R, Zhang P (2006) Molecular basis of posttransplant squamous cell carcinoma: the potential role of cyclosporine a in carcinogenesis. *Laryngoscope* **116:** 762-769

Toledano H, Goldberg Y, Kedar-Barnes I, Baris H, Porat RM, Shochat C, Bercovich D, Pikarsky E, Lerer I, Yaniv I, Abeliovich D, Peretz T (2009) Homozygosity of MSH2 c.1906G-->C germline mutation is associated with childhood colon cancer, astrocytoma and signs of Neurofibromatosis type I. *Fam Cancer* **8:** 187-194

Torre D (1968) Multiple sebaceous tumors. *Arch Dermatol* **98:** 549-551

Tran PT, Simon JA, Liskay RM (2001) Interactions of Exo1p with components of MutLalpha in Saccharomyces cerevisiae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98:** 9760-9765

Truninger K, Menigatti M, Luz J, Russell A, Haider R, Gebbers JO, Bannwart F, Yurtsever H, Neuweiler J, Riehle HM, Cattaruzza MS, Heinimann K, Schar P, Jiricny J, Marra G (2005) Immunohistochemical analysis reveals high frequency of PMS2 defects in colorectal cancer. *Gastroenterology* **128:** 1160-1171

Turcot J, Despres JP, St Pierre F (1959) Malignant tumors of the central nervous system associated with familial polyposis of the colon: report of two cases. *Dis Colon Rectum* **2:** 465-468

Ulrich C, Stockfleth E (2007) Azathioprine, UV light, and skin cancer in organ transplant patients--do we have an answer? *Nephrol Dial Transplant* **22:** 1027-1029

Umar A (2006) Lynch syndrome (HNPCC) and microsatellite instability analysis guidelines. *Cancer Biomark* **2:** 1-4

Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Ruschoff J, Fishel R, Lindor NM, Burgart LJ, Hamelin R, Hamilton SR, Hiatt RA, Jass J, Lindblom A, Lynch HT, Peltomaki P, Ramsey SD, Rodriguez-Bigas MA, Vasen HF, Hawk ET, Barrett JC, Freedman AN, Srivastava S (2004) Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *Journal of the National Cancer Institute* **96:** 261-268

Umar A, Buermeyer AB, Simon JA, Thomas DC, Clark AB, Liskay RM, Kunkel TA (1996) Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. *Cell* **87:** 65-73

van der Klift H, Wijnen J, Wagner A, Verkuilen P, Tops C, Otway R, Kohonen-Corish M, Vasen H, Oliani C, Barana D, Moller P, Delozier-Blanchet C, Hutter P, Foulkes W, Lynch H, Burn J, Moslein G, Fodde R (2005) Molecular characterization of the spectrum of genomic deletions in the mismatch repair genes MSH2, MLH1, MSH6, and PMS2 responsible for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Genes Chromosomes Cancer* **44:** 123-138

Vasen HF, Ghorbanoghli Z, Bourdeaut F, Cabaret O, Caron O, Duval A, Entz-Werle N, Goldberg Y, Ilencikova D, Kratz CP, Lavoine N, Loeffen J, Menko FH, Muleris M, Sebille G, Colas C, Burkhardt B, Brugieres L, Wimmer K (2014) Guidelines for surveillance of individuals with constitutional mismatch repair-deficiency proposed by the European Consortium "Care for CMMRD" (C4CMMRD). *Journal of medical genetics* **51:** 283-293

Vasen HF, Moslein G, Alonso A, Bernstein I, Bertario L, Blanco I, Burn J, Capella G, Engel C, Frayling I, Friedl W, Hes FJ, Hodgson S, Mecklin JP, Moller P, Nagengast F, Parc Y, Renkonen-Sinisalo L, Sampson JR, Stormorken A, Wijnen J (2007) Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer). *Journal of medical genetics* **44:** 353-362

Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT (1999) New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* **116:** 1453-1456

Vaughn CP, Robles J, Swensen JJ, Miller CE, Lyon E, Mao R, Bayrak-Toydemir P, Samowitz WS (2010) Clinical analysis of PMS2: mutation detection and avoidance of pseudogenes. *Human mutation* **31:** 588-593

Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, Ma AH, Lutterbaugh JD, Periyasamy S, Li GM, Drummond J, Modrich PL, Sedwick WD, Markowitz SD (1998) Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95:** 8698-8702

Verma L, Kane MF, Brassett C, Schmeits J, Evans DG, Kolodner RD, Maher ER (1999) Mononucleotide microsatellite instability and germline MSH6 mutation analysis in early onset colorectal cancer. *Journal of medical genetics* **36:** 678-682

Vilkki S, Tsao JL, Loukola A, Poyhonen M, Vierimaa O, Herva R, Aaltonen LA, Shibata D (2001) Extensive somatic microsatellite mutations in normal human tissue. *Cancer research* **61:** 4541-4544

Viswanathan M, Burdett V, Baitinger C, Modrich P, Lovett ST (2001) Redundant exonuclease involvement in Escherichia coli methyl-directed mismatch repair. *J Biol Chem* **276:** 31053-31058

Vo AT, Zhu F, Wu X, Yuan F, Gao Y, Gu L, Li GM, Lee TH, Her C (2005) hMRE11 deficiency leads to microsatellite instability and defective DNA mismatch repair. *EMBO Rep* **6:** 438-444

Volpe G, Gamberi B, Pastore C, Roetto A, Pautasso M, Parvis G, Camaschella C, Mazza U, Saglio G, Gaidano G (1996) Analysis of microsatellite instability in chronic lymphoproliferative disorders. *Ann Hematol* **72:** 67-71

Wagner R, Jr., Meselson M (1976) Repair tracts in mismatched DNA heteroduplexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73:** 4135-4139

Wahlberg SS, Schmeits J, Thomas G, Loda M, Garber J, Syngal S, Kolodner RD, Fox E (2002) Evaluation of microsatellite instability and immunohistochemistry for the prediction of germ-line MSH2 and MLH1 mutations in hereditary nonpolyposis colon cancer families. *Cancer research* **62:** 3485-3492

Wang Q, Lasset C, Desseigne F, Frappaz D, Bergeron C, Navarro C, Ruano E, Puisieux A (1999a) Neurofibromatosis and early onset of cancers in hMLH1-deficient children. *Cancer research* **59:** 294-297

Wang TF, Kleckner N, Hunter N (1999b) Functional specificity of MutL homologs in yeast: evidence for three Mlh1-based heterocomplexes with distinct roles during meiosis in recombination and mismatch correction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96:** 13914-13919

Wang X, Hutt-Fletcher LM (1998) Epstein-Barr virus lacking glycoprotein gp42 can bind to B cells but is not able to infect. *J Virol* **72:** 158-163

Wang X, Kenyon WJ, Li Q, Mullberg J, Hutt-Fletcher LM (1998) Epstein-Barr virus uses different complexes of glycoproteins gH and gL to infect B lymphocytes and epithelial cells. *J Virol* **72:** 5552-5558

Warren DJ, Andersen A, Slordal L (1995) Quantitation of 6-thioguanine residues in peripheral blood leukocyte DNA obtained from patients receiving 6-mercaptopurine-based maintenance therapy. *Cancer research* **55:** 1670-1674

Waters TR, Swann PF (1997) Cytotoxic mechanism of 6-thioguanine: hMutSalpha, the human mismatch binding heterodimer, binds to DNA containing S6-methylthioguanine. *Biochemistry* **36:** 2501-2506

Watson P, Vasen HF, Mecklin JP, Bernstein I, Aarnio M, Jarvinen HJ, Myrhoj T, Sunde L, Wijnen JT, Lynch HT (2008) The risk of extra-colonic, extra-endometrial cancer in the Lynch syndrome. *Int J Cancer* **123:** 444-449

Wedge SR, Newlands ES (1996) O6-benzylguanine enhances the sensitivity of a glioma xenograft with low O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity to temozolomide and BCNU. *Br J Cancer* **73:** 1049-1052

Wei K, Clark AB, Wong E, Kane MF, Mazur DJ, Parris T, Kolas NK, Russell R, Hou H, Jr., Kneitz B, Yang G, Kunkel TA, Kolodner RD, Cohen PE, Edelmann W (2003) Inactivation of Exonuclease 1 in mice results in DNA mismatch repair defects, increased cancer susceptibility, and male and female sterility. *Genes Dev* **17:** 603-614

Welsh KM, Lu AL, Clark S, Modrich P (1987) Isolation and characterization of the Escherichia coli mutH gene product. *J Biol Chem* **262:** 15624-15629

Welsh M, Mangravite L, Medina MW, Tantisira K, Zhang W, Huang RS, McLeod H, Dolan ME (2009) Pharmacogenomic discovery using cell-based models. *Pharmacol Rev* **61:** 413-429

Wen Y, Gorsic LK, Wheeler HE, Ziliak DM, Huang RS, Dolan ME (2011) Chemotherapeutic-induced apoptosis: a phenotype for pharmacogenomics studies. *Pharmacogenet Genomics* **21:** 476-488

Wernstedt A, Valtorta E, Armelao F, Togni R, Girlando S, Baudis M, Heinimann K, Messiaen L, Staehli N, Zschocke J, Marra G, Wimmer K (2012) Improved multiplex ligation-dependent probe amplification analysis identifies a deleterious PMS2 allele generated by recombination with crossover between PMS2 and PMS2CL. *Genes Chromosomes Cancer* **51:** 819-831

Whiteside D, McLeod R, Graham G, Steckley JL, Booth K, Somerville MJ, Andrew SE (2002) A homozygous germ-line mutation in the human MSH2 gene predisposes to hematological malignancy and multiple cafe-au-lait spots. *Cancer research* **62:** 359-362

Wielders EA, Hettinger J, Dekker R, Kets CM, Ligtenberg MJ, Mensenkamp AR, van den Ouweland AM, Prins J, Wagner A, Dinjens WN, Dubbink HJ, van Hest LP, Menko F, Hogervorst F, Verhoef S, te Riele H (2014) Functional analysis of MSH2 unclassified variants found in suspected Lynch syndrome patients reveals pathogenicity due to attenuated mismatch repair. *Journal of medical genetics* **51:** 245-253

Wijnen J, de Leeuw W, Vasen H, van der Klift H, Moller P, Stormorken A, Meijers-Heijboer H, Lindhout D, Menko F, Vossen S, Moslein G, Tops C, Brocker-Vriends A, Wu Y, Hofstra R, Sijmons R, Cornelisse C, Morreau H, Fodde R (1999) Familial endometrial cancer in female carriers of MSH6 germline mutations. *Nat Genet* **23:** 142-144

Wildenberg J, Meselson M (1975) Mismatch repair in heteroduplex DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72:** 2202-2206

Will O, Carvajal-Carmona LG, Gorman P, Howarth KM, Jones AM, Polanco-Echeverry GM, Chinaleong JA, Gunther T, Silver A, Clark SK, Tomlinson I (2007) Homozygous PMS2 deletion causes a severe colorectal cancer and multiple adenoma phenotype without extraintestinal cancer. *Gastroenterology* **132:** 527-530

Willenbucher RF, Aust DE, Chang CG, Zelman SJ, Ferrell LD, Moore DH, 2nd, Waldman FM (1999) Genomic instability is an early event during the progression pathway of ulcerative-colitis-related neoplasia. *Am J Pathol* **154:** 1825-1830

Wimmer K, Etzler J (2008) Constitutional mismatch repair-deficiency syndrome: have we so far seen only the tip of an iceberg? *Hum Genet* **124:** 105-122

Wimmer K, Kratz CP, Vasen HF, Caron O, Colas C, Entz-Werle N, Gerdes AM, Goldberg Y, Ilencikova D, Muleris M, Duval A, Lavoine N, Ruiz-Ponte C, Slavc I, Burkhardt B, Brugieres L (2014) Diagnostic criteria for constitutional mismatch repair deficiency syndrome: suggestions of the European consortium 'care for CMMRD' (C4CMMRD). *Journal of medical genetics* **51:** 355-365

Winand NJ, Panzer JA, Kolodner RD (1998) Cloning and characterization of the human and Caenorhabditis elegans homologs of the Saccharomyces cerevisiae MSH5 gene. *Genomics* **53:** 69-80

Wisgerhof HC, Hameetman L, Tensen CP, Morreau H, de Fijter JW, Bouwes Bavinck JN, Willemze R, de Gruijl FR (2009) Azathioprine-induced microsatellite instability is not observed in skin carcinomas of organ transplant recipients. *J Invest Dermatol* **129:** 1307-1309

Wistinghausen B, Gross TG, Bollard C (2013) Post-transplant lymphoproliferative disease in pediatric solid organ transplant recipients. *Pediatr Hematol Oncol* **30:** 520-531

Wojciechowicz K, Cantelli E, Van Gerwen B, Plug M, Van Der Wal A, Delzenne-Goette E, Song JY, De Vries S, Dekker M, Te Riele H (2014) Temozolomide increases the number of MMR-deficient intestinal crypts and accelerates tumorigenesis in a mouse model of Lynch syndrome. *Gastroenterology*

Wolf B, Gruber S, Henglmueller S, Kappel S, Bergmann M, Wrba F, Karner-Hanusch J (2006) Efficiency of the revised Bethesda guidelines (2003) for the detection of mutations in mismatch repair genes in Austrian HNPCC patients. *Int J Cancer* **118:** 1465-1470

Wu Y, Berends MJ, Post JG, Mensink RG, Verlind E, Van Der Sluis T, Kempinga C, Sijmons RH, van der Zee AG, Hollema H, Kleibeuker JH, Buys CH, Hofstra RM (2001) Germline mutations of EXO1 gene

in patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) and atypical HNPCC forms. *Gastroenterology* **120:** 1580-1587

Xie Y, Counter C, Alani E (1999) Characterization of the repeat-tract instability and mutator phenotypes conferred by a Tn3 insertion in RFC1, the large subunit of the yeast clamp loader. *Genetics* **151:** 499-509

Yamane K, Taylor K, Kinsella TJ (2004) Mismatch repair-mediated G2/M arrest by 6-thioguanine involves the ATR-Chk1 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **318:** 297-302

Yan T, Desai AB, Jacobberger JW, Sramkoski RM, Loh T, Kinsella TJ (2004) CHK1 and CHK2 are differentially involved in mismatch repair-mediated 6-thioguanine-induced cell cycle checkpoint responses. *Mol Cancer Ther* **3:** 1147-1157

Yang G, Scherer SJ, Shell SS, Yang K, Kim M, Lipkin M, Kucherlapati R, Kolodner RD, Edelmann W (2004) Dominant effects of an Msh6 missense mutation on DNA repair and cancer susceptibility. *Cancer Cell* **6:** 139-150

Yang W (2007) Human MutLalpha: the jack of all trades in MMR is also an endonuclease. *DNA Repair (Amst)* **6:** 135-139

Yao X, Buermeyer AB, Narayanan L, Tran D, Baker SM, Prolla TA, Glazer PM, Liskay RM, Arnheim N (1999) Different mutator phenotypes in Mlh1- versus Pms2-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96:** 6850-6855

York SJ, Modrich P (2006) Mismatch repair-dependent iterative excision at irreparable O6-methylguanine lesions in human nuclear extracts. *J Biol Chem* **281:** 22674-22683

Yoshimoto K, Mizoguchi M, Hata N, Murata H, Hatae R, Amano T, Nakamizo A, Sasaki T (2012) Complex DNA repair pathways as possible therapeutic targets to overcome temozolomide resistance in glioblastoma. *Front Oncol* **2:** 186

Yoshioka K, Yoshioka Y, Hsieh P (2006) ATR kinase activation mediated by MutSalpha and MutLalpha in response to cytotoxic O6-methylguanine adducts. *Mol Cell* **22:** 501-510

Young LS, Murray PG (2003) Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene* **22:** 5108-5121

Young LS, Rickinson AB (2004) Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* **4:** 757-768

Zhang L (2008) Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part II. The utility of microsatellite instability testing. *J Mol Diagn* **10:** 301-307

Zhang Y, Yuan F, Presnell SR, Tian K, Gao Y, Tomkinson AE, Gu L, Li GM (2005) Reconstitution of 5'-directed human mismatch repair in a purified system. *Cell* **122:** 693-705

Zhu YM, Das-Gupta EP, Russell NH (1999) Microsatellite instability and p53 mutations are associated with abnormal expression of the MSH2 gene in adult acute leukemia. *Blood* **94:** 733-740

Zijno A, Porcedda P, Saini F, Allione A, Garofalo B, Marcon F, Guarrera S, Turinetto V, Minieri V, Funaro A, Crebelli R, Giachino C, Matullo G (2010) Unsuitability of lymphoblastoid cell lines as surrogate of cryopreserved isolated lymphocytes for the analysis of DNA double-strand break repair activity. *Mutation research* **684:** 98-105

Résumé

L'inactivation du système MMR (*mismatch repair* ou réparation des mésappariements de bases de l'ADN) favorise un processus oncogénique d'instabilité des séquences répétées microsatellites du génome (MSI, *microsatellite instability*). Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à l'induction d'un processus MSI d'une part dans un modèle murin, afin de démontrer l'impact oncogénique de l'azathioprine (Aza), un immunosuppresseur fréquemment utilisé en clinique; et d'autre part, dans un modèle cellulaire de lignées lymphoblastoïdes, dans le but d'améliorer le diagnostic du syndrome CMMRD (*constitutional MMR deficiency*), un syndrome rare de prédisposition aux cancers MSI.

Des études ont rapporté une association entre la prise d'Aza au long terme, et l'émergence de tumeurs MSI rares et tardives, chez les patients. Cette molécule a une toxicité cellulaire médiée par l'activité du système MMR et conduit, à forte dose, à une induction massive de tumeurs MSI chez des souris génétiquement prédisposées à ce type de cancer. Dans cette partie de mon travail, j'ai cherché à évaluer précisément le risque lié à la prise d'Aza, en comparaison avec la ciclosporine A, un immunosuppresseur dont le mode d'action est indépendant du système MMR, pour l'induction de tumeurs MSI iatrogènes. Au cours d'une étude dose-réponse, j'ai pu observer l'émergence de rares lymphomes MSI, de survenue tardive, chez la souris de génotype sauvage traitée par l'Aza, mais pas par la ciclosporine A. Au total, mes résultats permettent d'établir *in vivo* que l'Aza est un facteur risque pour l'émergence de tumeurs MSI, qui persiste en l'absence de prédisposition à ce type tumoral (souris de génotype sauvage) dans le contexte d'une exposition prolongée au traitement, à l'instar de ce qui est observé chez les patients traités au long cours avec cette molécule.

Dans le deuxième axe de ma thèse, je me suis intéressée au syndrome CMMRD, une prédisposition majeure à la survenue précoce de cancers MSI (hémopathies, tumeurs cérébrales, coliques, …). Les patients atteints sont porteurs de mutations germinales bialléliques d'un gène MMR, et sont diagnostiqués grâce à l'analyse génétique constitutionnelle, une méthode insatisfaisante qui s'avère non contributive en cas de détection de variants de signification biologique inconnue. Dans ce contexte, j'ai développé une méthode fonctionnelle de dépistage du syndrome CMMRD chez les sujets à risque. Elle repose sur l'hypothèse que deux caractéristiques phénotypiques déjà rapportées dans les cellules tumorales MMR-déficientes, le phénotype MSI et la tolérance à certains agents génotoxiques, sont également présentes dans les tissus sains de patients CMMRD (cellules lymphoïdes en culture). Au total, mes travaux proposent une approche fonctionnelle, non invasive, sensible et spécifique pour le diagnostic des patients CMMRD, qui est susceptible de répondre aux limites de l'analyse génétique constitutionnelle.

Mots clés : mismatch repair, instabilité des microsatellites, cancer, syndrome CMMRD, test diagnostique, azathioprine.