

**UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE PHARMACIE**

ANNEE 2005

**MEMOIRE
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE
BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu devant le Jury interrégional

Le 24 Mars 2005

Par Mme Aurélie VIGNE-AGUINET

**Conformément aux dispositions de l'arrêté
Du 23 Janvier 2003 tient lieu de :**

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**IMPLICATION DU GENE MYH DANS LES
POLYPOSES ADENOMATEUSES FAMILIALES**

**Président : Monsieur le Professeur J-M. BARD
Faculté de Pharmacie de Nantes**
Directeur de thèse : Madame le Professeur V. DAVID, Université de Rennes I
Membres du Jury : Monsieur le Professeur J-F. BRETAGNE, Université de Rennes I
Madame le Docteur C. DUGAST, Génétique médicale,
C.H.U. Hôpital Sud, Rennes

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	4
GENERALITES	6
I- LES POLYPES RECTOCOLIQUES	7
1- Aspects histologiques d'un polype	7
a- Le polype adénomateux	7
b- Le polype hyperplasique	7
c- Le polype hamartomateux	8
d- Le pseudo-polype inflammatoire	8
2- Filiation adénome-cancer	8
3- Dépistage des adénomes	9
a- Circonstances de découverte	9
b- Niveaux de risque de cancer colorectal	9
c- Indications du dépistage des polypes	10
4- Conduite à tenir lors de la découverte de polypes	11
II- LES PAF ET LE GENE APC	12
1- Eléments cliniques	12
2- Le gène APC	13
a- Description du gène APC	13
b- Mutations germinales	13
c- Mutations somatiques	15
d- La protéine APC	15
III- LE GENE MYH ET LES POLYPOSES ADENOMATEUSES	18
1- Les systèmes de réparation de l'ADN	18
a- La réparation des mésappariements	18
b- L'excision-réparation des nucléotides (NER)	19
c- L'excision-réparation de bases (BER)	20
2- Découverte de l'implication du gène MYH dans les polyposes adénomateuses	22
3- Structure du gène MYH	25
4- Structure de la protéine MYH	25
5- Synthèse de différentes études sur les mutations du gène MYH :	27
6- Prévalence des mutations du gène MYH dans les cancers colorectaux	32
7- Incidence des mutations germinales du gène MYH sur le gène k-ras	34

PATIENTS, MATERIELS, ET METHODES	35
I- PATIENTS	36
II- MATERIELS ET METHODES	37
1- Extraction de l'ADN génomique	37
a- Lyse des globules rouges	37
b- Lyse des globules blancs	37
c- Déprotéinisation	38
d- Précipitation de l'ADN	38
2- Amplification génique par PCR	38
a- Principe	38
b- La réaction	39
c- Les cycles d'amplification	40
d- Facteurs influençant la réaction	42
e- Conditions d'amplification pour les exons 7 et 13	43
f- Contrôle de l'amplification	45
3- Analyse de restriction	46
a- Principe	46
b- Coupure enzymatique de l'exon 7	47
c- Coupure enzymatique de l'exon 13	50
4- Séquençage du gène <i>MYH</i>	53
a- Principe	53
b- Le milieu réactionnel	54
c- Séquençage des 16 exons du gène <i>MYH</i>	55
➤ Amplification du gène <i>MYH</i>	55
➤ Séquençage des produits d'amplification	57
RESULTATS, DISCUSSION	60
I- RESULTATS	61
1- Coupure enzymatique de l'exon 7	61
2- Coupure enzymatique de l'exon 13	62
3- Séquençage du gène <i>MYH</i>	63
II- DISCUSSION	65
ANNEXE	69
BIBLIOGRAPHIE	73

INTRODUCTION

En France, le cancer colorectal (CCR) est le plus fréquent des cancers dans l'ensemble de la population. Il représente environ 15 % des nouveaux cas de cancers par an. 60 à 80 % des CCR résultent de la transformation d'une lésion préexistante, le polype adénomateux, qui est une tumeur épithéliale bénigne.

On estime que 15 à 20 % des CCR ont une origine génétique. Deux maladies de transmission autosomale dominante ont été identifiées (Kinzler KW. et al., 1996 ; Denis MG. et al., 1995)

- **La polypose adénomateuse familiale (PAF)**, qui est responsable de moins de 1 % des cancers colorectaux. Une mutation constitutionnelle est identifiée sur le gène *APC* dans environ 85% des cas.
- **Les cancers héréditaires sans polypose (HNPCC)**, qui représentent 1 à 5 % des cancers colorectaux : la mutation constitutionnelle porte sur l'un des gènes impliqués dans la réparation des mésappariements de l'ADN (*MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *PMS1* et *PMS2*).

Un nouveau gène a récemment été impliqué dans la survenue de polypes adénomateux et de cancers colorectaux. Il s'agit du gène *MYH*, gène de réparation de l'ADN. Le phénotype de la maladie associée à des mutations de ce gène semble être très proche du phénotype des polyposes adénomateuses familiales, mais le mode de transmission est récessif, ce qui modifie le conseil génétique, et la prise en charge des membres d'une même famille.

Notre travail a porté sur la recherche de mutations du gène *MYH* chez 29 patients atteints de polypose colique adressés au laboratoire pour une recherche de mutation dans le gène *APC* qui s'est avérée négative.

GENERALITES

I- LES POLYPES RECTOCOLIQUES

Le polype rectocolique est une tumeur de petite taille en relief dans la lumière intestinale, de type histologique variable. Le risque d'un polype est de se transformer en lésion cancéreuse. Un tiers de la population est porteur d'un polype adénomateux avant l'âge de 65 ans. Sur 1000 adénomes, 100 atteindront la taille de 1 cm, et 25 deviendront des cancers dans un délai de 10 à 20 ans.

1- Aspects histologiques d'un polype :

Il existe quatre variétés de polypes rectocoliques bénins :

a- **Le polype adénomateux** : encore appelé polyadénome, ou adénome, c'est le plus fréquent des polypes, et celui qui risque de se transformer en cancer.

Il est dû à une prolifération des cellules des cryptes de Lieberkühn.

Trois types histologiques différents sont individualisés selon la classification O.M.S. :

. L'adénome tubuleux : 75 %

. L'adénome tubulovilleux : 20 %

. L'adénome villeux : 5 %

b- **Le polype hyperplasique** : petite formation de 1 à 3 mm qui se présente comme un simple allongement des cryptes glandulaires.

c- **Le polype hamartomateux** : de petit volume, il est formé de glandes dilatées hypersécrétantes, responsables de formations kystiques.

d- **Le pseudo-polype inflammatoire** : formé de muqueuse et de tissu de granulation.

2- Filiation adénome-cancer :

Les adénomes sont le plus souvent latents, sans traduction clinique, mais le risque de transformation en cancer est réel et justifie un dépistage et un traitement adapté au stade où la malignité est encore absente.

La grande majorité des cancers colorectaux, 60 à 80 %, résulte de la transformation d'un polype adénomateux.

Le risque de cancérisation est fonction de plusieurs éléments :

- La taille : le pourcentage de dégénérescence, de l'ordre de 2 % pour les lésions inférieures à 1 cm, s'élève à 50 % pour celles supérieures à 2 cm.
- Le nombre d'adénomes
- Le type histologique : le risque est plus élevé, de l'ordre de 15 à 20 %, pour un adénome villositéux. Il est de l'ordre de 1 à 5 % pour les adénomes tubuleux

3- Dépistage des adénomes :

La détection et l'exérèse des adénomes permettent de réduire le risque de cancer colorectal.

a- Circonstances de découverte :

Le plus souvent latents, les adénomes restent asymptomatiques pendant de nombreuses années. Ils sont découverts à l'occasion d'examens effectués pour rectorragies, ou anémie ferriprive, pour crise douloureuse intestinale avec ou sans trouble du transit, pour recherche positive de sang dans les selles, ou pour dépistage chez un sujet à haut risque de cancer colorectal.

b- Niveaux de risque de cancer colorectal :

Trois niveaux de risques de cancer colorectal sont identifiés dans la population :

- Le niveau moyen : Le risque moyen de la population dans son ensemble d'avoir un cancer colorectal avant l'âge de 74 ans est estimé à 3.5 %.
- Le niveau élevé : La population à haut risque de cancer colorectal comprend les patients ayant des antécédents personnels d'adénome ou de cancer colorectal, les sujets ayant un ou plusieurs parents du premier degré (parent, fratrie, enfant) atteint de cancer colorectal ou d'un adénome de plus de 1 cm, et les sujets atteints de rectocolite ulcéro-hémorragique ou de maladie de Crohn.

- Le niveau le plus élevé concerne les sujets appartenant à une famille atteinte de cancers à transmission héréditaire : la polypose adénomateuse familiale (PAF), les cancers héréditaires sans polypose (HNPCC), et autres polyposes avec risque de cancer colorectal (Polyposes juvéniles et Peutz-Jeghers). Un peu moins de 1 % des cancers colorectaux sont dus à la PAF, 1 à 5 % des cancers colorectaux sont des cancers héréditaires sans polypose.

c- Indications du dépistage des polypes :

- Chez les sujets à risque moyen, le dépistage est possible par la recherche de saignements occultes dans les selles, dans le cadre de campagnes de dépistage de masse.
- Chez les sujets à haut risque et à risque très élevé, une coloscopie de dépistage est conseillée, à des âges variables selon le contexte. En ce qui concerne les polyposes adénomateuses familiales, l'ANAES recommande une endoscopie digestive basse chez les apparentés d'un sujet atteint, à partir de 10-12 ans, et sur un rythme annuel ; ce suivi ne concerne que les sujets porteurs de la mutation familiale si elle est connue, ou tous les apparentés quand la mutation n'a pas pu être identifiée. S'il s'agit d'un phénotype de PAF atténuée, la détection des lésions néoplasiques n'est effectuée qu'à partir de l'âge de 30 ans, sur un rythme annuel.

4- Conduite à tenir lors de la découverte de polypes :

Tout polype colorectal doit faire l'objet d'une exérèse et doit être examiné histologiquement. L'exérèse est endoscopique chaque fois que cela est possible, ou chirurgicale. L'attitude ultérieure dépend de plusieurs paramètres : seuls les polypes adénomateux justifient une surveillance coloscopique, et la fréquence des coloscopies de contrôle dépend du nombre d'adénomes, de leur taille, du type histologique.

II- LES PAF ET LE GENE APC

La Polypose Adénomateuse Familiale, est la plus fréquente des polyposes intestinales. C'est une maladie autosomique dominante à forte pénétrance liée à une altération du gène *APC* (Adenomatous Polyposis Coli). Elle est responsable d'environ 1 % des cancers colorectaux et survient avec une fréquence de une naissance sur 7 à 10 000.

1- Eléments cliniques :

La PAF est caractérisée cliniquement par l'apparition de 100 à plusieurs milliers de polypes adénomateux au niveau du colon ou du rectum pendant les premières décennies de la vie. Non traitée, la polypose dégénère inéluctablement vers un cancer, généralement avant 50 ans. (Fearnhead NS. et al., 2001)

A côté de ces PAF typiques, il existe des formes moins sévères de PAF, appelées polyposes adénomateuses familiales atténuées (AFAP), caractérisées par un petit nombre d'adénomes (moins de 100), susceptibles d'apparaître plus tard que dans le cas des PAF, et avec un risque de dégénérescence vers un cancer plus tardif. (Spirio L. et al., 1993)

Des manifestations digestives extracoliques, et des manifestations extra digestives peuvent être associées aux PAF : adénomes duodénaux, kystes épidermoïdes, tumeurs desmoïdes, ostéomes ou fibromes, hypertrophie de l'épithélium pigmentaire rétinien (CHRPE). Dans le syndrome de Gardner, des manifestations extra-intestinales caractéristiques telles qu'ostéomes, kystes desmoïdes et épidermoïdes, sont associées à la polypose rectocolique. Le syndrome de Turcot associe polypes et tumeurs cérébrales.

Une anomalie germinale du gène *APC* est identifiée dans 80 à 85% des cas de PAF.

2- Le gène APC :

a- Description du gène APC :

Il est localisé sur le bras long du chromosome 5 : 5q21-q22. Sa séquence codante comprend 10386 paires de bases, réparties sur 15 exons. L'exon 15 représente plus de 75 % de la séquence codante. Le gène *APC* code pour une protéine de 2843 acides aminés dans sa forme la plus commune. (Bodmer et al., 1987 ; Groden J. et al., 1991 ; Kinzler KW. et al., 1991 ; Horii A., 1993)

b- Mutations germinales :

Chez 80 à 85 % des patients atteints de polypose multiple familiale, il est possible d'identifier une mutation du gène *APC*. Environ 1000 mutations germinales différentes, réparties sur tout le gène, ont été détectées dans les familles atteintes. La majorité sont des mutations « frame-shift », c'est à dire qui décalent le cadre de lecture, ou non-sens, produisant alors une protéine tronquée.

Le site de la mutation est corrélé au tableau clinique de la PAF (figure 1): les polyposes sévères (plus de 5000 polypes), sont généralement retrouvées chez des patients présentant une mutation entre le codon 1250 et 1464 (au début de l'exon 15), (Nagase H. et al., 1992). Au contraire, les formes atténuées de polyposes adénomateuses sont généralement associées à une mutation au niveau des extrémités 5' ou 3' du gène (Dobbie Z. et al., 1994 ; Soravia C., 1998); on ne retrouve pas de manifestation oculaire (hypertrophie de l'épithélium pigmentaire rétinien, CHRPE) lorsque la mutation survient avant l'exon 9 (Spirio L. et al.,

1993 ; Wallis YL. et al., 1994) Les tumeurs desmoïdes sont limitées aux patients présentant une mutation entre les codons 1403 et 1578.

Gène APC

- Exons

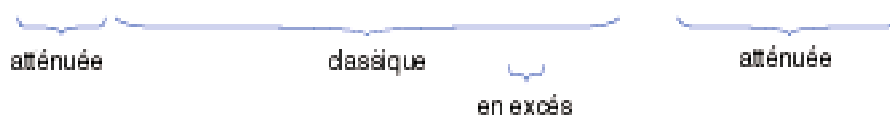


- Codons



Phénotype PAF

- Polypose



- Extra-colique



Figure 1 : corrélation génotype-phénotype lors de PAF

c- Mutations somatiques :

Le mécanisme pathologique impliquant le gène *APC* dans la genèse des tumeurs fait appel à un deuxième événement inactivant l'autre copie du gène au niveau somatique (Rowann AJ., 2000).

En fait, des lésions acquises du gène *APC* sont retrouvées dans la majorité des tumeurs coliques sporadiques, et interviennent à un stade très précoce de leur formation (Nagase H. et al., 1993).

Dans les cancers colorectaux sporadiques comme dans les tumeurs associées aux PAF, les deux allèles sont mutés successivement. Plus de 60 % des mutations somatiques du gène *APC* sont situées dans l'exon 15, entre les codons 1286 et 1513, région appelée « mutation cluster région » (MCR), (Miyoshi Y. et al., 1992).

d- La protéine APC :

Le gène *APC* code pour une protéine de 2843 acides aminés. C'est une protéine cytoplasmique, concentrée à la partie basolatérale des cellules de la crypte épithéliale.

Cette protéine joue un rôle dans la régulation du cycle cellulaire, l'adhésion cellulaire, et joue probablement un rôle dans l'apoptose.

Elle se lie à la β -caténine au sein d'un complexe quaternaire formé de l'actine, la GSK3 (glycogène synthase kinase), l'APC, et la β -caténine. Au sein de ce complexe, la β -caténine et l'APC sont phosphorylées par la GSK3, ce qui permet la dégradation de la β -caténine.

- Implication dans la régulation du cycle cellulaire :

Des mutations du gène *APC* entraînent une diminution de la dégradation de la β -caténine dans le cytoplasme, celle-ci n'étant plus phosphorylée par la GSK3 dans le complexe précédemment cité. La β -caténine peut alors entrer dans le noyau où elle s'associe à des facteurs de transcription Lef1/Tcf. Le complexe formé active la transcription de gènes cibles, dont l'oncogène c-myc et la cycline D1, qui régulent tous deux la prolifération cellulaire. C-myc est fortement sur-exprimé dans les phases précoces de la tumorigénèse rectale. (Rubinfeld B. et al., 1996 ; Morin PJ. et al., 1997)

- Implication dans l'adhésion cellulaire :

La β -caténine est un élément indispensable à la jonction intercellulaire. Elle se lie aux cadhérines E qui maintiennent l'adhérence des cellules épithéliales. La liaison β -caténine-cadhérine E est indispensable à cette fonction. Les hétéro-dimères β -caténine-APC et β -caténine-cadhérine E se forment de manière distincte, il n'existe pas de complexes multiples, mais il y a compétition au niveau des sites de liaison de la cadhérine E pour l'APC ou la β -caténine. (Rubinfeld B. et al., 1995)

Il est probable que la protéine APC module les interactions entre cadhérine et caténine, en modifiant ainsi croissance et différenciation cellulaire.

- Implication dans l'apoptose :

Dans le colon normal, on retrouve la protéine APC concentrée à la partie basolatérale des cellules de la crypte épithéliale, et son expression augmente avec la maturation normale de ces cellules et leur progression vers le haut de la crypte. (Grandjouan S., 1995)

Il a été montré que l'expression de la protéine APC dans une lignée cellulaire de cancer du colon, où il existait une inactivation bi-allélique du gène *APC*, induit une baisse importante de la prolifération cellulaire par induction de l'apoptose. (Morin PJ. et al., 1996)

III- LE GENE *MYH* ET LES POLYPOSES ADENOMATEUSES :

1- Les systèmes de réparations de l'ADN :

L'ADN subit des modifications pendant ou après la réplication : les erreurs de réplication sont une source importante de mutations spontanées ; mais des altérations de l'ADN peuvent survenir aussi après la réplication, résultant soit de changements de bases nucléiques dus à une instabilité chimique, soit de lésions provoquées par des agents chimiques ou physiques.

Différents systèmes de réparation de l'ADN ont été identifiés chez les eucaryotes, leur défaillance pouvant conduire à des maladies génétiques importantes.

a- La réparation des mésappariements :

Bien que les principales ADN polymérases intervenant dans la réplication de l'ADN possèdent une activité de correction des erreurs, certains mésappariements échappent à cette correction, et des bases se trouvent parfois incorrectement appariées dans le brin d'ADN.

Le système de réparation des mésappariements fait appel à des enzymes qui détectent la base mal appariée sur le brin neosynthétisé. S'ensuit alors une excision du brin erroné, avec création d'une brèche de 100 à 1000 nucléotides. Puis la réparation est assurée par une ADN polymérase et une ligase.

Le syndrome du cancer colorectal héréditaire sans polypose (HNPCC) ou syndrome de Lynch, est dû à des mutations sur un groupe d'au moins 5 gènes, localisés sur des segments chromosomiques différents, et impliqués dans la réparation des mésappariements : *hMSH2*, *hMLH1*, *hMSH6*, *hPMS1*, et *hPMS2*. Comme dans le cas des PAF, le HNPCC se transmet de

façon autosomale dominante, et est caractérisé par un risque élevé de développer des cancers du colon et de l'endomètre, mais aussi de l'estomac, des ovaires, de l'intestin grêle, des voies urinaires excrétrices, et des voies biliaires.

b- L'excision-réparation des nucléotides (NER):

Le système d'excision-réparation de nucléotides (NER) intervient sur les dommages importants de l'ADN qui créent des blocages de la réplication et de la transcription (tels que les dimères induits par les UV et les produits chimiques). Il implique plusieurs enzymes qui interviennent à différentes étapes du processus qui sont

- La reconnaissance du dommage à l'ADN
- Une coupure du brin d'ADN lésé de part et d'autre de la lésion
- Une excision du fragment erroné
- La synthèse de la zone manquante par une ADN polymérase qui utilise le brin complémentaire comme matrice
- Une ligation termine la réparation.

On connaît plusieurs maladies héréditaires causées par un défaut dans le processus d'excision de nucléotides. Parmi celles-ci, Xeroderma pigmentosum est caractérisée par une sensibilité accrue au soleil et une augmentation du risque de cancers cutanés. C'est une maladie à transmission autosomique récessive. Les dommages s'expliquent par la création par les UV de ponts entre pyrimidines, en particulier de dimères de thymine, sur un même brin, qui ne sont plus réparés. Ces dimères sont des structures stables entraînant une distorsion considérable de la structure de l'ADN.

c- L'excision réparation de bases (BER) : (figure2)

Ce système de réparation est mis en place pour éliminer les bases incorrectes, comme l'uracile. Il joue un rôle important en particulier dans la réparation des mutations causées par l'oxydation de la guanine.

Il nécessite des enzymes spécifiques, des ADN glycosylases, qui reconnaissent la base inappropriée, et qui catalysent l'hydrolyse des liaisons N-glycosidiques entre cette base et le désoxyribose.

Il en résulte un site abasique qui sera reconnu et réparé d'abord par coupure du brin d'ADN endommagé en 5' du site abasique, puis par extension à partir du groupement –OH (3') nouvellement créé par une ADN polymérase avec extension du site abasique.

La réparation est terminée par une ligase.

On associe depuis peu une maladie génétique à un défaut du système BER, la polypose associée à des mutations du gène *MYH* : « MYH-associated polyposis » (MAP), qui fait l'objet de cette étude. Les signes cliniques semblent proches de ceux observés dans le cas d'une polypose adénomateuse familiale (PAF), mais il s'agit d'une maladie à transmission autosomique récessive. La mutation porte sur le gène *MYH*, à activité adénine glycosylase, qui reconnaît et élimine l'adénine mal appariée à une guanine, oxydée ou non.

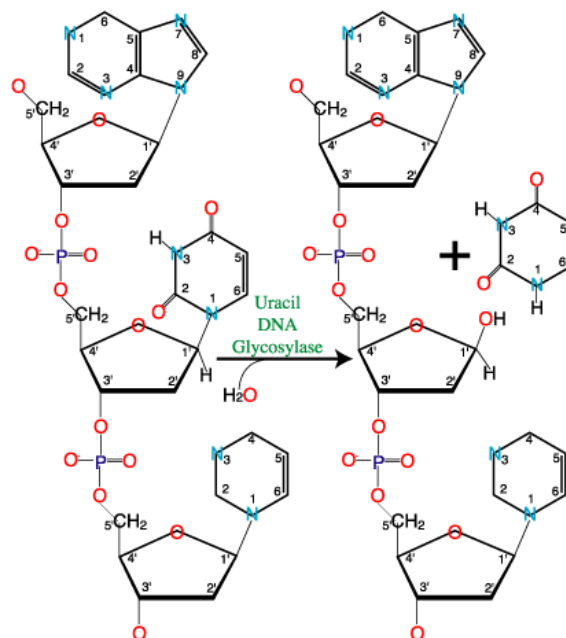
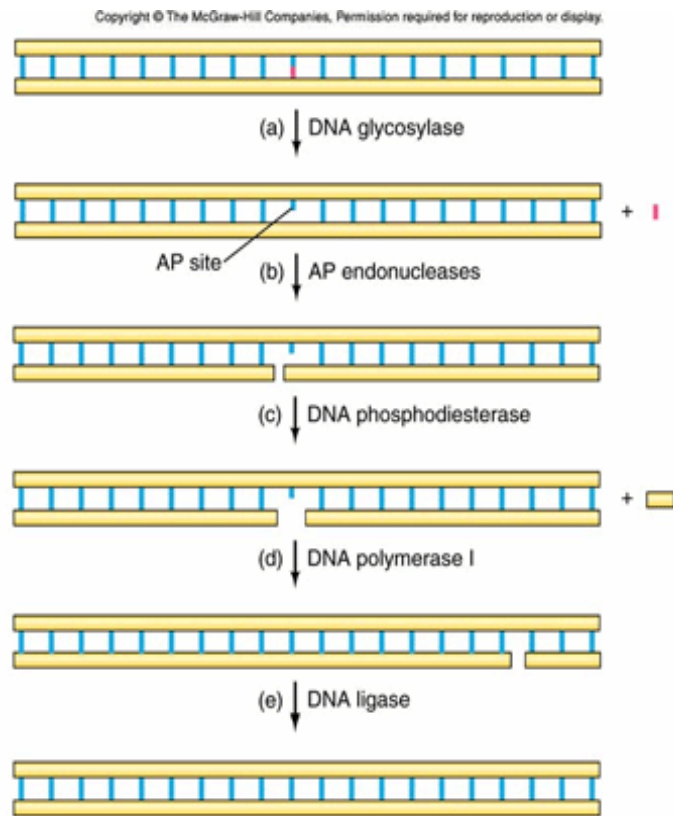
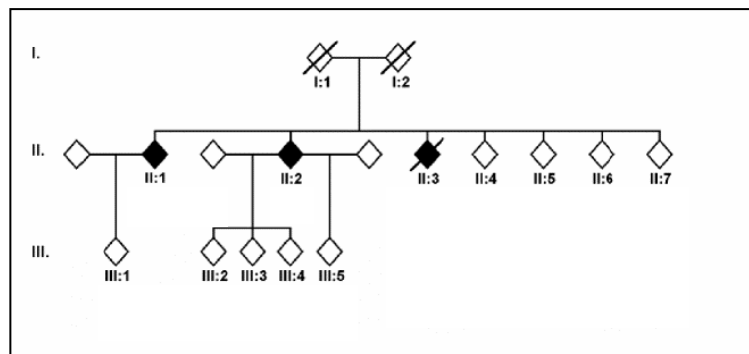


Figure 2 : Réparation par excision de bases (BER)

2- Découverte de l'implication du gène *MYH* dans les polyposes adénomateuses :

Al-Tassan et al (2002) ont récemment étudié une famille anglaise N dans laquelle trois membres d'une même fratrie présentaient de multiples adénomes colorectaux ou un cancer colorectal. Les autres membres de la famille étaient sains. (Figure 3)



Al-Tassan et al. (2002)

Figure 3 : Généalogie de la famille N ; les membres II :1, II :2, et II :3 présentent de multiples adénomes colorectaux ou un cancer colorectal

Aucune mutation pathogène héréditaire du gène *APC* n'a été décelée chez ces patients. Par contre, l'analyse de 11 tumeurs coliques a montré 18 mutations somatiques différentes du gène *APC*, dont 15 transversions $G : C \rightarrow T : A$. Cette proportion de transversions $G : C \rightarrow T : A$ est significativement supérieure à celle retrouvée habituellement dans les tumeurs sporadiques ou dans les tumeurs associées aux polyposes adénomateuses familiales (83% versus 10 %).

Le mécanisme de ces transversions peut s'expliquer par une oxydation de la désoxyguanosine. La 8-oxo-7,8-dihydro 2' désoxyguanosine (8-oxo G) est un produit résultant du stress oxydatif de l'ADN qui peut être très tôt mal apparié avec une Adénine. Pendant la réplication, le nucléotide incorporé en face de cette base oxydée peut-être soit une désoxycytidine mono phosphate (dCMP), soit une desoxyadénosine mono phosphate (dAMP). La paire éventuellement créée, 8-oxoG:A, conduit alors après un second cycle de réplication au remplacement d'une paire G:C par une paire T:A. (Shibutani S. et al., 1991)

Chez *Escherichia coli*, on connaît trois enzymes qui coopèrent pour éviter l'accumulation des transversions G:C→T:A induites par la présence de la 8-oxoGuanine dans l'ADN oxydé : MutM, MutT, et MutY. (Figure 4). (Michaels ML. et al., 1992)

MutM et MutY sont deux glycosylases, elles catalysent l'hydrolyse des liaisons N-glycosidiques des bases mal appariées : MutM élimine la base oxydée, 8-oxoG, incorporée dans l'ADN, et le site abasique résultant est réparé pour restaurer une paire de base G:C. Lorsque les lésions ne sont pas réparées avant la réplication, on obtient dans la majorité des cas une transversion G:C→T:A, car les DNA polymérases impliquées dans la réplication incorporent une Adénine en face d'une 8-oxoG entre 5 et 200 fois plus qu'une Cytosine. Cependant, MutY peut intervenir, et éliminer l'Adénine mal appariée à la 8-oxoG pendant la réplication, et un système de réparation ultérieur restaure une Cytosine en face de la Guanine oxydée (car les polymérases impliquées dans la réparation incorporent une Cytosine préférentiellement à une Adénine en face de la 8-oxoG). La protéine MutM peut à nouveau jouer son rôle pour éliminer la base oxydée.

MutT est une 8-oxo-dGTPase qui prévient l'incorporation de la 8-oxo-dGTP dans l'ADN naissant en le transformant en 8-oxo dGMP.

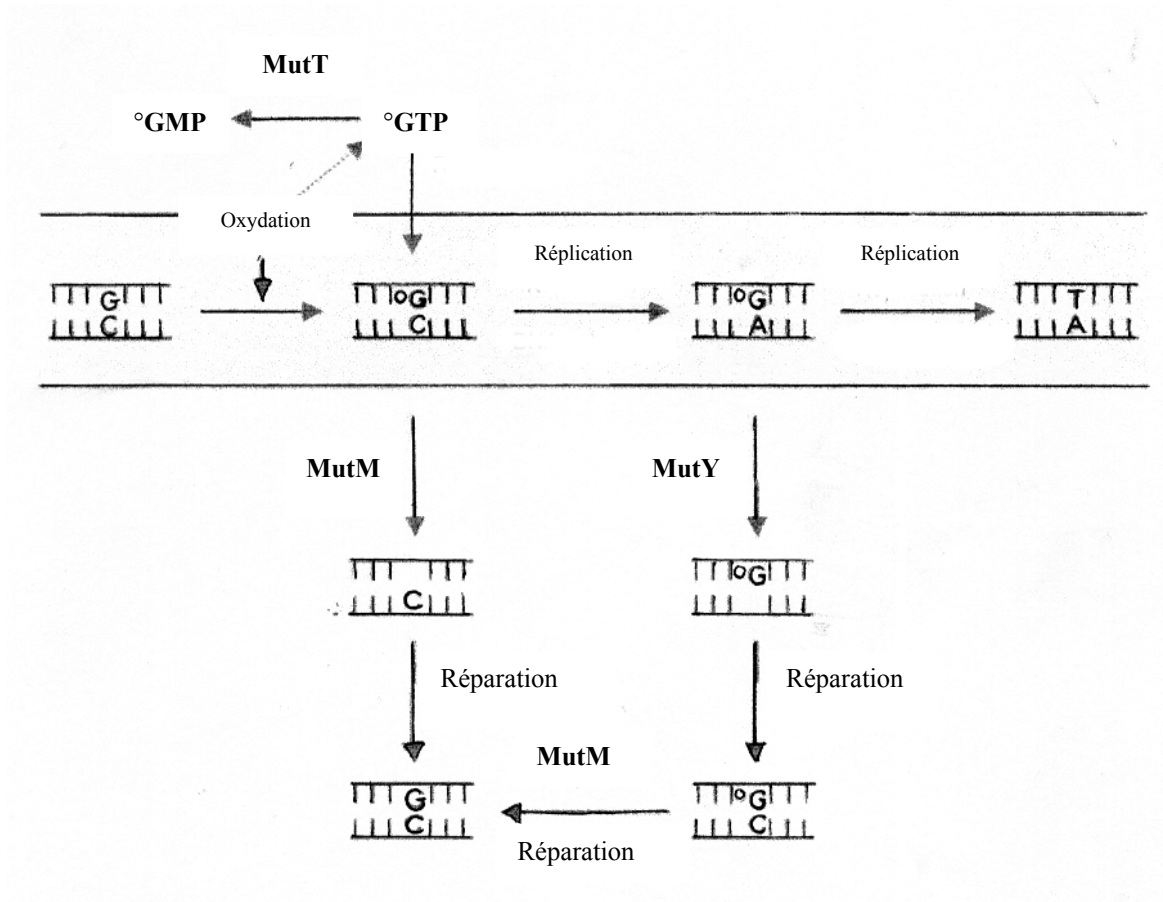


Figure 4 : Intervention de MutT, MutY, et MutM chez *E. coli* pour la réparation des dommages oxydatifs de l'ADN. *Cheadle et al. (2003)*

Les homologues humains de ces trois enzymes MutM, MutY, et MutT ont été identifiés, il s'agit respectivement de OGG1, MYH, et MTH1. (Roldan-Arjona T. et al., 1997 ; Slupska MM. et al., 1996 ; Sakumi K. et al., 1993)

Al-Tassan et al. (2002) ont séquencé chez un sujet atteint de la famille anglaise citée figure 3 les gènes codant pour ces trois enzymes. Deux mutations faux sens ont été mises en évidence

sur le gène *MYH* au niveau des exons 7 et 13 : p.Tyr165Cys et p.Gly382Asp. Elles entraînent respectivement, sur la protéine, le remplacement d'une tyrosine en position 165 par une cystéine, et d'une glycine en position 382 par un acide aspartique. Aucune mutation pathogène n'a été identifiée sur les gènes *OGG1* et *MTH1*.

Le séquençage du gène *MYH* chez tous les membres de la famille a montré ensuite que les trois membres affectés présentaient ces mutations à l'état hétérozygote composite p.Tyr165Cys et p.Gly382Asp, alors que les sujets sains de la famille étaient soit hétérozygotes pour une seule de ces deux mutations, soit ne présentaient aucune mutation. Ceci suggère non seulement l'implication du gène *MYH* dans la survenue de polypes, mais aussi une transmission autosomale récessive de cette mutation.

3- Structure du gène *MYH* :

Le gène *MYH* a été séquencé et cloné par Slupska et al. (1996). Il est localisé sur le bras court du chromosome 1 : 1p34.3-1p32.1

Il comporte 15 introns et 16 exons sur une longueur de 7100 paires de bases.

Ce gène code pour une protéine MYH de 535 acides aminés qui présente 41% d'identité avec la protéine MutY de *Escherichia coli*.

4- Structure de la protéine MYH :

Les données concernant hMYH sont limitées en raison d'une faible expression et activité de cette enzyme isolée de bactéries ou de cellules eucaryotes. Cependant, la similarité de fonction entre les deux enzymes humaine et bactérienne ayant été montrée par la capacité

de l'enzyme humaine à restaurer l'activité de MutY chez E.coli MutY⁽⁻⁾, la protéine bactérienne MutY a pu servir de modèle d'étude.

Le complexe formé par le domaine actif de la protéine MutY et l'ADN double brin contenant la paire 8-oxoG :A a été cristallisé (J.C. Fromme et al. ; 2004), ce qui permet une meilleure compréhension des bases de reconnaissance du mésappariement et de l'élimination de l'Adénine.

Cette enzyme possède un domaine carboxy-terminal qui semble responsable de la reconnaissance de l'oxo-G (Noll et al. ; 1999 ; Chmiel et al. ; 2001), et un domaine catalytique qui interagit avec le brin d'ADN contenant l'Adénine. De nombreux contacts se créent entre la 8-oxoG et les domaines carboxy-terminal et catalytique. Il en résulte une forte courbure de l'ADN au voisinage du mésappariement qui permet l'excision de l'Adénine.

Les deux acides aminés Tyr165 et Gly382 de l'enzyme hMYH correspondent chez E.coli à Tyr82 et Gly253 pour MutY. Ces deux acides aminés se situent respectivement au niveau des domaines N-terminal et carboxy-terminal de l'enzyme. Ils ont un rôle dans la reconnaissance de la 8-oxo-G. En particulier, le cycle aromatique de Tyr82 s'intercale directement entre l'oxo-G et le nucléoside en 5' de l'oxo-G.

L'étude fonctionnelle de l'enzyme MutY mutante au niveau Tyr82 et Gly253 a été effectuée in vitro (Chmiel et al. ;2003) et a révélé une baisse de son activité adénine-glycosylase.

De plus, les mutants de l'enzyme humaine hMYH, Tyr165Cys et Gly382Asp, ont une capacité moindre à restaurer l'activité de MutY chez les souches mutantes MutY⁽⁻⁾ d'*Escherichia coli* par rapport au type sauvage hMYH.

5- Synthèse de différentes études sur les mutations du gène *MYH* :

- Jones et al. (2002) ont analysé le gène *MYH* chez 21 patients non apparentés présentant de multiples adénomes colorectaux, et ont trouvé des mutations bi-alléliques chez 7 d'entre eux. Les 7 patients présentaient plus de 100 adénomes colorectaux, et 6 avaient déclaré un cancer colorectal.

Patients	Exons	nucléotides	Acides aminés
MA27	3	270 C→A	Tyr90Ter
	3	270 C→A	Tyr90Ter
MA22	7	494 A→G	Tyr165Cys
	7	494 A→G	Tyr165Cys
MA34	7	494 A→G	Tyr165Cys
	7	494 A→G	Tyr165Cys
MA25	7	494 A→G	Tyr165Cys
	13	1145 G→A	Gly382Asp
MA20	14	1396 G→T	Glu466Ter
	14	1396 G→T	Glu466Ter
MA24	14	1396 G→T	Glu466Ter
	14	1396 G→T	Glu466Ter
MA26	14	1396 G→T	Glu466Ter
	14	1396 G→T	Glu466Ter

Chez trois patients anglais de race blanche, (MA22, MA34, et MA25), les mutations faux sens p.Tyr165Cys, et p.Gly382Asp ont été identifiées: à l'état hétérozygote composite pour l'un d'entre eux, et la mutation p.Tyr165Cys à l'état homozygote pour les 2 autres.

Deux nouvelles mutations ont été mises en évidence chez un sujet pakistanais et trois sujets indiens. Le patient pakistanais (MA27) est homozygote pour la mutation non-sens

p.Tyr90Ter, et les trois patients indiens (MA20 ; MA24 ; MA26) sont homozygotes pour la mutation non-sens p.Glu466Ter.

Cette étude suggère l'implication de mutations prépondérantes différentes selon les ethnies, ce qui mènerait à une stratégie d'étude différente en fonction de l'origine des patients.

Deux études plus importantes ont été effectuées par la suite par Sieber et al. (2003) et Sampson et al. (2003) :

- L'étude de Sieber et al. porte d'une part sur 152 malades du Royaume Uni présentant de multiples adénomes colorectaux (3 à 100) avec des antécédents familiaux de cancer colorectal, et d'autre part sur 107 malades ayant un phénotype de polypose adénomateuse classique (>100 adénomes), sans mutation germinale identifiée sur le gène *APC*, et sélectionnés parmi les registres du Royaume Uni, de la Suisse, de la Finlande, du Portugal, et du Danemark.

La recherche de mutations a porté sur les gènes *MYH*, *OGG1*, et *MTH* ; 107 sujets anonymes ont été analysés en parallèle comme contrôle.

Résultat : 6 patients (4%) avec des adénomes multiples, et 8 patients (7.5%) avec polypose adénomateuse classique ont une mutation bi-allélique du gène *MYH*. Aucune mutation pathogène n'a été identifiée sur les gènes *MTH1* et *OGG1*, et aucune mutation bi-allélique n'a été retrouvée sur le gène *MYH* chez les 107 contrôles.

Dans le groupe des 152 patients présentant des adénomes multiples, environ un tiers de ceux qui ont plus de 15 adénomes sont porteurs d'une mutation bi-allélique du gène *MYH*.

Parmi les 107 patients ayant un phénotype de polypose familiale classique, aucun patient ayant plus de 1000 adénomes n'a de mutation bi-allélique du gène *MYH*.

Les résultats pour les deux groupes sont donnés dans les deux tableaux suivants :

Patients du Royaume Uni avec adénomes multiples et mutations germinales bi-alléliques du gène MYH							
Patients	Mutation 1	Mutation 2	sexe	Age lors du diagnostic	Nb de polypes	Cancer colorectal	Histoire familiale d'adénomes et/ou de cancer colorectal
1	Tyr165Cys	Tyr165Cys	M	52 ans	40	Non reporté	Oui
2	Tyr165Cys	Gly382Asp	F	45 ans	100	Oui	Non reportée
3	Tyr165Cys	1419delC	F	57 ans	18	Oui	Oui
4	1103delC	Gly382Asp	M	55 ans	70	Non reporté	Oui
5	Gly382Asp	Gly382Asp	M	56 ans	40	Oui	Oui
6	Gly382Asp	Gly382Asp	F	59 ans	100	Non reporté	Oui

Patients avec polypose adénomateuse classique, et mutations germinales bi-alléliques sur le gène MYH							
Patients	Mutation 1	Mutation 2	Sexe	Age lors du diagnostic	Cancer colorectal	Histoire familiale de polypose adénomateuse classique	Maladie extra colique
13	Tyr165Cys	Tyr165Cys	M	41 ans	Non reporté	Oui	Hypertrophie congénitale de l'épithélium pigmentaire rétinien
14	Tyr165Cys	Gly382Asp	F	50 ans	Non reporté	Oui	Non reportée
15	Gly382Asp	Gly382Asp	M	30 ans	Non reporté	Non reportée	Adénomes duodénaux
16	252delG	137insIW	M	38 ans	Oui	Non reportée	Adénomes duodénaux
17	Tyr165Cys	Tyr165Cys	F	45 ans	Oui	Oui	Non reportée
18	Tyr165Cys	Val132Phe	M	70 ans	Non reporté	Non reportée	Non reportée
19	Tyr165Cys	Gly382Asp	M	51	Oui	Non reportée	Non reportée
20	Tyr165Cys	Gly382Asp	F	69	Oui	Oui	Non reportée

De nouvelles mutations ont été identifiées : trois mutations « frame-shift » (1103delC (sur le codon 368) ; 1419delC (sur le codon 473) ; et 252delC (sur le codon 84).); une duplication « en phase » (411dupATGGAT) ; et une mutation faux-sens p.Val232Phe.

Parmi les 28 allèles mutés, les deux mutations les plus fréquemment retrouvées restent les deux mutations faux sens p.Tyr165Cys (12 allèles), et p.Gly382Asp (11 allèles).

Pour ces 14 cas, l'âge des patients au moment du diagnostic est compris entre 30 et 70 ans, le nombre total de polypes est compris entre 18 et 1000, et 50% ont déclaré un cancer colorectal. Trois patients ont une pathologie extra colique : deux ont une polypose duodénale, et le troisième a une hypertrophie congénitale de l'épithélium pigmentaire rétinien.

- L'étude de Sampson et al. (2003) porte sur 11 familles sélectionnées parmi 614 familles répertoriées dans 6 registres régionaux du Royaume Uni. Les critères de sélection étaient :
 - Pas de transmission verticale évidente de polypose ;
 - Au moins 10 adénomes colorectaux avec ou sans cancer colorectal ;
 - Pas de mutation pathogène identifiée sur le gène APC au niveau germlinal.

Résultats : 25 patients (23%) présentent une mutation bi-allélique du gène MYH. Parmi eux, 9 ont plus de 100 adénomes, 11 ont entre 10 et 100 adénomes. Le nombre de polypes chez les 5 autres patients n'est pas défini. 12 patients (48%) ont eu un cancer colorectal diagnostiqué à un âge moyen de 49,7 ans. L'âge moyen au moment du diagnostic des polypes était de 46 ans (13 à 65 ans).

Ces 25 patients ont un total de 64 frères et sœurs, parmi lesquels 17 (27%) sont connus pour une polypose colorectale, un chiffre cohérent avec une transmission récessive de cette pathologie.

Le tableau suivant récapitule les résultats obtenus :

Patients	Sexe	Origine	Mutation 1	Mutation 2	Nombre d'adénomes	Age lors du diagnostic	Cancer colorectal	Autres
B1	F	Caucasien	Tyr165Cys	Tyr165Cys	Plusieurs dizaines	46	Oui	Non
B2	F	Caucasien	Gly382Asp	891+3 A→C	"Multiple"	34	Non	Non
CB1	M	Caucasien	Tyr165Cys	Gly382Asp	<100	48	Non	Non
CB2	M	Caucasien	Gly382Asp	Gly382Asp	~70	62	Oui	Non
CB3	F	Caucasien	Tyr165Cys	347-1 G→A	14	56	Non	Non
CF1	M	Caucasien	Tyr165Cys	Gly382Asp	98	53	Non	Non
CF2	M	Indien	Glu466Ter	Glu466Ter	>100	65	Oui	Non
CF3	M	Indien	Glu466Ter	Glu466Ter	26	36	Oui	Non
CF4	M	Pakistanaï	Tyr90Ter	Tyr90Ter	>400	61	Oui	Non
CF5	M	Caucasien	Tyr165Cys	Tyr165Cys	>100	46	Non	Non
CF6	M	Indien	Glu466Ter	Glu466Ter	>200	49	Non	Non
CF7	F	Caucasien	Tyr165Cys	Gly382Asp	>100	45	Oui	Non
CF8	F	Caucasien	Tyr165Cys	Tyr165Cys	>22	38	Oui	Non
CF9	M	Caucasien	Tyr165Cys	Gly382Asp	~50	59	Non	Non
CF10	M	Caucasien	Gly382Asp	Gln324Ter	>30	40	Non	Non
M1	M	Caucasien	Tyr165Cys	Gly382Asp	>100	13	Non	Cancer de l'estomac à 17 ans
M2	M	Indien	Glu466Ter	Glu466Ter	>100	52	Oui	Non
M3	F	Caucasien	Tyr165Cys	Tyr165Cys	"Nombreux"	45	Oui	Non
M4	F	Caucasien	Tyr165Cys	Gly382Asp	>20	58	Oui	Non
SO1	M	Caucasien	Tyr165Cys	Tyr165Cys	Centaines	30	Oui	Polypes duodénaux
SO2	M	Caucasien	Tyr165Cys	Gly382Asp	"Nombreux"	51	Non	Non
SO3	M	Caucasien	Tyr165Cys	Tyr165Cys	~50	50	Oui	Non
SO4	M	Caucasien	Tyr165Cys	Tyr165Cys	"Multiple"	34	Non	Non
SO5	M	Caucasien	Tyr165Cys	891+3 A→C	"Nombreux"	48	Non	Non
SO6	M	Caucasien	Tyr165Cys	Trp117Arg	>100	31	Non	Non

Dans cette étude, 8 cas (CF2→CF9) ont déjà été analysés par Al-Tassan et al., et Jones et al.

Les 17 nouveaux cas incluent un quatrième patient indien (M2), qui présente comme les trois autres, une mutation homozygote p.Glu466Ter.

Parmi les familles de race blanche, quatre nouvelles mutations ont été mises en évidence : p.Gln324Ter ; p.Trp117Arg ; 347-1 G→A, et 891+3 A→C.

A nouveau, les deux mutations p.Tyr165Cys et p.Gly382Asp sont largement majoritaires dans la population blanche.

De ces différentes études, il ressort que les mutations germinales bi-alléliques du gène *MYH* prédisposent à un phénotype de polypose colique et de cancer colorectal selon une transmission autosomique récessive. Les manifestations cliniques seraient similaires à celle des polyposes atténuées (<100 adénomes), et classiques ou (> 100 adénomes), mais pas aux polyposes sévères (>1000 adénomes).

Les deux mutations les plus fréquemment retrouvées dans la population blanche d'Europe sont p.Tyr165Cys (53%), et p.Gly382Asp (32%).

6- Prévalence des mutations du gène *MYH* dans les cancers colorectaux :

Jusqu'à présent, deux maladies héréditaires responsables de cancers colorectaux avaient été identifiées : La polypose adénomateuse familiale (PAF) qui rend compte de moins de 1% des cancers colorectaux ; et les cancers héréditaires sans polypose (HNPCC) qui représentent 1 à 5% de ces cancers.

A présent, différentes études sont effectuées pour évaluer la prévalence des « MYH-associated polyposis (MAP) » dans les cancers colorectaux :

- Halford et al. (2003) ont étudié 75 patients, non sélectionnés, ayant un cancer colorectal sporadique. Un patient (1.3%) présente une mutation germinale hétérozygote composite du gène *MYH*.

Une analyse rétrospective montre que ce patient avait de multiples polypes adénomateux synchrones du cancer colorectal.

Aucune mutation germinale des gènes *MTH1* et *OGG1* n'a été retrouvée.

- Enholm et al. (2003) ont évalué la fréquence des mutations p.Tyr165Cys et p.Gly382Asp dans une série de 1042 patients finlandais atteints de cancer colorectal. Quatre patients (0.4%) présentent une mutation bi-allélique du gène *MYH*. Tous ces patients ont de multiples polypes adénomateux, le nombre de polypes le plus faible étant de 5.

Aucune de ces deux mutations n'a été retrouvée dans une série de 424 contrôles.

- Fleischmann et al.(2004) ont recherché des mutations du gène *MYH* chez 358 patients atteints de cancer colorectal. Deux cas (0.6%) présentent une mutation bi-allélique du gène *MYH*, et ont de multiples polypes adénomateux.
- Wang et Al. (2004) ont recherché les deux mutations p.Tyr165Cys et p.Gly382Asp pour 444 patients atteints de cancer colorectal, dont 116 âgés de moins de 50 ans. Deux patients parmi les 444 (0.45%), ce qui représente 1.72% des 116 patients les plus jeunes, présentent une mutation bi-allélique du gène *MYH*.

Ces résultats confirment que des mutations bi-alléliques du gène *MYH* prédisposent aux cancers colorectaux, mais elles semblent être toujours associées à la présence de polypes adénomateux. Elles rendraient compte d'après ces études de moins de 2% des cancers colorectaux.

- Plus récemment, une équipe de Toronto, Croitoru et al. (2004), a évalué le risque de cancer du colon chez les porteurs hétérozygotes et homozygotes des mutations p.Tyr165Cys et p.Gly382Asp du gène *MYH*. En comparant une population de 1238 patients atteints d'un cancer du colon, et une population de 1255 personnes en bonne santé, ils ont estimé que les porteurs des mutations homozygotes et hétérozygotes avaient un risque doublé de développer un cancer colorectal, et plus précisément les porteurs d'une seule mutation ont un risque correspondant à 1.4 fois celui des non porteurs de mutations.

L'étude familiale des porteurs de mutations monoalléliques a en outre montré que ceux-ci avaient 1.57 fois plus de risque d'avoir un parent du premier ou du second degré atteint de cancer colorectal. Ces informations remettent en question la transmission récessive d'une pathologie liée au gène *MYH*, et nécessitent des études ultérieures plus larges.

7- Incidence des mutations germinales du gène *MYH* sur le gène *k-ras* :

Le gène *k-ras* est un oncogène impliqué dans la prolifération cellulaire, dans l'apoptose, et qui participe à la tumorigénèse colorectale.

Jones et al. (2004) ont montré récemment que les tumeurs colorectales des patients atteints de « *MYH-associated polyposis* » présentaient une fréquence de transversions G :C→T :A sur le gène *k-ras* supérieure à celle retrouvée dans les tumeurs sporadiques ou associées aux PAF.

PATIENTS, MATERIELS ET METHODES

I- PATIENTS :

Dans ce travail, 29 patients sans lien de parenté ont été étudiés : tous avaient été adressés dans un contexte de polypose colique mais la recherche de mutation dans le gène APC s'était révélée négative. Les demandes émanaient du service des maladies de l'appareil digestif et de la consultation d'oncogénétique de l'hôpital de Rennes, du service de génétique de l'hôpital de Brest, d'un cabinet privé des Côtes d'Armor. Les critères d'inclusion ont volontairement été peu sélectifs en raison du faible nombre de sujets disponibles. L'étude des dossiers médicaux n'a pas toujours fourni un nombre de renseignements important :

- pour quatre patients aucun renseignement clinique n'était disponible
- Dix sept avaient une histoire familiale de polypose (4 de transmission verticale évidente, 13 compatibles avec une transmission récessive)
- les huit sujets restants n'avaient pas d'histoire familiale connue et apparaissaient donc comme des cas sporadiques.

Le nombre de polypes n'était pas toujours précisé : sept patients avaient moins de 15 polypes, quatre avaient entre 15 et 100 polypes, un avait plus de 100 polypes et pour deux d'entre eux il était fait état de tapis ou nuée de polypes.

L'âge moyen des patients à la réception du prélèvement était de 56 ans (33 à 79 ans).

Chez ces patients, les deux mutations les plus fréquemment retrouvées sur le gène MYH dans la population de race blanche (p.Tyr165Cys et p.Gly382Asp) ont été recherchées.

II- MATERIELS ET METHODES :

Dans un premier temps, seules les mutations p.Tyr165Cys et p.Gly382Asp (les plus fréquemment retrouvées dans la population caucasienne) ont été recherchées par coupure enzymatique. Le séquençage des 16 exons du gène *MYH* n'a été entrepris que chez les sujets porteurs d'une mutation.

1- Extraction de l'ADN génomique :

L'ADN est extrait des leucocytes à partir de sang total prélevé sur EDTA.

a- Lyse des globules rouges :

Après une première centrifugation à 2000 rpm, le plasma est éliminé.

La lyse des hématies est réalisée par choc hypotonique dans un tampon SLR (Tris 2M pH 7.5 ; MgCl₂ 1M ; Na Cl 3M). Après centrifugation, le culot est traité à nouveau deux fois en tampon SLR. Le culot obtenu au final contient les leucocytes débarrassés des hématies.

b- Lyse des globules blancs :

Le culot de globules blancs est repris par 5 à 7 ml de tampon de lyse (Tris 10 mM pH 7.5 ; EDTA 10 mM ; NaCl 100mM ; SDS 0.5%), additionné de protéinase K (1 mg pour 2 ml de tampon de lyse). Cette protéine libère le DNA nucléaire et digère les protéines qui lui sont associées. L'ensemble est placé 1 à 2 heures au bain-marie à 65 °C.

c- Déprotéinisation :

Le lysat subit deux extractions successives des protéines par du phénol, volume à volume : agitation douce 10 mn, centrifugation 5 mn à 2000 rpm, et retrait de la phase phénolique.

Le phénol résiduel est éliminé par une extraction volume à volume par du chloroforme : agitation douce 10 mn, centrifugation 5 mn à 2000 rpm, et élimination de la phase chloroformique inférieure.

d- Précipitation de l'ADN :

50 µl de NaCl 3M sont ajoutés à la phase aqueuse, ainsi que deux volumes d'éthanol absolu pour un volume de phase aqueuse. L'ADN précipite alors sous forme de flocon, il est prélevé et conservé dans l'éthanol absolu à -20°C

Avant utilisation, le précipité est séché, puis remis en solution en tampon Tris-HCl 1mM pH8, EDTA 0.1mM. La concentration d'ADN de cette solution est évaluée par mesure de la densité optique à 260 nm.

2- Amplification génique par PCR :

a- Principe (Figure 5):

L'amplification en chaîne par polymérase est une technique de réplique ciblée in vitro qui permet d'obtenir à partir d'un échantillon peu abondant, des millions de copies d'un fragment d'ADN, en quelques heures (Saiki et al.,1985).

Elle consiste à amplifier un court segment d'ADN compris entre deux régions de séquences connues, par un procédé d'extension d'amorces.

On utilise deux amorces de synthèse de 20 à 25 nucléotides, complémentaires des extrémités 3' des deux brins d'ADN encadrant la séquence à amplifier. Chaque amorce est allongée dans le sens 5'→3' à l'aide d'une ADN polymérase thermostable.

Les produits de chaque étape de synthèse ou cycle d'amplification sont utilisés dans l'étape suivante, l'amplification obtenue est alors exponentielle.

b- La réaction :

La réaction se passe dans un thermocycleur programmé pour effectuer des cycles de températures précis.

Le milieu réactionnel contient :

- L'ADN contenant la séquence à amplifier
- Les deux amorces mono brins complémentaires chacune d'une des extrémités du fragment à amplifier.
- Des désoxynucléotides libres : dATP (désoxyadénosine Tri Phosphate), dCTP (désoxycytidine Tri Phosphate), dGTP (désoxyguanosine Tri Phosphate), dTTP (désoxythymidine Tri Phosphate).
- L'ADN polymérase thermostable, ici la Taq polymérase.

c- Les cycles d'amplification :

La technique comporte des cycles successifs, chaque cycle comprenant une succession de trois phases : dénaturation, hybridation ou anelage, élongation ou extension des amorces.

- La dénaturation : cette étape s'effectue à 95°C pendant environ 30 secondes. Les liaisons faibles qui assurent la cohésion de la double hélice sont rompues pour donner deux simples brins d'ADN
- L'hybridation, ou anelage des amorces sur l'ADN : Le choix de la température pour cette étape s'effectue en fonction de plusieurs paramètres. Elle est calculée en tenant compte de la longueur et de la séquence des amorces, de la concentration ionique du milieu. Elle peut être approchée par une température inférieure de 5°C à la température de dissociation (T_d) la plus basse calculée pour chacune des deux amorces. Cette étape dure environ 30 secondes.
- L'élongation : Les amorces servent de point de départ à la polymérisation du brin d'ADN complémentaire. L'enzyme utilisée ici est la Taq polymérase, extraite de bactéries thermophiles. Elle n'est pas dénaturée par la chaleur et peut ainsi servir à nouveau pour les cycles suivants.

En fin de premier cycle, le nombre de brins obtenus est le double du nombre de brins initial ; Chaque brin va servir à son tour de matrice pendant le cycle suivant.

Le nombre de cycles est généralement compris entre 30 et 40 et on obtient en théorie 2^n copies du brin initial, n étant le nombre de cycles.

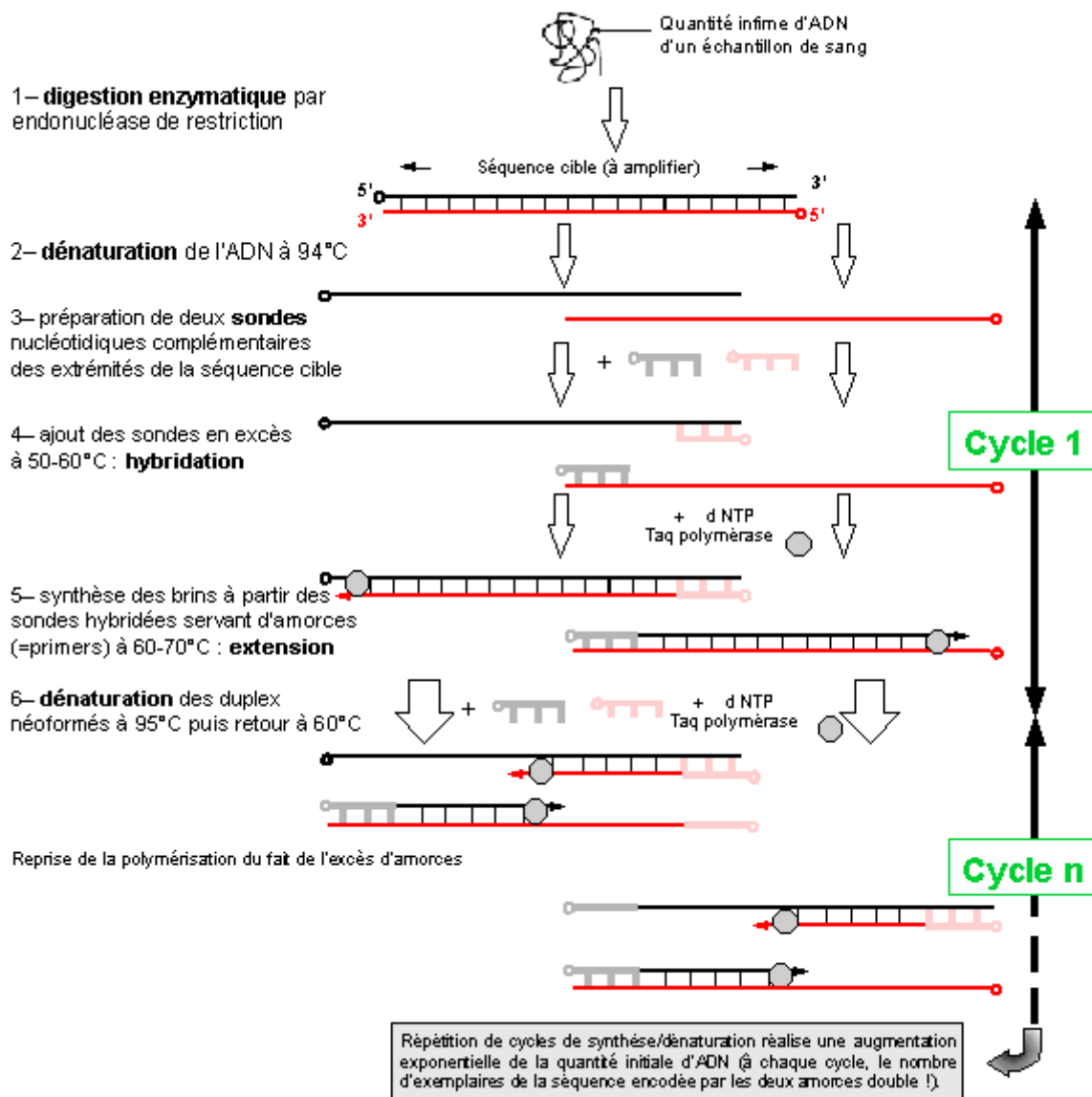


Figure 5 : Principe de l'amplification génique par PCR

d- Facteurs influençant la réaction :

- Le choix des amorces :

Il détermine le segment d'ADN qui sera amplifié, et la spécificité de la réaction dépend de la stabilité du complexe d'hybridation entre l'amorce et l'ADN cible. Le nombre minimum de nucléotides doit être égal à 17 pour que la séquence complémentaire ne soit statistiquement présente qu'en un seul exemplaire dans le génome humain complet. Les séquences des deux amorces doivent présenter le maximum de divergences pour éviter leur cohybridation et le pourcentage en guanine et cytosine doit être compris entre 40 et 60 %. Un logiciel informatique permet la sélection des amorces adéquates.

Leur concentration optimale pour 30 cycles varie entre 10 et 50 pmoles. Elle doit être suffisante pour amorcer la synthèse d'ADN.

- Le nombre de cycles

Il doit être suffisant pour un signal détectable sur gel, mais un nombre trop élevé provoque l'accumulation de produits non spécifiques.

- La température d'hybridation

- Cofacteurs : Concentration en dNTP et en magnésium. Le $MgCl_2$ augmente la température de dissociation de l'ADN double brin, et forme des complexes solubles avec les dNTP. Les valeurs utilisées en général sont 300 μM de dNTP et 1 à 4 μM de $MgCl_2$

e- Conditions d'amplification pour les exons 7 et 13 :

- Choix des amorces :

La séquence des amorces nécessaires à l'amplification des exons 7 et 13 a pu être trouvée sur internet sur le site de Cardiff University.

Exon	Amorce	Séquence	Taille du produit amplifié	Température d'hybridation
7	Y7F	5'GGGACTGACGGGTGATCTCT-3'	186bp	54°C
	Y7R	5'-TTGGAGTGCAAGACTCAAGATT-3'		
13	Y13F	5'-AGGGCAGTGGCATGAGTAAC-3'	242bp	57°C
	Y13R	5'-GGCTATTCCGCTGCTCACTT-3'		

- Conditions de PCR :

Une mise au point a été nécessaire pour déterminer les conditions optimales en température et en concentration de chaque produit.

Le tableau ci-dessous résume les conditions choisies pour chaque exon :

	Exon 7	Exon 13
ADN 100ng/μl	2μl	2μl
dNTP 4 nmol/l	2,5μl	2,5μl
Amorces 20pmol/l	1μl+1μl	1μl+1μl
Taq DNA Pol. Promega 5UI/μl, diluée au 1/4	1μl	1μl
Tampon Promega	5μl	5μl
MgCl ₂	3μl	3μl
Eau	qsp 50μl	qsp 50μl

- Le cycle thermique :

Les échantillons placés dans le thermocycleur subissent tout d'abord une dénaturation à 95°C pendant 5 minutes, avant de commencer le programme de 30 cycles résumé ci-dessous.

	exon 7	exon 13
dénaturation	95°Cx5mn	95°Cx5mn
30 cycles {	dénaturation 95°Cx30sec	95°Cx30sec
	hybridation 54°Cx30sec	57°Cx30sec
	élongation 72°Cx30sec	72°Cx30sec
élongation	72°Cx5mn	72°Cx5mn
conservation	4°C	4°C

La réaction se termine par une étape d'élongation de 5 minutes à 72°C, puis les échantillons sont maintenus à 4°C, ce qui stoppe l'activité enzymatique.

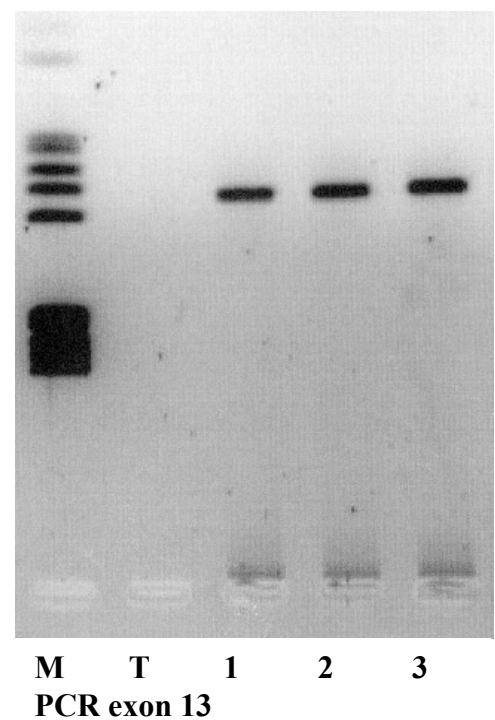
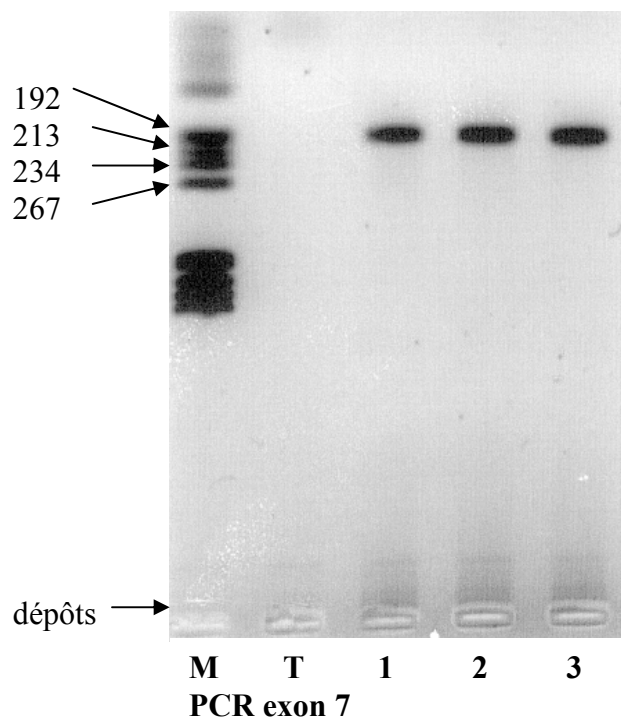
f- Contrôle de l'amplification :

La réaction d'amplification est contrôlée sur gel d'agarose à 2%, additionné de bromure d'éthidium (BET : 2µl pour 100ml de gel). Celui-ci est un agent intercalant de l'ADN, et fluorescent, qui permettra de visualiser les produits de PCR après migration électrophorétique.

10 µl d'échantillon, et 3µl de bleu de bromophénol sont déposés dans chaque puits, (le bleu de bromophénol permet de visualiser le dépôt et la migration de l'échantillon) et sont soumis à une électrophorèse en tampon TEA 1X (TRIS 40 mM, acide acétique 8mM, EDTA 0.4mM, pH8), pendant 45 minutes à 110V.

Le gel est ensuite observé sous UV à 312 nm, il permet de visualiser les fragments d'ADN amplifiés sous forme de bandes fluorescentes. On estime leur taille en comparant leur distance de migration avec un marqueur de poids moléculaire déposé en parallèle des fragments à analyser.

Les photos ci-dessous représentent les contrôles d'amplification des exons 7 et 13 qui génèrent respectivement des fragments de 186 paires de bases, et de 242 paires de bases



M : marqueur de taille pBR322/Hae III
T : Témoin H₂O
1-2-3 : Patients

3- Analyse de restriction :

a- Principe :

Les produits de PCR sont soumis à une digestion enzymatique par des enzymes de restriction. Une enzyme de restriction est capable de reconnaître spécifiquement une courte séquence, de 4 à 10 paires de bases, et de cliver l'ADN au site reconnu. Ce sont des endonucléases, c'est à dire des enzymes capables de cliver les liaisons phosphodiester entre deux nucléotides à l'intérieur d'un acide nucléique. Si une mutation ponctuelle modifie le site de restriction, la

taille des fragments obtenus après digestion enzymatique sera modifiée et décelable après électrophorèse des fragments d'ADN en gel d'agarose.

b- Coupure enzymatique de l'exon 7 :

La mutation la plus fréquemment retrouvée sur l'exon 7 dans la race blanche, p.Tyr165Cys, est recherchée sur les 29 fragments d'ADN amplifiés.

L'enzyme de restriction utilisée est Fnu4HI qui reconnaît la séquence GC↓NGC, et clive l'ADN après la désoxycytidine.

La séquence suivante représente le produit amplifié par PCR, de 186 paires de bases, contenant l'exon 7 :

EXON 7 :72 bp

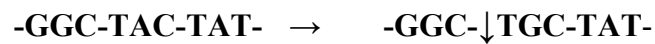
gggactgacgggtgatctct ttgacctctgacctacccacag **GAG-GTG-AAT-CAA-CTC-
TGG-GCT-GGC-CTG-GGC-TAC-TAT-TCT-CGT-GGC-CGG-C↓GG-
C↓TG-CAG-GAG-GGA-GCT-CGG-AAG** *gtaaggggatggcaggagggtaggaaccc
aggagtcttgggtgtcttat aatcttgagtcttgcactccaa*

En italique sont représentées les deux séquences des amorces encadrant le produit amplifié ; l'exon 7 de 72 paires de bases est représenté en majuscules.

L'enzyme Fnu4HI reconnaît sur le gène non muté sa séquence cible à deux endroits et coupe l'amplicon au niveau du 17^e et du 18^e codon de l'exon 7.

Ainsi, le produit amplifié par PCR, de 186 paires de bases, est coupé en théorie après digestion enzymatique, en trois fragments de 92, 3 et 91 paires de bases.

La mutation recherchée p.Tyr165Cys, se situe au niveau du onzième codon de l'exon 7. Elle consiste en une substitution d'une adénine en guanine, ce qui se traduit par une cystéine à la place d'une tyrosine :

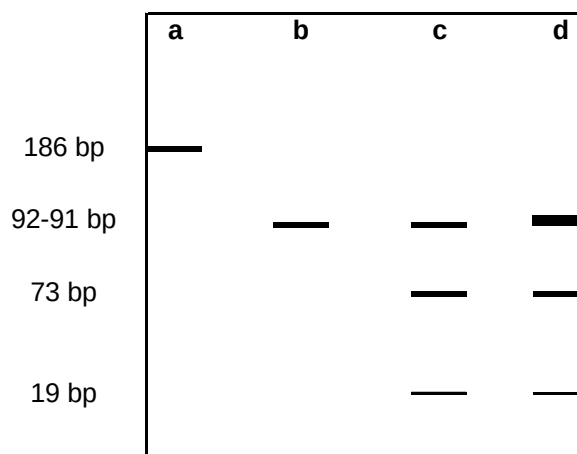


Un nouveau site de restriction est créé, l'enzyme Fnu4HI coupe alors l'exon muté à trois endroits, et l'on obtient :

- Pour une mutation homozygote : 4 fragments de 73, 19, 3 et 91 paires de bases
- Pour une mutation hétérozygote : 5 fragments de 73, 19, 92, 3 et 91 paires de bases

Après digestion enzymatique, chaque échantillon subira une migration électrophorétique afin de séparer les fragments obtenus, et estimer leur taille.

Schématiquement, on obtient selon les cas les profils suivants :



Après digestion enzymatique :

- a : Témoin d'amplification
- b : sujet normal
- c : sujet homozygote
- d : sujet hétérozygote

Les fragments de 19 et 3 paires de bases sont trop petits pour être visualisés à l'électrophorèse. Les fragments de 92 et 91 paires de bases migrent au même endroit. Dans le cas d'une mutation hétérozygote, la bande au niveau 92-91 paires de bases sera plus intense.

Les conditions opératoires sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Amplicons	20µl
Tampon Biolabs 4	4µl
spermidine 20mM	4µl
Fnu4HI 5U/µl	2µl
H ₂ O	10µl

La spermidine permettrait une meilleure accessibilité de l'ADN pour les enzymes de restriction

Après incubation 3 heures à 37°C, les produits de digestion enzymatique sont soumis à une électrophorèse en gel d'agarose à 3 %, additionné de BET (2µl pour 100ml de gel). 18µl de produit digéré et 3µl de bleu de bromophénol sont déposés dans chaque puits, et sont soumis à une électrophorèse en tampon TEA 1X (TRIS 40 mM, acide acétique 8mM, EDTA 0.4mM, pH8), pendant 1 heure à 110V.

Le gel est ensuite observé sous UV à 312 nm, il permet de visualiser les fragments d'ADN digéré sous formes de bandes fluorescentes. On estime leur taille en comparant leur distance de migration avec un marqueur de poids moléculaire déposé en parallèle des fragments à analyser. Un dépôt d'amplicon non digéré par l'enzyme est aussi effectué en parallèle.

c- Coupure enzymatique de l'exon 13 :

La deuxième mutation la plus fréquemment retrouvée dans la race blanche, p.Gly382Asp, est située sur l'exon 13.

L'enzyme de restriction utilisée pour la recherche est Bgl2 qui reconnaît la séquence A↓GATCT, et clive l'ADN après la première désoxyadénosine.

La séquence suivante représente le produit amplifié par PCR, de 242 paires de bases :

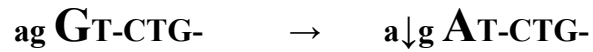
EXON 13 :137 bp

agggcagtggcatgagtaa caagagagaatggaggggaatcggcagctgaggcctgacccctgcctggctgc
cctccctctcag **GT-CTG-CTG-GCA-GGA-CTG-TGG-GAG-TTC-CCG-TCC-**
GTG-ACC-TGG-GAG-CCC-TCA-GAG-CAG-CTT-CAG-CGC-AAG-
GCC-CTG-CTG-CAG-GAA-CTA-CAG-CGT-TGG-GCT-GGG-CCC-
CTC-CCA-GCC-ACG-CAC-CTC-CGG-CAC-CTT-GGG-GAG *gt*
aagtgagcagcggaatagcc

En italique sont représentées les deux séquences des amorces encadrant le produit amplifié, l'exon 13 de 137 paires de bases est représenté en majuscules.

L'enzyme Bgl2 ne reconnaît pas sa séquence cible sur le gène non muté.

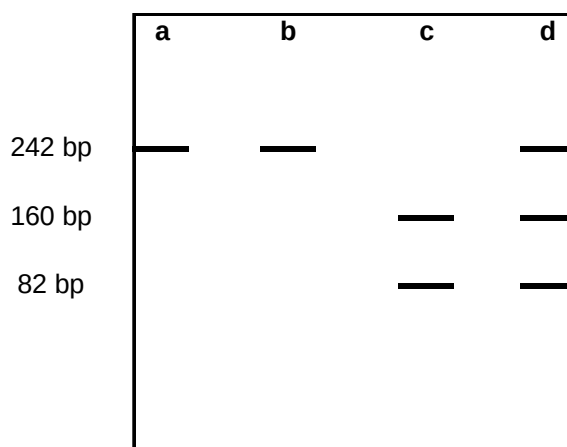
La mutation recherchée, p.Gly382Asp, se situe au niveau du premier codon de l' exon 13. Elle consiste en une substitution d'une guanine en adénine, ce qui se traduit par le remplacement d'un acide aspartique à la place d'une glycine et crée un site de coupure pour l'enzyme Bgl2.



L'enzyme Bgl2 coupe l'exon muté, et l'on obtient :

- Pour une mutation homozygote : 2 fragments de 82, et 160 paires de bases
- Pour une mutation hétérozygote : 3 fragments de 242, 160, et 82 paires de bases

Comme pour l'exon 7, après digestion enzymatique chaque échantillon subira une migration électrophorétique afin de visualiser la taille des fragments obtenus, en les comparant avec un marqueur de poids moléculaire. Schématiquement, on obtient selon les cas les profils suivants :



- a : Témoin d'amplification

Après coupure enzymatique :

- b : Sujet normal
- c : sujet homozygote
- d : sujet hétérozygote

Les conditions opératoires sont résumées dans le tableau suivant :

Amplicons	20µl
Tampon Biolabs Neb3	4µl
spermidine 20mM	4µl
Bgl2 10U/µl	1µl
H ₂ O	11µl

L'incubation dure une nuit au bain-marie à 37 °C. Comme pour l'exon 7, la migration électrophorétique des produits de digestion enzymatique est effectuée en gel d'agarose à 3 %, additionné de BET (2µl pour 100ml de gel). 18µl de produit digéré et 3µl de bleu de bromophénol sont déposés dans chaque puits, et sont soumis à une électrophorèse en tampon TEA 1X

Le gel est ensuite observé sous UV à 312 nm.

4- Séquençage du gène *MYH* :

a- Principe du séquençage (Figure 6):

La séquence de chaque exon du gène *MYH* est déterminée selon la méthode de Sanger (Sanger et al., 1977) qui repose sur l'utilisation de nucléotides particuliers, les didésoxynucléotides qui bloquent la synthèse de l'ADN après leur incorporation.

Le brin d'ADN à séquencer est recopié à partir d'une amorce grâce à une polymérase en présence de dNTP. Si on ajoute au milieu réactionnel des didésoxynucléotides (ddNTP) en petite quantité, l'incorporation de ceux-ci entraîne l'arrêt de la synthèse.

Les quatre didésoxynucléotides sont marqués par des fluorochromes différents. Ils vont être intégrés de façon totalement aléatoire à la chaîne d'ADN en cours de synthèse. Comme on travaille sur un très grand nombre de molécules, il y aura statistiquement autant de sortes de fragments que de fois où chaque base est représentée.

Ces différents fragments sont ensuite dénaturés et séparés par électrophorèse capillaire, et la couleur de chaque bande est déterminée lorsqu'elle passe dans le faisceau d'un laser d'un séquenceur automatique : l'excitation du fluorochrome porté par les didésoxynucléotides provoque une émission de lumière à une longueur d'onde dépendant de la nature du fluorochrome.

L'appareil analyse les données et nous donne des résultats sous forme d'un tracé comme celui représenté page suivante :

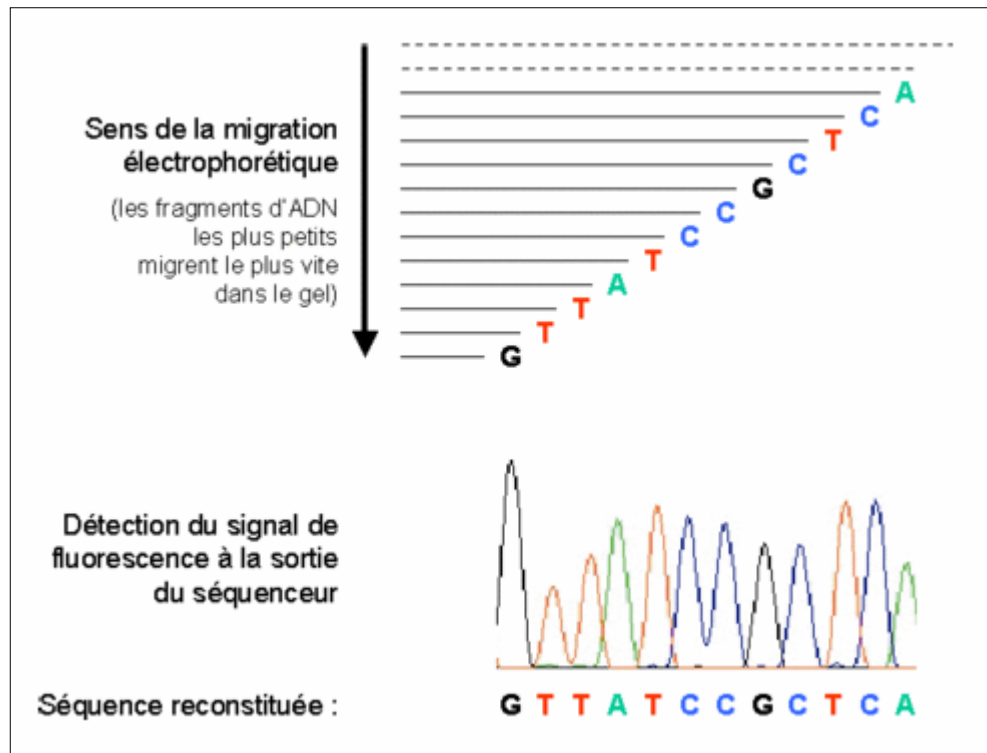


Figure 6 : principe du séquençage automatique

b- Le milieu réactionnel :

Le milieu réactionnel contient :

- Le fragment d'ADN à séquencer, amplifié par PCR et purifié
- L'amorce permettant la synthèse du nouveau brin d'ADN
- Une ADN polymérase
- Les quatre désoxynucléotides (dA, dT, dC, dG)
- Les quatre didésoxy-nucléotides (ddA, ddT, ddC, ddG) marqués par un fluorochrome différent

c- Séquençage des 16 exons du gène *MYH* :

➤ Amplification du gène *MYH* :

▪ Choix des amorces :

Les amorces utilisées pour amplifier les différents exons du gène *MYH* sont décrites dans le tableau page suivante. En annexe sont décrits les 16 fragments amplifiés encadrant les séquences codantes.

▪ Conditions de PCR :

Après mise au point, le tableau suivant récapitule les conditions d'amplification choisies pour chaque exon :

	exon1-4; 6-16	exon5
ADN 100ng/μl	2μl	3μl
dNTP 4 nmol/l	2.5μl	2.5μl
Amorces 20pmol/l	1μl+1μl	1μl+1μl
Tampon Promega	5μl	5μl
MgCl ₂	3μl	3μl
Taq DNA Pol. Promega 5UI/μl, diluée au 1/4	1μl	1μl
Eau	qsp 50μl	qsp 50μl

Amorces choisies pour l'amplification des 16 exons du gène *MYH* :

Exon	Amorce	Sequence	Taille du produit amplifié	Température d'hybridation
1	Y1F	5'-GAAGCTGCGGGAGCTGAAA-3'	133 bp	60 ° C
	Y1R	5'-ATCCCCGACTGCCTGAACC-3'		
2	Y2F	5'-CTGCATTGGCTGGGTCTTT-3'	263 bp	54 ° C
	Y2R	5'-CGCACCTGGCCCTTAGTAAG-3'		
3	Y3F	5'-CTGTGTCCCAAGACCCTGAT-3'	244	57 ° C
	Y3R	5'-CCACTGTCCCTGCTCCTC-3'		
4	Y4F	5'-CTCATCTGGGGTTGCATTGA-3'	167 bp	57 ° C
	Y4R	5'-GGGTTGGCATGAGGACACTG-3'		
5	Y5F	5'-GGGCAGGCCAGCAGTGTC-3'	189 bp	57 ° C
	Y5R	5'-TACACCCACCCCAAAGTAGA-3'		
6	Y6F	5'-TACTTTGGGGTGGGTGTAGA-3'	185 bp	57°C
	Y6R	5'-AAGAGATCACCCGTCAGTCC-3'		
7	Y7F	5'-GGGACTGACGGGTGATCTCT-3'	186 bp	54 ° C
	Y7R	5'-TTGGAGTGCAAGACTCAAGATT-3'		
8	Y8F	5'-CCAGGAGTCTTGGGTGTCTT-3'	240 bp	57 ° C
	Y8R	5'-AGAGGGGCCAAAGAGTTAGC-3'		
9	Y9F	5'-AACTCTTTGGCCCCTCTGTG-3'	196 bp	57 ° C
	Y9R	5'-GAAGGGAACACTGCTGTGAAG-3'		
10	Y10F	5'-GTGCTTCAGGGGTGTCTGC-3'	262 bp	57 ° C
	Y10R	5'-TGTCATAGGGCAGAGTCACTCC-3'		
11	Y11F	5'-TAAGGAGTGACTCTGCCCTATG-3'	248 bp	54 ° C
	Y11R	5'-GCCAAGAGGGGCTTTAGG-3'		
12	Y12F	5'-AGCCCCTCTTGGCTTGAGTA-3'	298 bp	57 ° C
	Y12R	5'-TGCCGATTCCCTCCATTCT-3'		
13	Y13F	5'-AGGGCAGTGGCATGAGTAAC-3'	242 bp	57 ° C
	Y13R	5'-GGCTATTCCGCTGCTCACTT-3'		
14	Y14F	5'-TTGGCTTTTGAGGCTATATCC-3'	256 bp	54 ° C
	Y14R	5'-CATGTAGGAAACACAAGGAAGTA-3'		
15	Y15F	5'-TGAAGTTAAGGGCAGAACACC-3'	205 bp	54 ° C
	Y15R	5'-GTTACCCAGACATTCGTTATT-3'		
16	Y16F	5'-AGGACAAGGAGAGGATTCTCTG-3'	224 bp	54 ° C
	Y16R	5'-GGAATGGGGGCTTTCAGA-3'		

- Les cycles thermiques :

Ils sont résumés pour chaque exon dans le tableau suivant :

	Exons		
	2;7;11;14;15;16	3;4;5;6;8;9;10;12;13	1
dénaturation	95°Cx5mn	95°Cx5mn	95°Cx5mn
30 cycles {	dénaturation	95°Cx30sec	95°Cx30sec
	hybridation	54°Cx30sec	60°Cx30sec
	élongation	72°Cx30sec	72°Cx30sec
élongation	72°Cx5mn	72°Cx5mn	72°Cx5mn
conservation	4°C	4°C	4°C

- Contrôles des amplifications :

Les réactions d'amplification sont contrôlées sur gel d'agarose à 2% additionné de BET, comme précédemment décrits pour les exons 7 et 13.

➤ Séquençage des produits d'amplification :

- Purification des produits d'amplification :

Cette étape permet de séparer les produits d'amplification des amorces et des nucléotides libres en excès. Les produits d'amplification sont déposés sur un gel G100 Sephadex que l'on centrifuge. Les primers et nucléotides non utilisés restent prisonniers du gel.

- Réaction de séquençage :

La réaction de séquençage s'effectue sur les deux brins, en présence :

- Du fragment d'ADN amplifié
- D'une amorce sens ou anti-sens
- D'un mélange contenant les desoxynucléotides, les didésoynucléotides marqués, l'ADN polymérase, un tampon 5X. (kit Big dye terminator-Cycle sequencing kit, version 1.1 (Applied Biosystems))

Amplicon purifié	2µl
Amorce 3pmol/l	1µl
Dye 1-1	2µl
Tampon 5X	3µl
Eau	qsp 20µl

Chaque tube est placé dans un thermocycleur qui va effectuer les cycles suivants :

	Exons		
	2;7;11;14;15;16	3;4;5;6;8;9;10;12;13	1
25 cycles	95°Cx10sec	95°Cx10sec	95°Cx10sec
	54°Cx5sec	57°Cx5sec	60°Cx5sec
	60°Cx4min	60°Cx4min	60°Cx4min

- Purification des produits de séquençage :

Cette étape permet d'éliminer les didésoxynucléotides fluoromarkés non incorporés pendant les cycles de séquençage. On utilise un gel G50 Sephadex sur lequel est déposé le produit de séquençage et qui est centrifugé. Les nucléotides non incorporés restent prisonniers du gel.

- Electrophorèse et analyse des données.

Chaque échantillon est analysé par électrophorèse capillaire sur un séquenceur automatique de type ABI3100.

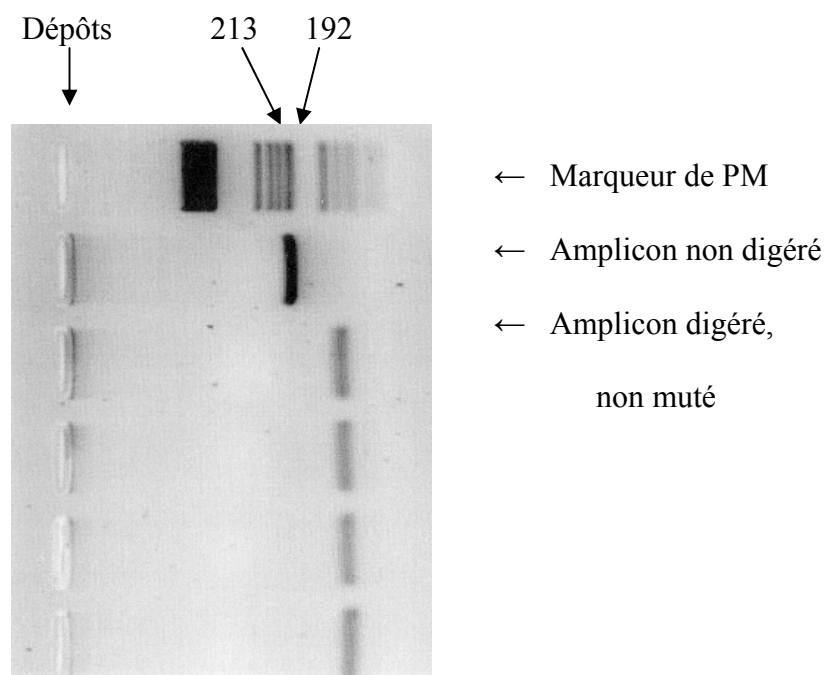
RESULTATS

DISCUSSION

I- RESULTATS :

1- Coupure enzymatique de l'exon 7 :

Les 29 ADN des patients étudiés ont un profil identique après digestion enzymatique : une seule bande correspondant aux fragments de 92 et 91 paires de bases. Aucune mutation p.Tyr165Cys n'est présente.

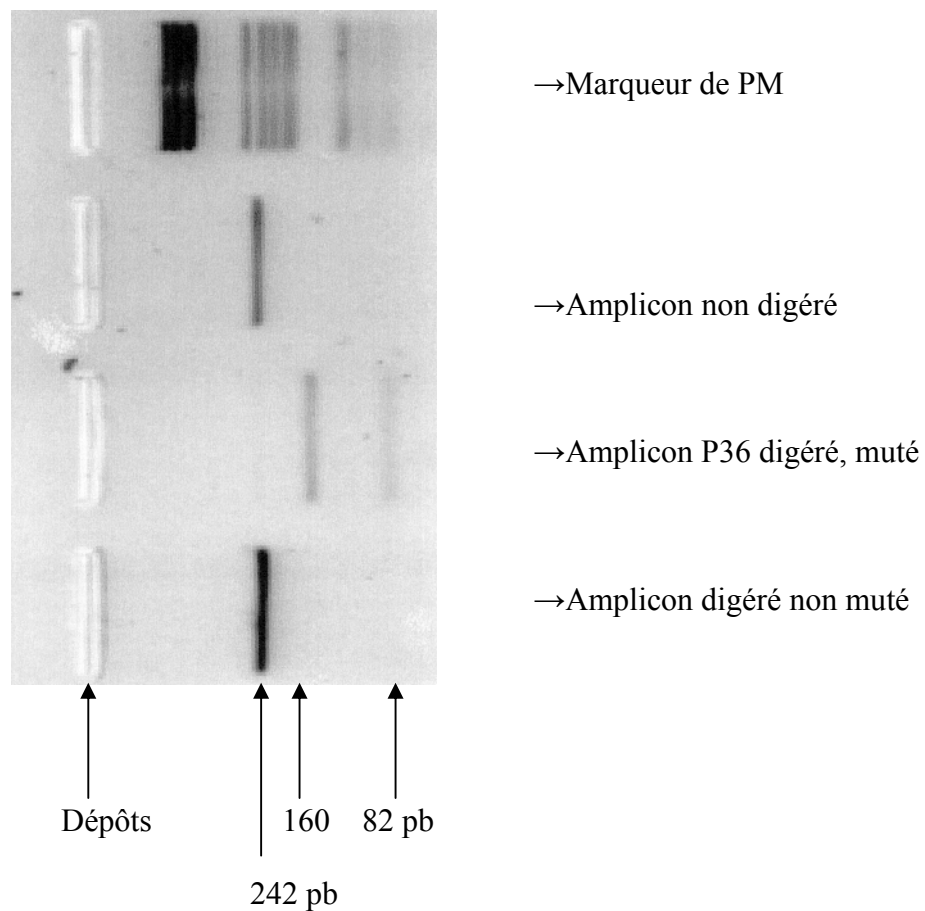


2- Coupure enzymatique de l'exon 13 :

Un seul patient (P36) sur les 29 étudiés présente un profil caractéristique de la mutation p.Gly382Asp à l'état homozygote. L'exon 13 est coupé après digestion enzymatique en deux fragments de 160 et 82 paires de bases.

Un deuxième patient (P151) présente un profil caractéristique de la mutation p.Gly382Asp à l'état hétérozygote : 3 bandes apparaissent à l'électrophorèse, correspondant à l'amplicon intact de 242 paires de bases, et aux deux fragments de 160 et 82 paires de bases.

Les 27 ADN des autres patients ne présentent qu'une seule bande de 242 paires de bases.



3- Séquençage du gène *MYH* :

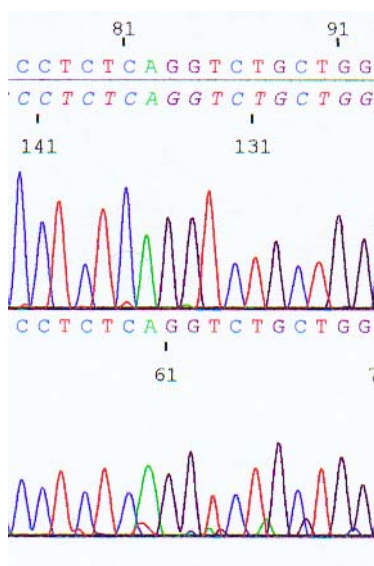
Le gène *MYH* des patients P36 et P151 qui présentent respectivement la mutation p.Gly382Asp à l'état homozygote et hétérozygote, a été séquençé afin de vérifier les résultats obtenus par coupure enzymatique, et pour rechercher une autre mutation éventuelle sur le gène.

Patient P36 :

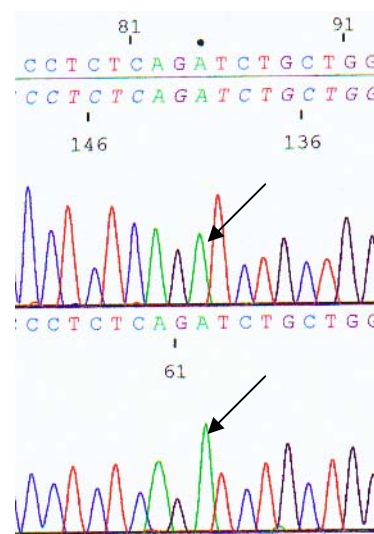
Le tracé suivant rendu par le séquenceur automatique ABI 3100, correspond à la séquence des premiers codons de l'exon 13 pour le patient P36, et pour un patient témoin. On peut observer la mutation p.Gly382Asp sur le gène *MYH* du patient P36, qui consiste en une substitution d'une guanine en une adénine en position 1145.

Aucune autre modification de séquence n'a été retrouvée pour le patient P36 sur les autres exons du gène *MYH*.

Séquence Témoin :



Séquence P36 :

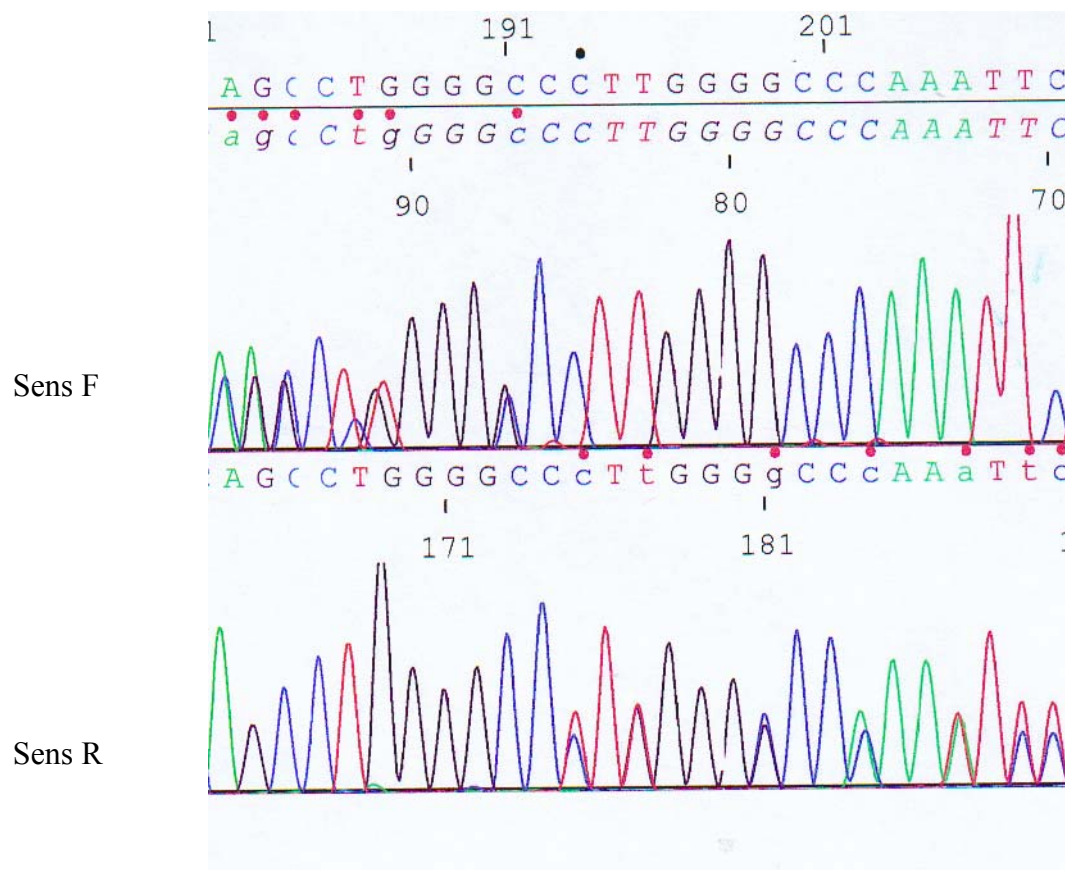


Patient P151 :

La mutation p.Gly382Asp à l'état hétérozygote est confirmée par séquençage automatique.

Une deuxième mutation sur le gène *MYH* a été trouvée au niveau de l'exon 12, elle consiste en une délétion d'une cytosine en position 1075 (c.1075delC) qui entraîne l'apparition d'un codon stop sur l'exon 13.

Ce patient présente donc tout comme le patient P36 une mutation bi-allélique du gène *MYH*.



Séquençage de l'exon 12 du patient P151

II- DISCUSSION :

Environ 15% des cancers colorectaux ont une origine génétique mais les gènes de prédisposition ne sont que partiellement connus et se transmettent généralement de façon dominante.

Pendant de nombreuses années, l'étude des polyposes familiales a reposé essentiellement sur l'analyse du gène *APC*. En 2002 Al-Tassan et al. ont montré qu'un gène de réparation de l'ADN, le gène *MYH*, était responsable d'une forme de polypose colique à adénomes multiples avec une transmission récessive. A ce jour diverses mutations ont été identifiées dans ce gène chez des patients atteints de polypose ou de cancer colorectal. Notre travail a consisté à faire une analyse rétrospective du gène *MYH* dans notre cohorte de 29 patients atteints de polypose colique mais chez qui aucune mutation du gène *APC* n'avait été mise en évidence.

Dans un premier temps, seules les deux mutations les plus fréquemment trouvées dans la population de race blanche (p.Tyr165Cys et p.Gly382Asp) ont été recherchées. La mutation p.Gly382Asp a été mise en évidence chez deux patients : à l'état homozygote chez l'un d'entre eux (P36) et à l'état hétérozygote chez l'autre (P151). Le séquençage des 16 exons du gène *MYH* chez ces 2 patients a permis de confirmer la présence de ces mutations et d'identifier une deuxième anomalie pour le patient P151 : il s'agit d'une délétion d'une base dans l'exon 12 entraînant rapidement l'apparition d'un codon stop dans l'exon 13 (c.1075delC).

Deux patients sur les 29 testés sont donc porteurs d'une mutation biallélique du gène *MYH*. Le patient P36 âgé de 44 ans au diagnostic présentait une polypose étendue du sphincter au bas fond caecal avec une dizaine de polypes adénomateux et trois adénocarcinomes. Ses parents et ses enfants sont indemnes de toute pathologie colorectale.

Pour le patient P151 (52ans) peu de renseignements étaient disponibles : quelques polypes et un frère atteint de polypose. Aucun signe clinique particulier ne distingue donc vraiment les 2 sujets porteurs de mutations du gène *MYH* du reste de la cohorte étudiée. L'âge au diagnostic et l'histoire familiale sont en accord avec les autres cas positifs de la littérature.

La polypose associée à des mutations du gène *MYH*, à présent appelée par différents auteurs « *MYH*- associated polyposis » présente un phénotype indissociable des polyposes adénomateuses familiales classiques (>100 adénomes), ou des polyposes adénomateuses familiales atténuées (<100 adénomes), qui se manifestent par des polypes adénomateux multiples dans le colon et le rectum. Le nombre et l'âge d'apparition de ces adénomes varient notablement d'un sujet à l'autre, cependant l'âge moyen d'apparition des signes cliniques des MAP semble être plus tardif que dans le cas des FAP (55 ans dans l'étude de Sieber et al., 2003 ; 46 ans dans l'étude de Sampson et al., 2003.) ; le nombre d'adénomes ne dépasse pas 1000 dans les différentes études réalisées jusqu'à présent.

Le mode de transmission de cette pathologie est récessif, ce qui modifie la stratégie d'étude d'une famille où la polypose ne semble pas héritée de l'un des parents. L'analyse du gène *MYH* devra être effectuée chez le probant et en cas de résultat positif, chez les collatéraux. Le risque chez les descendants rejoint celui de la population générale et aucune surveillance particulière n'est à prévoir.

A l'issue de ce travail il est difficile de tirer des conclusions quant à la fréquence des mutations du gène *MYH* dans notre population en raison notamment du faible nombre de sujets testés. De plus l'inclusion des patients dans l'étude s'est faite sans critère strict : présence de polypes adénomateux sans mutation dans le gène APC. Les études de Sieber et al. et de Sampson et al. montrent bien que le pourcentage de mutations mises en évidence dépend des critères d'inclusion : la différence du nombre de cas positifs entre les deux études (5,4% et 23%) peut s'expliquer par une sélection plus stricte des patients testés par le 2^e auteur :

exclusion des sujets porteurs de moins de 10 adénomes et ceux dont la pathologie semblait héritée sur le mode dominant. Si l'on exclut de notre série les quatre patients ayant une pathologie vraisemblablement dominante nous obtenons une fréquence de 8% (2/25 patients) ce qui est cohérent avec les autres études de la littérature.

Notre étude s'est focalisée sur les deux mutations les plus fréquentes qui représentent 85% des mutations identifiées dans la population de race blanche. Or selon l'origine ethnique des sujets, le spectre des mutations est différent : la mutation non sens p.Glu466Ter est majoritaire chez les patients indiens. Cela implique alors d'adapter la stratégie d'étude du gène *MYH* à la population étudiée. Malgré tout on ne peut exclure l'implication de variants plus rares au sein d'une même population comme on a pu le constater avec le patient P151; le séquençage de la totalité du gène doit donc être effectué lorsqu'une seule des 2 mutations fréquentes est retrouvée à l'état hétérozygote.

Aucun sujet n'a été trouvé simple hétérozygote. Même si la transmission de la polyposé liée au gène *MYH* semble être récessive, il convient de rester prudent sur le pronostic de ces patients porteurs d'une seule mutation. Une première étude rétrospective française (S. Olschwang, communication personnelle, 2004) semble montrer que chez ces patients les polypes pourraient dégénérer plus rapidement que dans les AFAP et que leur risque de développer un cancer colorectal est accru. Des études ultérieures sont nécessaires pour confirmer ces résultats mais Croitoru et al. ont obtenu des résultats allant dans ce sens : les porteurs de mutation à l'état homozygote ou hétérozygote ont un risque doublé de développer un cancer colorectal.

Dans les différentes publications, aucun variant pathogène n'a été détecté chez les sujets avec adénomes ou cancer colorectal dans les deux autres gènes de réparation par excision de bases (BER), *OGG1* et *MTH*, qui coopèrent avec le gène *MYH* pour éviter l'accumulation des transversions G : C→T :A induites par la présence de la 8-oxoGuanine

dans l'ADN oxydé. Ces gènes pourraient néanmoins être impliqués dans de rares cas de « MAP », ou être responsables d'une pathologie différente non connue à ce jour. Enfin il est possible que des mutations des gènes *OGG1* et *MTH* n'entraînent aucune conséquence clinique du fait d'une redondance fonctionnelle. Des études ultérieures montreront peut être leur implication dans la survenue de différents types de cancer.

L'identification de mutations dans le gène *MYH* permet d'augmenter le nombre des polyposes ou des cancers colorectaux d'origine génétique. Elles permettent en outre une meilleure prise en charge des patients, et la suppression de la surveillance endoscopique chez les apparentés non porteurs de mutation.

ANNEXE

Fragmentes amplifiés encadrant les séquences codantes

EXON 1

gaagctgcgggagctgaaa ctgcgccatcgctactgtcggeggcc ATG
ACACCGCTCGTCTCCCGCCTGAGTCGTCTGTGG
Gtacgtggacttgcggctccgtctcctggcgc gggtcaggcagtcggggat

EXON 2

Ctgactgctttggctgggtcttt ttgtttcag
GCCATCATGAGGAAGCCACGAGCAGCCGTGGGAAGTGGTCACAG
GAAGCAGGCAGCCAGCCAGGAAGGGAGGCAGAAGCATGCTAAG
AACAACAGTCAGGCCAAGCCTTCTGCCTGTGATG
gtaaggaactaggttgtggcccaaggctcattggccatgaaaggcagattcaggctgggaagggattgtgatacg
tatcaagacattaagaga ctactaagggccagggtgcg

EXON 3

Ctgtgtcccaagaccctgat gcacagcctgtgcag
GGATGATTGCTGAGTGTCTTGGGGCCCCAGCAGGCCTGGCCAGG
CAGCCGGAAGAGGTGGTATTGCAGGCCTCTGTCTCCTCATACCA
TCTATTTCAGAGACGTAGCTGAAGTCACAGCCTTCCGAGGGAGCC
TGCTAAGCTGGTACGACCAAGAGAAACGGGACCTACCATGGAGA
AGACGG *Gtaggcaggc gaggagcagggacagtgg*

EXON 4

tcatctggggttgattga cag
GCAGAAGATGAGATGGACCTGGACAGGCGGGCATATGCTG
gtcagtacatctctgagagcagggccactttgcctcgaggcccttgggtctgggggctgtgggccaggtagggg
caggtcag cagtgtcctcatgccaacccc

EXON 5

gggcaggtcagcagtgtc ctcatgccaaacccctttccccag
TGTGGGTCTCAGAGGTCATGCTGCAGCAGACCCAGGTTGCCACT
GTGATCAACTACTATAACCGGATGGATGCAG
gtgactccaggggaggaagggaagggtcatgggtcagaccccagatgagagcc tctactttggggtgggtgta

EXON 6

tactttggggtgggtgtaga
gaaggcttctctaccaccttcaccttgaccttgtctctttctgcctgcctgtggctatag
AAGTGGCCTACACTGCAGGACCTGGCCAGTGCTTCCCTGGAG
gtgagagccaccctagggtaggggaaataggaacaatagag ggactgacgggtgatctctt

EXON 7

gggactgacgggtgatctct ttgacctctgacccacacag
GAGGTGAATCAACTCTGGGCTGGCCTGGGCTACTATTCTCGTGG
CCGCGGCTGCAGGAGGGAGCTCGGAAG
gtaaggggatggcaggaggtaggaacccaggagtcttgggtgtcttat aatcttgagtcttgcaactccaa

EXON 8

ccaggagtcttgggtgtctt ataatcttgagtcttgcaactccaatcag
GTGGTAGAGGAGCTAGGGGGGCCACATGCCACGTACAGCAGAGA
CCCTGCAGCAGCTCCTGCCTGGCGTGGGGCGCTACACAGCTGGG
GCCATTGCCTCTATCGCCTTTGGCCAG
Gtgatctcacagccccccactttgtgctgcccagcctccttctcccagcccagg
ctaactctttggccccctct

EXON 9

aactctttggccccctctgtg ccag
GCAACCGGTGTGGTGGATGGCAACGTAGCACGGGTGCTGTGCCG
TGTCCGAGCCATTGGTGCTGATCCCAGCAGCACCTTGTTTCCCA
GCAGCTCTG
gtaggatgttgggtaacaagggtgcttcaggggtgtctgcaaaggagctctg cttcacagcagtgttc

EXON 10

gtgcttcaggggtgtctgc aaaggagctctgcttcacagcagtgttcccttcttttag
GGGTCTAGCCCAGCAGCTGGTGGACCCAGCCCGGCCAGGAGATT
TCAACCAAGCAGCCATGGAGCTAGGGGGCCACAGTGTGTACCCCA
CAGCGCCCACTGTGCAGCCAGTGCCCTGTGGAGAGCCTGTGCCG
GGCACGCCAGAGA
gtaagcctactggggaaggggcagtgagaagtcctaa ggagtgactctgccctatgaca

EXON 11

taaggagtgactctgccctatg acactcaaccctgtgcctctcag
GTGGAGCAGGAACAGCTCTTAGCCTCAGGGAGCCTGTCGGGCAG
TCCTGACGTGGAGGAGTGTG
gtgagcaccaaacctagccccaccccaacccttctggcccagtcagaagccccattccagttcttctctaacct
gagtaagattctgcagaacccggccaaagcccactctctaggttggcc cctaaagccccctcttggc

EXON 12

agccctcttggttgagta ggggtcggggatctccgttcccag
CTCCCAACACTGGACAGTGCCACCTGTGCCTGCCTCCCTCGGAG
CCCTGGGACCAGACCCTGGGAGTGGTCAACTTCCCCAGAAAGGC
CAGCCGCAAGCCCCCCCAGGGAGGAGAGCTCTGCCACCTGTGTTC
TGGAACAGCCTGGGGCCCTTGGGGCCCAAATTCTGCTGGTGCAG
AGGCCCAACTCAG
gtacctggatactgggcgtggagggcagtgggcatgagtaacaagag agaatggaggggaatcggca

EXON 13

agggcagtgggcatgagtaac
aagagagaatggaggggaatcggcagctgaggcctgaccctgcctggctgccc
tccctctcag
GTCTGCTGGCAGGACTGTGGGAGTTCCCGTCCGTGACCTGGGAG
CCCTCAGAGCAGCTTCAGCGCAAGGCCCTGCTGCAGGAACTACA
GCGTTGGGCTGGGCCCCCTCCCAGCCACGCACCTCCGGCACCTTG
GGGAG
gt aagtgagcagcggaatagcc

EXON 14

ttggctttgaggctatatcc acaggcctatttgaaccccttgacccttccctccag
GTTGTCCACACCTTCTCTCACATCAAGCTGACATATCAAGTATAT
GGGCTGGCCTTGGAAGGGCAGACCCCAGTGACCACCGTACCACC
AGGTGCTCGCTGGCTGACGCAGGAGGAATTCACACCGCAGCTG
TTTCCACCGCCATGAAAAAG
gcactacctttgttgtttgttg tacttccttggtttcctacatg

EXON 15

tgaagttaagggcagaacacc ggtttatctcttttgcaaaaagtgccagccctcacctccctgtcttcttgtctag
GTTTTCCGTGTGTATCAGGGCCAACAGCCAGGGACCTGTATG
gtaagtctcctaggcctctcccaaccgtgtctccccaggcctgagtcctaggttttagtcagta
aataacgaatgtctgggtgaac

EXON 16

aggacaaggagaggattctct gctccccctcccccaactacaaggcctccctccttccatttttcacag
GGTTCCAAAAGGTCCCAGGTGTCCTCTCCGTGCAGTCGGAAAAA
GCCCCGCATGGGCCAGCAAGTCCTGGATAATTTCTTTTCGGTCTC
ACATCTCCACTGATGCACACAGCCTCAACAGTGCAGCCCAG TGA
cacc tctgaaagcccccathtt

En majuscules sont représentées les régions codantes, en italique les séquences des amorces encadrant les fragments à amplifier.

BIBLIOGRAPHIE

AL-TASSAN N, CHMIEL NH, MAYNARD J, FLEMING N, LIVINGSTON AL, WILLIAMS GT, HODGES AK, DAVIES DR, DAVID SS, SAMPSON JR, CHEADLE JP.

Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors.

Nat Genet. 2002 Feb;30(2):227-32.

BODMER WF, BAILEY CJ, BODMER J, BUSSEY HJ, ELLIS A, GORMAN P, LUCIBELLO FC, MURDAY VA, RIDER SH, SCAMBLER P, ET AL

Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5.

Nature. 1987 Aug 13-19;328(6131):614-6.

BOLDOGH I, MILLIGAN D, LEE MS, BASSETT H, LLOYD RS, MCCULLOUGH AK.

hMYH cell cycle-dependent expression, subcellular localization and association with replication foci: evidence suggesting replication-coupled repair of adenine:8-oxoguanine mispairs.

Nucleic Acids Res. 2001 Jul 1;29(13):2802-9.

CHEADLE JP, DOLWANI S, SAMPSON JR.

Inherited defects in the DNA glycosylase MYH cause multiple colorectal adenoma and carcinoma.

Carcinogenesis. 2003 Jul;24(7):1281-2;

CHEADLE JP, SAMPSON JR

Exposing the MYtH about base excision repair and human inherited disease.

Hum Mol Genet. 2003 Oct 15;12 Spec No 2:R159-65. Epub 2003 Aug 05.

CHMIEL NH, GOLINELLI MP, FRANCIS AW, DAVID SS.

Efficient recognition of substrates and substrate analogs by the adenine glycosylase MutY requires the C-terminal domain.

Nucleic Acids Res. 2001 Jan 15;29(2):553-64.

CHMIEL NH, LIVINGSTON AL, DAVID SS.

Insight into the functional consequences of inherited variants of the hMYH adenine glycosylase associated with colorectal cancer: complementation assays with hMYH variants and pre-steady-state kinetics of the corresponding mutated E.coli enzymes.

J Mol Biol. 2003 Mar 21;327(2):431-43.

CROITORU ME, CLEARY SP, DI NICOLA N, MANNO M, SELANDER T, ARONSON M, REDSTON M, COTTERCHIO M, KNIGHT J, GRYFE R, GALLINGER S

Association between biallelic and monoallelic germline MYH gene mutations and colorectal cancer risk.

J Natl Cancer Inst. 2004 Nov 3;96(21):1631-4.

DENIS MG , LUSTENBERGER P

Polypose adénomateuse familiale et gène APC.

Médecine/sciences 1995, 11 :443-6

DOBBIE Z, SPYCHER M, HURLIMAN R, AMMANN R, AMMANN T, ROTH J, MULLER A, MULLER H, SCOTT RJ

Mutational analysis of the first 14 exons of the adenomatous polyposis coli (APC) gene.
Eur J Cancer. 1994;30A(11):1709-13.

DOBBIE Z, SPYCHER M, MARY JL, HANER M, GULDENSCHUH I, HURLIMAN R, AMMAN R, ROTH J, MULLER H, SCOTT RJ.

Correlation between the development of extracolonic manifestations in FAP patients and mutations beyond codon 1403 in the APC gene.
J Med Genet. 1996 Apr;33(4):274-80.

ENHOLM S, HIENONEN T, SUOMALAINEN A, LIPTON L, TOMLINSON I, KARJA V, ESKELINEN M, MECKLIN JP, KARHU A, JARVINEN HJ, AALTONEN LA.

Proportion and phenotype of MYH-associated colorectal neoplasia in a population-based series of Finnish colorectal cancer patients.
Am J Pathol. 2003 Sep;163(3):827-32.

FEARNHEAD NS, BRITTON MP, BODMER WF.

The ABC of APC.
Hum Mol Genet. 2001 Apr;10(7):721-33.

FEARNHEAD NS.

Familial adenomatous polyposis and MYH.
Lancet. 2003 Jul 5;362(9377):5-6.

FLEISCHMANN C, PETO J, CHEADLE J, SHAH B, SAMPSON J, HOULSTON RS.

Comprehensive analysis of the contribution of germline MYH variation to early-onset colorectal cancer.
Int J Cancer. 2004 Apr 20;109(4):554-8.

FROMME JC, BANERJEE A, HUANG SJ, VERDINE GL

Structural basis for removal of adenine mispaired with 8-oxoguanine by MutY adenine DNA glycosylase.
Nature. 2004 Feb 12;427(6975):652-6.

GISMONDI V, META M, BONELLI L, RADICE P, SALA P, BERTARIO L, VIEL A, FORNASARIG M, ARRIGONI A, GENTILE M, PONZ DE LEON M, ANSELM I, MARENI C, BRUZZI P, VARESCO L

Prevalence of the Y165C, G382D and 1395delGGA germline mutations of the MYH gene in Italian patients with adenomatous polyposis coli and colorectal adenomas.
Int J Cancer. 2004 May 1;109(5):680-4.

GRANDJOUAN S

Génétique moléculaire des prédispositions familiales aux cancers coliques.
Hépto-Gastro n°1, vol.2, Jan-Feb 1995, p.69-82

GRODEN J, THLIVERIS A, SAMOWITZ W, CARLSON M, GELBERT L, ALBERTSEN H, JOSLYN G, STEVENS J, SPIRIO L, ROBERTSON M, ET AL.
Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene.
Cell. 1991 Aug 9;66(3):589-600.

HALFORD SE, ROWAN AJ, LIPTON L, SIEBER OM, PACK K, THOMAS HJ, HODGSON SV, BODMER WF, TOMLINSON IP
Germline mutations but not somatic changes at the MYH locus contribute to the pathogenesis of unselected colorectal cancers.
Am J Pathol. 2003 May;162(5):1545-8.

HAYASHI H, TOMINAGA Y, HIRANO S, MCKENNA AE, NAKABEPPU Y, MATSUMOTO Y
Replication-associated repair of adenine:8-oxoguanine mispairs by MYH.
Curr Biol. 2002 Feb 19;12(4):335-9.

HORII A, NAKATSURU S, ICHII S, NAGASE H, NAKAMURA Y.
Multiple forms of the APC gene transcripts and their tissue-specific expression.
Hum Mol Genet. 1993 Mar;2(3):283-7.

ISIDRO G, LARANJEIRA F, PIRES A, LEITE J, REGATEIRO F, CASTRO E SOUSA F, SOARES J, CASTRO C, GIRIA J, BRITO MJ, MEDEIRA A, TEIXEIRA R, MORNA H, GASPAR I, MARINHO C, JORGE R, BREHM A, RAMOS JS, BOAVIDA MG.
Germline MUTYH (MYH) mutations in Portuguese individuals with multiple colorectal adenomas.
Hum Mutat. 2004 Oct;24(4):353-4.

JONES S, EMMERSON P, MAYNARD J, BEST JM, JORDAN S, WILLIAMS GT, SAMPSON JR, CHEADLE JP.
Biallelic germline mutations in MYH predispose to multiple colorectal adenoma and somatic G:C-->T:A mutations.
Hum Mol Genet. 2002 Nov 1;11(23):2961-7.

JONES S, LAMBERT S, WILLIAMS GT, BEST JM, SAMPSON JR, CHEADLE JP
Increased frequency of the k-ras G12C mutation in MYH polyposis colorectal adenomas.
Br J Cancer. 2004 Apr 19;90(8):1591-3.

KINZLER KW, NILBERT MC, SU LK, VOGELSTEIN B, BRYAN TM, LEVY DB, SMITH KJ, PREISINGER AC, HEDGE P, MCKECHNIE D, ET AL.
Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21.
Science. 1991 Aug 9;253(5020):661-5.

KINZLER KW, VOGELSTEIN B.
Lessons from hereditary colorectal cancer.
Cell. 1996 Oct 18;87(2):159-70.

LIPTON L, TOMLINSON I.

The multiple colorectal adenoma phenotype and MYH, a base excision repair gene.
Clin Gastroenterol Hepatol. 2004 Aug;2(8):633-8.

LU AL, LI X, GU Y, WRIGHT PM, CHANG DY

Repair of oxidative DNA damage: mechanisms and functions.
Cell Biochem Biophys. 2001;35(2):141-70.

MCGOLDRICK JP, YEH YC, SOLOMON M, ESSIGMANN JM, LU AL.

Characterization of a mammalian homolog of the Escherichia coli MutY mismatch repair protein.
Mol Cell Biol. 1995 Feb;15(2):989-96.

MICHAELS ML, MILLER JH.

The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine).
J Bacteriol. 1992 Oct;174(20):6321-5.

MITRA S

Response to the Letter titled, "Inherited defects in the DNA glycosylase MYH cause multiple colorectal adenoma and carcinoma," written by J. P. Cheadle.
Carcinogenesis. 2003 May 9

MIYAKI M, KONISHI M, KIKUCHI-YANOSHITA R, ENOMOTO M, IGARI T, TANAKA K, MURAOKA M, TAKAHASHI H, AMADA Y, FUKAYAMA M, ET AL.

Characteristics of somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in colorectal tumors.
Cancer Res. 1994 Jun 1;54(11):3011-20.

MIYOSHI Y, NAGASE H, ANDO H, HORII A, ICHII S, NAKATSURU S, AOKI T, MIKI Y, MORI T, NAKAMURA Y

Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene.
Hum Mol Genet. 1992 Jul;1(4):229-33.

MORIN PJ, VOGELSTEIN B, KINZLER KW.

Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Jul 23;93(15):7950-4

MORIN PJ, SPARKS AB, KORINEK V, BARKER N, CLEVERS H, VOGELSTEIN B, KINZLER KW.

Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC.
Science. 1997 Mar 21;275(5307):1787-90

MORIYA M, GROLLMAN AP

Mutations in the mutY gene of Escherichia coli enhance the frequency of targeted G:C-->T:a transversions induced by a single 8-oxoguanine residue in single-stranded DNA.
Mol Gen Genet. 1993 May;239(1-2):72-6.

NAGASE H, MIYOSHI Y, HORII A, AOKI T, OGAWA M, UTSUNOMIYA J, BABA S, SASAZUKI T, NAKAMURA Y.

Correlation between the location of germ-line mutations in the APC gene and the number of colorectal polyps in familial adenomatous polyposis patients.
Cancer Res. 1992 Jul 15;52(14):4055-7.

NAGASE H, NAKAMURA Y.

Mutations of the APC (adenomatous polyposis coli) gene.
Hum Mutat. 1993;2(6):425-34.

NGHIEM Y, CABRERA M, CUPPLES CG, MILLER JH

The mutY gene: a mutator locus in Escherichia coli that generates G.C----T.A transversions.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Apr;85(8):2709-13.

NOLL DM, GOGOS A, GRANEK JA, CLARKE ND.

The C-terminal domain of the adenine-DNA glycosylase MutY confers specificity for 8-oxoguanine. adenine mispairs and may have evolved from MutT, an 8-oxo-dGTPase.
Biochemistry. 1999 May 18;38(20):6374-9.

ROLDAN-ARJONA T, WEI YF, CARTER KC, KLUNGLAND A, ANSELMINO C, WANG RP, AUGUSTUS M, LINDAHL T.

Molecular cloning and functional expression of a human cDNA encoding the antimutator enzyme 8-hydroxyguanine-DNA glycosylase.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Jul 22;94(15):8016-20.

RUBINFELD B, SOUZA B, ALBERT I, MUNEMITSU S, POLAKIS P.

The APC protein and E-cadherin form similar but independent complexes with alpha-catenin, beta-catenin, and plakoglobin.
J Biol Chem. 1995 Mar 10;270(10):5549-55.

RUBINFELD B, ALBERT I, PORFIRI E, FIOLE C, MUNEMITSU S, POLAKIS P.

Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly.
Science. 1996 May 17;272(5264):1023-6.

SAMPSON JR, DOLWANI S, JONES S, ECCLES D, ELLIS A, EVANS DG, FRAYLING I, JORDAN S, MAHER ER, MAK T, MAYNARD J, PIGATTO F, SHAW J, CHEADLE JP.

Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutations of MYH.
Lancet. 2003 Jul 5;362(9377):39-41.

SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR.

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1977 Dec;74(12):5463-7

SAIKI RK, SCHARF S, FALOONA F, MULLIS KB, HORN GT, ERLICH HA, ARNHEIM N

Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.
Science. 1985 Dec 20;230(4732):1350-4.

SAKUMI K, FURUICHI M, TSUZUKI T, KAKUMA T, KAWABATA S, MAKI H, SEKIGUCHI M.

Cloning and expression of cDNA for a human enzyme that hydrolyzes 8-oxo-dGTP, a mutagenic substrate for DNA synthesis.
J Biol Chem. 1993 Nov 5;268(31):23524-30.

SHIBUTANI S, TAKESHITA M, GROLLMAN AP

Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG.
Nature. 1991 Jan 31;349(6308):431-4.

SHINMURA K, YAMAGUCHI S, SAITOH T, TAKEUCHI-SASAKI M, KIM SR, NOHMI T, YOKOTA J.

Adenine excisional repair function of MYH protein on the adenine:8-hydroxyguanine base pair in double-stranded DNA.
Nucleic Acids Res. 2000 Dec 15;28(24):4912-8.

SIEBER OM, LIPTON L, CRABTREE M, HEINIMANN K, FIDALGO P, PHILLIPS RK, BISGAARD ML, ORNTOFT TF, AALTONEN LA, HODGSON SV, THOMAS HJ, TOMLINSON IP

Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH.
N Engl J Med. 2003 Feb 27;348(9):791-9.

SLUPSKA MM, BAIKALOV C, LUTHER WM, CHIANG JH, WEI YF, MILLER JH.

Cloning and sequencing a human homolog (hMYH) of the Escherichia coli mutY gene whose function is required for the repair of oxidative DNA damage.
J Bacteriol. 1996 Jul;178(13):3885-92.

SLUPSKA MM, LUTHER WM, CHIANG JH, YANG H, MILLER JH

Functional expression of hMYH, a human homolog of the Escherichia coli MutY protein.
J Bacteriol. 1999 Oct;181(19):6210-3.

SORAVIA C, BERK T, MADLENSKY L, MITRI A, CHENG H, GALLINGER S, COHEN Z, BAPAT B.

Genotype-phenotype correlations in attenuated adenomatous polyposis coli.
Am J Hum Genet. 1998 Jun;62(6):1290-301.

SPIRIO L, OLSCHWANG S, GRODEN J, ROBERTSON M, SAMOWITZ W, JOSLYN G, GELBERT L, THLIVERIS A, CARLSON M, OTTERUD B, ET AL.

Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis.
Cell. 1993 Dec 3;75(5):951-7.

THOMAS G , MULERIS M, SALMON R.

La génétique du cancer colorectal.
Médecine/Sciences 1988 ;4 :274-80

VENESIO T, MOLATORE S, CATTANEO F, ARRIGONI A, RISIO M, RANZANI GN.

High frequency of MYH gene mutations in a subset of patients with familial adenomatous polyposis.
Gastroenterology. 2004 Jun;126(7):1681-5.

WALLIS YL, MACDONALD F, HULTEN M, MORTON JE, MCKEOWN CM, NEOPTOLEMOS JP, KEIGHLEY M, MORTON DG.

Genotype-phenotype correlation between position of constitutional APC gene mutation and CHRPE expression in familial adenomatous polyposis.
Hum Genet. 1994 Nov;94(5):543-8.

WANG L, BAUDHUIN LM, BOARDMAN LA, STEENBLOCK KJ, PETERSEN GM, HALLING KC, FRENCH AJ, JOHNSON RA, BURGART LJ, RABE K, LINDOR NM, THIBODEAU SN

MYH mutations in patients with attenuated and classic polyposis and with young-onset colorectal cancer without polyps.
Gastroenterology. 2004 Jul;127(1):9-16.

Aurélie VIGNE-AGUINET

IMPLICATION DU GENE MYH DANS LES POLYPOSES ADENOMATEUSES FAMILIALES

Résumé :

Un nouveau gène a récemment été impliqué dans la survenue de polypes adénomateux et de cancers colorectaux. Il s'agit du gène *MYH*, gène de réparation de l'ADN. Le phénotype de la maladie associée à des mutations de ce gène est proche du phénotype des polyposes adénomateuses familiales, mais le mode de transmission semble être récessif. Ce travail a consisté à faire une analyse rétrospective du gène *MYH* dans une cohorte de 29 patients atteints de polypose colique mais chez qui aucune mutation du gène *APC* n'avait été mise en évidence. Dans un premier temps, seules les mutations les plus fréquemment trouvées dans la population de race blanche, p.Tyr165Cys et p.Gly382Asp, ont été recherchées. Puis le séquençage des 16 exons du gène *MYH* chez les patients porteurs de l'une ou l'autre de ces mutations a été effectué. Deux patients sont porteurs d'une mutation biallélique, l'un est homozygote pour la mutation p.Gly382Asp, l'autre présente une double mutation hétérozygote : p.Gly382Asp, et c.1075delC. Aucun patient n'est porteur d'une seule mutation hétérozygote. L'identification de mutations dans le gène *MYH* permet d'augmenter le nombre des polyposes ou des cancers colorectaux d'origine génétique. Elle permet en outre une meilleure prise en charge des patients, et la suppression de la surveillance endoscopique chez les apparentés non porteurs de mutation.

MOTS CLES : MYH ; POLYPOSES ADENOMATEUSES FAMILIALES ;
CANCER COLORECTAL

Président : Monsieur. le Professeur J-M. BARD
Faculté de Pharmacie de Nantes
Membres du Jury : Madame le Professeur V. DAVID, Université de Rennes I
Monsieur le Professeur J-F. BRETAGNE, Université de Rennes I
Madame le Docteur C. DUGAST, Génétique médicale,
C.H.U. Hôpital Sud, Rennes

Aurélie VIGNE-AGUINET
5 rue de l'étang
35250 SAINT AUBIN D'AUBIGNE