

## 9

## Stratégies pour l'identification de mutations germinales de petite taille des gènes *BRCA1* et *BRCA2* dans des familles non explorées

H. SOBOL, D. STOPPA-LYONNET, B. BRESSAC-DE-PAILLERETS,  
S. OLSCHWANG

---

### Indication d'une recherche de mutation constitutionnelle

Les formes familiales représentent de l'ordre de 4 à 10% des cancers du sein et de l'ovaire. En France seraient concernées chaque année de 1300 à 2600 personnes pour le cancer du sein et environ 200 à 400 sujets pour les cancers de l'ovaire, ainsi que leur apparentés proches.

La recherche de mutations germinales des gènes de prédisposition au cancer du sein à visée diagnostique s'inscrit dans une réalité médicale (clinique et biologique) parfois complexe et dont les paramètres ne sont pas toujours maîtrisables.

Bien que certaines caractéristiques commencent à se dégager (Eisinger et coll., 1996 ; Marcus et coll., 1996 ; The Breast Cancer Linkage Consortium, 1997), on manque actuellement d'éléments objectifs permettant de distinguer les cas héréditaires des cas sporadiques. Par ailleurs, dans le contexte légal actuel, il est souvent difficile d'avoir accès aux confirmations diagnostiques des lésions rapportées durant la consultation (comptes-rendus histologiques et opératoires, matériel anatomopathologique...). L'analyse initiale reposera donc essentiellement sur des éléments d'ordre anamnétique. Un autre élément de confusion est l'existence d'une hétérogénéité génétique, plusieurs gènes peuvent être à l'origine des mêmes présentations cliniques (cf. chapitres sur les aspects cliniques et moléculaires). Ainsi deux gènes majeurs, *BRCA1* et *BRCA2* (Miki et coll., 1994 ; Wooster et coll., 1995), ont été isolés et un troisième, *BRCA3*, serait localisé sur le chromosome 8 (Kerangueven et coll., 1995), mais il pourrait en exister d'autres non encore identifiés (Rebbeck et coll., 1996). Il faut signaler également qu'à côté de ces mutations à forte pénétrance, on évoque la participation de mutations à pénétrance plus faible

(Barker et coll., 1996), voire de mutations qui confèreraient une certaine protection vis à vis du cancer du sein (Dunning et coll., 1997).

D'un point de vue pratique, des critères cliniques ont été retenus afin d'orienter les analyses moléculaires :

- critère 1 : au moins 3 sujets atteints de cancer du sein et ou de l'ovaire chez des apparentés de premier ou deuxième degré dans la même branche parentale ;
- critère 2 : deux cas de cancers du sein chez des apparentés de premier degré si l'un deux est diagnostiqué avant 40 ans ou bilatéral, ou un cancer du sein et de l'ovaire ou deux cancers de l'ovaire (tumeur de l'ovaire quel que soit l'âge) ;
- critère 3 : hors critères familiaux cités précédemment, cas précoces, tumeurs primitives multiples, cancers du sein chez l'homme.

On recherchera également des éléments cliniques pouvant orienter vers un syndrome autre que les familles de cancers du sein seul ou sein-ovaire et notamment la maladie de Cowden et le syndrome de Li-Fraumeni (Sobol et coll., 1994).

## Démarche méthodologique

### Éléments cliniques

Du fait des limitations énumérées précédemment, les analyses de liaison génétique (diagnostic indirect) n'auront qu'une place restreinte dans la pratique courante, car pouvant être prise en défaut et conduire à des conclusions erronées notamment en raison de l'existence de cas sporadiques dans les familles, d'agrégations fortuites de tumeurs, de tumeurs bénignes ou de carcinomes in situ (CIS) pouvant être rapportées faussement comme des cancers invasifs, de la méconnaissance de l'histoire familiale, de la non-accessibilité des sujets atteints, ou d'une double hérédité (Stoppa-Lyonnet et coll., 1996 ; Boyd et coll., 1995 ; Ramus et coll., 1997). En conséquence, dans le cadre du transfert de technologie, on privilégiera les techniques de recherche de mutations couplées de préférence à une méthode de criblage, du fait de la taille importante des gènes *BRCA1* et *2* et de l'absence de point chaud de mutations (cf. « Méthodes pour la détection de mutations inconnues » chap. 8).

Afin d'optimiser encore les résultats, on testera en priorité, pour identifier une éventuelle mutation germinale, parmi les sujets étudiés au sein d'une même famille, les patients étant les plus probablement des cas génétiques (position dans la généalogie, âge précoce des atteintes, cancer de l'ovaire, cancer du sein chez l'homme, tumeurs primitives multiples...). Cependant pour de nombreuses raisons et en premier lieu du fait de la mortalité, les possibilités de tester les membres d'une même famille peuvent être limitées, ce qui impose d'être prudent devant un résultat négatif.

Certains éléments peuvent orienter dans le choix du gène à tester en priorité (Stratton, 1996). Les mutations germinales du gène *BRCA1* sont les plus fréquentes et elles prédisposent à la grande majorité des familles aux cancers du sein et de l'ovaire et dans près de la moitié des familles aux cancer du sein seul. *BRCA2* prédomine dans les populations anglo-saxonnes et nordiques. Dans ces familles, les cancers de l'ovaire sont plus rares et les cancers du sein chez l'homme plus fréquents. Il est possible également que le spectre d'expression tumoral soit élargi comparé à *BRCA1* (cancers de l'estomac, du pancréas, hémopathies malignes) (Thorlacius et coll., 1996), pouvant même aller jusqu'à mimer un syndrome de Lynch (cf. chap. 7 sur les aspects cliniques et moléculaires).

### Éléments biologiques et techniques

Des mutations récurrentes (ancêtre commun, ex : del AG 185) ou fréquentes (sans ancêtre commun), parfois associées à des populations spécifiques ont été décrites (Roa et coll., 1996 ; Couch et coll., 1996), ce qui peut inciter à les rechercher en priorité (Rebbeck et coll., 1996 ; Thorlacius et coll., 1996 ; Shattuck-Eidens et coll., 1995).

Il n'existe pas de technique parfaite, c'est-à-dire qui soit à la fois fiable à 100% (absence de faux positifs et négatifs), simple, rapide, non opérateur dépendante et peu coûteuse. Le séquençage direct est une technique performante mais lourde (Simar et coll., 1994 ; Teng et coll., 1996), aussi préfère-t-on utiliser préalablement une technique de criblage. Certaines méthodes ont été déjà largement utilisées et sont conformes aux exigences du diagnostic (Cotton, 1997), telles que le SSCP (*Single-Strand Conformation Polymorphism*) (Serova et coll., 1996 ; Phelan et coll., 1996 ; Miki et coll., 1996) ou la DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) (Stoppa-Lyonnet et coll., 1996), chacune ayant ses avantages et ses inconvénients. Lorsqu'un variant est mis en évidence, il est ensuite séquencé pour différencier entre une mutation délétère et un polymorphisme.

D'autres techniques sont en cours de mise au point pour *BRCA1* et 2, mais ont déjà fait leur preuve dans l'analyse d'autres gènes. Il s'agit principalement de la FAMA (*Fluorescence Assisted Mismatch Analysis*) (Verpy et coll., 1994 ; Ricevuto et coll., 1997) et du CFLA (*Cleavase Fragment Length Analysis*) (Brown et coll., 1996 ; Noguchi et coll., 1997). Elles auraient la capacité d'identifier 100% des mutations quel que soit le type d'altération, de localiser précisément la variation et d'en donner un profil spécifique. En théorie cela permettrait de prédire, si la modification de séquence a déjà été décrite, s'il s'agit d'une mutation délétère ou d'un polymorphisme avant même la réalisation du séquençage.

Des associations de techniques sont envisageables. Par exemple, pour les exons de grande taille (ex : l'exon 11 de *BRCA1* correspond à 50% de la séquence codante), on peut utiliser le PTT (*Protein Truncation Test*) (Hogervorst et coll., 1995), le reste de la séquence étant analysé par DGGE, SSCP

(Montagna et coll., 1996) ou par séquençage direct automatisé. Il faut noter que le PTT ne met pas en évidence les mutations faux sens. Cependant, le caractère délétère de ces dernières, hormis dans le domaine RING-finger, reste à démontrer. De la même manière, à la place du PTT, on pourra associer la FAMA ou le CFLA. Là encore, lorsqu'un variant est mis en évidence, il est ensuite séquencé pour vérifier qu'il s'agit bien d'une mutation délétère.

Une fois qu'une mutation aura été identifiée dans une famille, il suffira de la rechercher chez les apparentés qui en auront fait la demande.

**En résumé** Le taux de détection de mutations dépend à la fois des critères de sélection des familles et sujets analysés et des méthodes employées. Les stratégies actuelles privilégient une combinaison de techniques moléculaires, alliées à des procédures de sélections des familles soit basées exclusivement sur des éléments cliniques soit associées à des analyses de liaison génétique et donnent des taux respectifs de 16% (Couch et coll., 1997) à 80% (Serova et coll., 1996).

## En conclusion

Dans ce chapitre nous n'avions pas pour but d'être exhaustif mais d'illustrer ce que peut être une recherche de mutation des gènes *BRCA1* et *2* à visée diagnostique, c'est-à-dire hors d'un contexte de recherche, en tenant compte des différents éléments cliniques, biologiques et techniques. Ainsi, nous n'avons pas cité toutes les techniques disponibles et notamment celles basées sur l'analyse de l'ARN. Les prélèvements ayant un mode de conditionnement, une durée de transport et une cellularité variables, l'ARN peut être dégradé, ou en trop faible quantité au moment de l'analyse. D'une manière générale, certaines techniques sont difficiles à transférer en routine (par exemple : pour la mise en évidence des rares extinctions alléliques, techniques basées sur la comparaison de l'ADN génomique et de l'ADN complémentaire au niveau d'un polymorphisme intragénique) et n'ont donc pas leur place dans ce chapitre, mais d'autres sont par contre très prometteuses (Cotton, 1997 ; Hacia et coll., 1996). Par ailleurs, l'aspect économique (nombre et types d'amorces employées, utilisation ou non de produits radioactifs, nombre de PCR) est un élément important à prendre en considération qui outre la fiabilité peut être décisif dans le choix de la méthode de détection.

Enfin, on ne peut que conseiller de réaliser les tests génétiques sur deux prélèvements indépendants, afin de détecter une éventuelle erreur de tube ou de manipulation.

Exemple de stratégies pour l'identification des mutations germinales des gènes *BRCA1* et *BRCA2* dans une famille non explorée (recherche de mutations de petite taille)

**BRCA1**

- Gène dont les mutations sont les plus fréquentes et donc à analyser en premier.
- La grande taille rend souhaitable l'utilisation d'une méthode de criblage.
- Majorité de mutations aboutissant à des protéines tronquées.
- Quelques mutations fréquentes (exon 20 : 5382insC), pouvant être associées à des populations bien caractérisées (exon 2 : del AG 185, effet fondateur dans la population juive ashkénaze).
- Les mutations faux sens sont d'interprétation délicate sauf celles impliquant le domaine ring-finger.
- Prédisposition aux cancers de l'ovaire et du sein chez la femme, risque relatif augmenté de cancer du côlon et de la prostate.



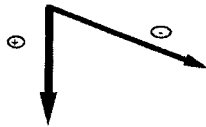
- 1) SSCP ou DGGE de tout le gène (40 PCR) ou
- 3) FAMA ou Clivage enzymatique-CFLA de tout le gène (56 PCR) ou
- 2) Option combinée : PTT ou FAMA ou CFLA de l'exon 11 (de 3 à 6 PCR) + SSCP ou DGGE (ou séquençage direct eu reste du gène)

**BRCA2**

- Gène dont les mutations sont le plus souvent retrouvées dans les populations nordiques et anglo-saxonnes mais dont la fréquence au total reste inférieure à *BRCA1* sauf en Islande (effet fondateur).
- La grande taille rend souhaitable l'utilisation d'une méthode de criblage.
- Majorité de mutations aboutissant à des protéines tronquées (restriction pour les mutations de l'exon 27 pouvant correspondre à un polymorphisme).
- Spectre des mutations en cours d'établissement.
- Quelques mutations fréquentes pouvant être associées à des populations spécifiques (exon 9 : 999del5 en islande, exon 11 : 6174delT, population juive ashkénaze).
- Prédisposition aux cancers du sein chez l'homme et chez la femme, mais incidence des cancers de l'ovaire plus faible que pour *BRCA1*, mais spectre tumoral probablement élargi comparé à *BRCA1* (estomac, ancréas, hémopathies malignes).

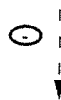


- 1) SSCP de tout le gène (27-78 PCR) ou
- 2) PTT exon 10, 11 et 27 (8 PCR) ou SSCP multiplex + SSCP du reste de la séquence ou
- 3) FAMA ou CFLA (mise au point en cours)

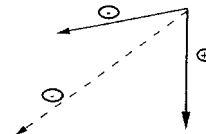


Séquençage de la ou les régions variantes

Si nombreux cas de cancers du côlon associés pouvant évoquer un syndrome de Lynch ou HNPCC : si tumeurs disponibles recherche de phénotype RER, sinon analyse des gènes MMR (cf chapitre sur les aspects cliniques et moléculaires)



Aucune mutation identifiée → Programme de recherche : recherche de mutation d'autres gènes (*p53*, *Cowden*, *AT*) ou localisation d'autres gènes de susceptibilité.



Séquençage de la ou les régions variantes

## BIBLIOGRAPHIE

BARKER D, ALMEIDA E, CASEY G et al. BRCA1 R841W : A strong candidate for a common mutation with moderate phenotype. *Genet Epid* 1996 **13** : 595-604.

BOYD M, HARRIS F, MCFARLANE R, DAVIDSON HR ET BLACK DM. A human BRCA1 gene knockout. *Nature* 1995 **375** : 541 - 542.

BROWN M, OLDENBURG M, LYAMICHEV V et al. Differentiation of bacterial 16S rRNA genes and intergenic regions and Mycobacterium tuberculosis KatG genes by Structure-Specific Endonuclease Cleavage. *J Clin Micr* 1996 **34** : 3129-3137.

COTTON R. Slowly but surely towards better scanning for mutations. *Trends Genet* 1997 **13** : 43-46.

COUCH F, DE SHANO M, BLACKWOOD M, CALZONE K, STOPFER J, CAMPEAU L et al. BRCA1 mutations in women attending clinics that evaluate the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 1997 **336** :1409-1415.

COUCH F, WEBER B et al. Mutations and polymorphisms in the familial early-onset breast cancer (BRCA1) gene. *Human Mut* 1996 **8** : 8-18.

DUNNING A, CHIANO M, SMITH N et al. Common BRCA1 variants and susceptibility to breast and ovarian cancer in the general population. *Hum Mol Genet* 1997 **6** : 285-289.

EISINGER F, STOPPA-LYONNET D, LONGY M et al. Germ line mutation at BRCA1 affects the histoprognotic grade in hereditary breast cancer. *Cancer Res* 1996 **56** : 471-474.

HACIA J, BRODY L, CHEE M, FODOR S, COLINS F. Detection of heterozygous mutations in BRCA1 using high density oligonucleotide arrays and two-colour fluorescence analysis. *Nature Genet* 1996 **14** : 441-447.

HOGERVORST FBL, CORNELIS RS, BOUT M et al. Rapid detection of BRCA1 mutations by the protein truncation test. *Nature Genet* 1995 **10** : 208-212.

KERANGUEVEN F, ESSIUX L, DIB A et al. Loss of heterozygosity and linkage analysis in breast carcinoma : indication for a putative third susceptibility gene on the short arm of chromosome 8. *Oncogene* 1995 **10** : 1023-1026.

MARCUS J, WATSON P, PAGE D et al. Hereditary breast cancer : pathobiology, prognosis, and BRCA1 and BRCA2 gene linkage. *Cancer* 1996 **77** : 697-709.

MIKI Y, KATAGIRI T, KASUMI F, YOSHIMOTO T ET NAKAMURA Y. Mutation analysis in the BRCA2 gene in primary breast cancers. *Nature Genet* 1996 **13** : 245-247.

MIKI Y, SWENSEN J, SHATTUCK-EIDENS D et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994 **266** :

MONTAGNA M, SANTACATTERINA, CORNEO B et al. Identification of seven new BRCA1 germline mutations in italian breast and breast/ovarian cancer families. *Cancer Res* 1996 **56** : 5466-5469.

NOGUCHI T, SOBOL H, SAUVAN R, BIRNBAUM D. BRCA1 mutations screening by cleavase. In : Boiron M, Marty M, ed. *Eurocancer 97*. Paris, John Libbey Eurotext, 1997 : 81-82

PHELAN C, LANCASTER J, TONIN P et al. Mutation analysis of BRCA2 gene in 49 site-specific breast cancer families. *Nature Genet* 1996 **13** : 120-122.

RAMUS S, FRIEDMAN L, GAYTHER S et al. A breast/ovarian cancer patient with germline mutations in both BRCA1 and BRCA2. *Nature Genet* 1997 **15** : 14-15.

REBBECK T, COUCH F, KANT J et al. Genetic heterogeneity in hereditary breast cancer : role of BRCA1 and BRCA2. *Am J Hum Genet* 1996 **59** : 547-553.

RICEVUTO E, STOPPA-LYONNET D, BAZZALI-HERNANDEZ C, PAGES S, SOBOL H, TOSI M et al. Mutation scanning of the BRCA1 and BRCA2 gene using FAMA (fluorescence-assisted mismatch analysis). In : Boiron M, Marty M eds. *Eurocancer 97*. Paris, John Libbey Eurotext, 1997 : 79-80.

ROA B, BOYD A, VOCIK K, C. R. Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA1 and BRCA2. *Nature Genet* 1996 **14** : 185-187.

SEROVA O, MONTAGNA M, TORCHARD D et al. A high incidence of BRCA1 mutations in 20 breast-ovarian cancer families. *Am J Hum Gen* 1996 **58** : 42-51.

SHATTUCK-EIDENS D, MCCLURE M, SIMARD J et al. A collaborative survey of 80 mutations in the BRCA1 breast and ovarian cancer susceptibility gene. *J Am Med Assoc* 1995 **273** : 535-541.

SIMAR J, TONIN P, DUROCHER F et al. Common origins of BRCA1 mutations in Canadian breast and ovarian cancer families. *Nature Genet* 1994 **8** : 392-398.

SOBOL H, BIGNON YJ, EISINGER F, BIRNBAUM D, FERVERS B. Génétique et cancer du sein. *Ann Chir* 1994 pp 303 - 308.

STOPPA-LYONNET D, FRICKER J, ESSIUX L et al. Segregation of two BRCA1 mutations in a single family. *Am J Hum Genet* 1996 **59** : 479-481.

STRATTON M. Recent advances in understanding of genetic susceptibility to breast cancer. *Hum Mol Genet* 1996 **5** : 1515-1519.

TENG D, BOGDEN R, MITCHELL J et al. Low incidence of BRCA2 mutations in breast carcinoma and other cancers. *Nature Genet* 1996 **13** : 241-244.

The Breast Cancer Linkage Consortium : The pathology of familial breast cancer : evidence for differences between breast cancers developing in carriers of BRCA1 mutations, BRCA2 mutations and sporadic cases. *Lancet* 1997 **349** : 1505-1510

THORLACIUS S, OLAFSDOTTIR G, TRYGVADOTTIR L et al. A single BRCA2 mutation in male and female breast cancer families from Iceland with varied cancer phenotypes. *Nature Genet* 1996 **13** : 117-119.

VERPY E, BIASOTTO M, MEO T ET TOSI M. Efficient detection of point mutations on color-coded strands of target DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 **91** : 1873-1877.

WOOSTER R, BIGNELL G, LANCASTER J et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 1995 **378** : 789-792.