médecine/sciences 1997 ; 13 : 269-71

Cancer
Cycle cellulaire

L'ADN du plasma, base d'un test sanguin pour détecter le cancer ?

Le taux de survie observé dans la plupart des cancers ne s'est guère amélioré au cours des vingt dernières années [1] malgré les progrès de la chirurgie et des thérapies adjuvantes. Dans ce contexte, l'amélioration des techniques de détection qui permettent un diagnostic précoce occupe une place importante, comme le souligne le Programme Européen contre le cancer [2].

L'instabilité génomique, une caractéristique du cancer

Au cours de la dernière décennie, de nombreuses anomalies chromosomiques ont été identifiées dans l'ADN des cellules cancéreuses ; en particulier, des mutations, des délétions et des pertes alléliques de divers oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeur. Il est maintenant admis que presque tous les cancers humains sont associés à une instabilité génomique.
Les premières modifications géniques caractérisées à l'origine des cancers furent celles des oncogènes, c-*onc*, souvent homologues des gènes transformants v-*onc*, des oncornavirus animaux [3]. Une autre classe de gènes altérés au cours du cancer est celle des gènes suppresseurs de tumeurs, ou anti-oncogènes, dont le premier à avoir été caractérisé est le gène *RB* [4] alors que le gène *P53* est le plus souvent altéré dans les cancers humains [5].
En 1989, Vogelstein [6] et son équipe ont trouvé que dans la plupart des cancers du côlon d'importants segments chromosomiques étaient perdus et que ces pertes ne se faisaient pas au hasard. Ces délétions chromosomiques ont été détectées en comparant l'ADN de tissu normal à celui de la tumeur par la technique dite des polymorphismes de taille des fragments de restriction (RFLP, *restriction fragment length polymorphism*). Dans cette technique, deux allèles sont identifiés dans l'ADN d'un individu donné et l'on a appelé « perte d'hétérozygotie » (LOH = *loss of heterozygosity*) la perte de l'un de ces segments. Ce phénomène a été mis en évidence dans le cas du cancer colorectal. Plusieurs laboratoires ont ensuite appliqué cette technique à l'analyse d'autres tumeurs et trouvé que chacune possède ses propres caractéristiques de délétions chromosomiques, et que celles-ci correspondent souvent à des gènes suppresseurs de tumeur *(m/s n° 8, vol. 3, p. 496 ; n° 2, vol. 4, p. 127)*. Soulignons que la perte d'hétérozygotie ne se produit pas dans les tissus normaux.
Une autre caractéristique de l'ADN des cellules tumorales, de découverte récente, est l'instabilité des microsatellites (séquences répétitives de bi-, tri- ou tétranucléotides de fonction inconnue et situées entre ou dans des gènes codants) *(m/s n° 8/9, vol. 9, p. 990 ; n° 5, vol. 12, p. 655)* [7-9]. Dans certaines tumeurs, ces séquences répétitives ont tendance à se multiplier ou à se contracter.

A la recherche d'un test non invasif de détection du cancer

La notion que des cancers sont associés à des remaniements et des altérations du génome a conduit plusieurs équipes à rechercher de telles modifications dans l'ADN de cellules relachées par des tumeurs dans divers milieux extracorporels. Plusieurs cas sont aujourd'hui connus : l'ADN porteur d'un gène *RAS* muté dans les selles de patients souffrant de cancers colorectaux [10] ou encore dans la bile ou le suc pancréatique de malades atteints de carcinome du pancréas [11]. Sidransky et son équipe ont également mis en évidence des mutations du gène *P53* dans l'ADN de cellules retrouvées dans l'urine de personnes atteintes du cancer de la vessie [12] ou dans les crachats de malades souffrant de carcinomes du poumon [13].
Bien des cliniciens ont cherché depuis de nombreuses années à développer un simple test sanguin pour détecter le cancer, par exemple par analyse d'isozymes protéiques. Mais celles-ci sont souvent, soit peu spécifiques, soit présentes en trop petite quantité.
D'autre part, on sait depuis vingt ans que l'ADN circulant peut être détecté dans le sang, et que sa concentration est augmentée chez des personnes atteintes d'une maladie auto-immune ou d'un cancer [14, 15]. En 1989, nous avons observé que l'ADN plasmatique de malades atteints de cancers divers, par exemple des poumons, des reins ou de la prostate, était caractérisé comme celui des cellules tumorales, par une instabilité accrue des deux brins [16].

Mutations du gène *RAS* dans l'ADN plasmatique

Parmi les différentes modifications observées sur des gènes liés au cancer, les mutations ponctuelles du gène *RAS* sont particulièrement intéressantes [17]. Plus de 90 % des carcinomes du pancréas et près de 50 % des carcinomes colorectaux, par exemple, ont une mutation ponctuelle d'un gène *RAS*, presque toujours située sur un point chaud, le codon 12 du gène K-*RAS*. Ces mutations surviennent tôt au cours de la carcinogenèse et pourraient donc servir de marqueurs tumoraux. Ce sont donc d'abord des mutations du gène K-*RAS* qui ont été recherchées sur l'ADN plasmatique de ce type de malades.

Chez quatorze malades atteints de cancer colorectaux étudiés, la mutation du gène K-*RAS* était trouvée sept fois dans la tumeur et six fois également au niveau de l'ADN plasmatique [18]. Cette étude a été menée par PCR, en utilisant des amorces dont la base 3' est spécifique de l'une des mutations possibles du gène K-*RAS*, donc différente de la séquence normale qui ne peut ainsi pas être correctement amplifiée. Nous avons confirmé ces résultats avec une autre technique de PCR, faisant apparaître un site de restriction avec la séquence normale mais non avec les séquences mutées. De ce fait, les fragments amplifiés à partir d'allèles mutés ne peuvent être clivés par les enzymes de restriction considérées. Enfin, nous avons cloné et séquencé le premier exon du gène K-*RAS* de l'ADN plasmatique d'une partie des patients.

Nous avons également cherché des mutations ponctuelles du gène N-*RAS* dans l'ADN du plasma, de la moelle et des cellules sanguines d'un groupe de dix patients atteints d'un syndrome myélodysplasique ou d'une leucémie myéloblastique aiguë. Des mutations furent détectées dans le plasma de cinq malades alors que, chez deux d'entre eux, elles étaient absentes des cellules du sang circulant et même des cellules de la moelle. Ces résultats indiquent probablement que les échantillons sanguins et médullaires analysés ne contenaient pas les clones leucémiques sièges de la mutation [19].

Des résultats similaires ont été obtenus parallèlement par une équipe de l'Université de Dartmouth [20] qui analysait l'ADN plasmatique de malades qui souffraient de cancers du pancréas ou du poumon.

Instabilité de microsatellites dans l'ADN plasmatique

Tous les cancers ne sont pas porteurs d'une mutation du gène *RAS* et, même s'ils le sont, le pourcentage de cas positifs est souvent insuffisant pour espérer développer un test général. Or, comme nous l'avons vu, l'instabilité de séquences microsatellites est considérée comme un événement important, non seulement dans les cancers familiaux du syndrome de Lynch (cancers colorectaux familiaux non polyposiques) où le taux peut dépasser 90 %, mais aussi dans d'autres cancers tels que le cancer du poumon à petites cellules, les cancers ORL, le cancer de la vessie et le cancer du sein [21]. Il a été démontré que des locus de microsatellites judicieusement choisis sont modifiés dans bien des cancers et peuvent servir de marqueurs clonaux pour leur détection [9]. La méthode permettant de mettre en évidence ces séquences répétitives est relativement simple : l'une des amorces du mélange de la PCR est marquée par addition d'un phosphore radioactif en 5' grâce à la polynucléotide kinase de T4 et le produit PCR est soumis à une électrophorèse en gel dénaturant suivi d'une autoradiographie. La recherche d'une instabilité de microsatellites a été entreprise chez vingt et un patients atteints de cancer du poumon à petites cellules [22] et observée seize fois dans la tumeur (76 %) et quinze fois dans le plasma *(figure 1)*. Ces altérations, qui apparaissaient comme la perte de bandes ou l'apparition de nouvelles bandes dans l'ADN de la tumeur et du plasma, étaient absentes de l'ADN

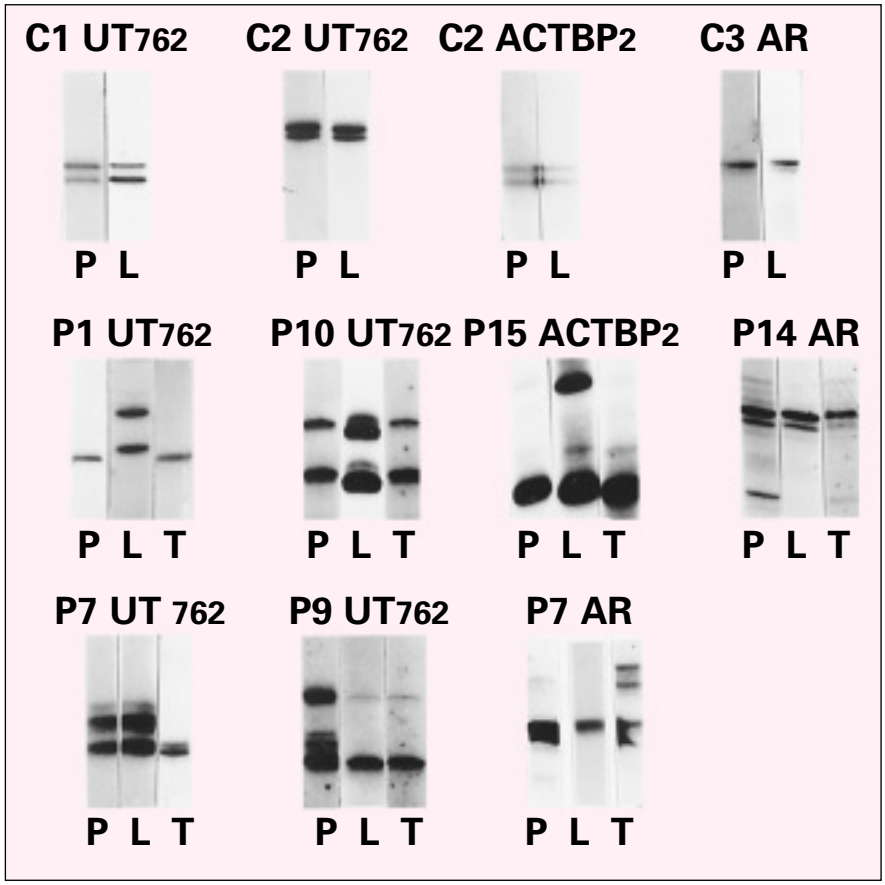

Figure 1. ***Autoradiographie de séquences microsatellites d'ADN extraites de plasma (P), de lymphocytes (L), et de tumeurs (T) de patients atteints de carcinomes du poumon à petites cellules.*** *Le numéro du patient (P) ou du témoin sain (C) et le sigle du marqueur microsatellite polymorphe sont désignés au-dessus de chaque bloc. La perte d'un allèle peut être observée dans le plasma et la tumeur des patients P1 et P15, seulement dans la tumeur chez les patients P7 et P9. On peut observer l'apparition de nouvelles bandes dans le plasma et la tumeur des patients P10 et P14, dans le plasma seulement de P9 et dans la tumeur seulement de P7 avec le marqueur AR. La première ligne montre des témoins sains dont le diagramme de locus microsatellite est similaire dans le plasma et les lymphocytes.*

témoin des lymphocytes. Chez des sujets sains, l'ADN du plasma et des lymphocytes présentaient les mêmes caractéristiques.
Une étude parallèle faite à l'hôpital Johns Hopkins (Baltimore, MD, USA) a montré [23] que sur vingt et un patients atteints de cancer ORL à cellules squameuses, 24 % présentaient des altérations de microsatellites dans l'ADN du sérum semblables à celles observées dans la tumeur primaire. Tous les patients positifs souffraient d'un cancer avancé (stade III ou IV). Dans le cas des cancers ORL, les marqueurs microsatellites pourraient se révéler utiles dans le pronostic de la maladie.

Vers un test sanguin ?

Il se trouve que les deux premières études recherchant des microsatellites modifiés dans l'ADN de plasma ont été réalisées sur des cancers agressifs, parfois déjà métastasés. Cela n'implique cependant pas que la délétion au niveau de l'ADN plasmatique de microsatellites modifiés n'ait qu'une valeur pronostique. En effet, les pertes d'hétérozygotie et autres instabilités de microsatellites peuvent survenir très tôt au cours de l'évolution de certains cancers [22], en particulier dans le cancer du sein et dans les cancers du syndrome de Lynch. Dans l'optique d'un test de détection il est encourageant de noter que des mutations de gènes *RAS* ont été trouvées dans l'ADN plasmatique à un stade précoce de la progression des cancers : stades Duke A et B chez des malades atteints de cancers colorectaux [18], ou encore syndromes myélodysplasiques avant l'apparition de la leucémie aiguë [19]. Enfin, dans une étude sur le cancer du pancréas dont les résultats n'ont pas encore été publiés, nous avons trouvé dans deux cas des mutations de K-*RAS* dans l'ADN de plasma de patients chez lesquels le diagnostic de pancréatite avait été porté et qui se sont révélés quelques mois plus tard comme étant en fait des carcinomes.
Il n'y a pas de doute que certains cancers se prêteront mieux que d'autres à l'utilisation de la recherche d'ADN tumoral dans le plasma comme test de détection du cancer. Cela sera fonction de l'existence et de la capacité d'identifier des marqueurs génétiques précoces et fréquents. Dans ce domaine, de nouveaux marqueurs sont signalés en permanence, ce qui devrait augmenter la gamme des tumeurs pouvant bénéficier de ces tests. Soulignons enfin que la détection dans l'ADN plasmatique de modifications liées à la tumeur pourra se révéler utile lors du suivi de la maladie après radiothérapie, chimiothérapie ou chirurgie.
Il est évident que ces travaux sont encore préliminaires. Cependant, le simple fait que de l'ADN soit libéré dans le sang par des tumeurs ouvre d'incontestables perspectives en termes de diagnostic et de suivi de ces malades ■

RÉFÉRENCES

1. Boring CC, Squires TS, Tong T, Montgomery BA. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 1944 ; 44 : 7-26.

2. Commission of the European Community. Europe Against Cancer Action Plan, 1987-1989. *Official J Eur Community* 1987 ; 87/C50/01 : 1-58.

3. Stéhelin D. Les oncogènes cellulaires, clés de la cancérogenèse. *Med Sci* 1985 ; 1 : 12-6.

4. Bonaïti-Pellié C, Feingold J. Rétinoblastome : de l'épidémiologie génétique à la biologie moléculaire. *Med Sci* 1990 ; 6 : 972-9.

5. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. P53 mutations in human cancers. *Science* 1991 ; 253 : 49-53.

6. Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y, White R. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 1989 ; 244 : 207-11.

7. Aaltonen LA. Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JJ, Jarvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, Peterson GM, Kinzler KW, Vogelstein B, de la Chapelle A. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993 ; 260 : 812-6.

8. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993 ; 260 : 816-9 .

9. Mao Li, Lee DJ, Tockman MS, Erozan YS, Askin F, Sidransky D. Microsatellite alterations as clonal markers for the detection of human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 9871-4.

10. Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR, Kinzler KW, Lewin B, Frost P, Vogelstein B. Identification of *ras* oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science* 1992 ; 256 : 102-5.

11. Tada M, Omata M, Kawai S, Saisho H, Ohto M, Siki RK, Sninsky JJ. Detection of *ras* gene mutations in pancreatic juice and peripheral blood of patients with pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 1993 ; 53 : 2472-4.

12. Sidransky D, von Eschenbach A, Tsai YC, Jones P, Summerhayes I, Marshal F, Paul M, Green P, Hamilton SR, Frost P, Vogelstein B. Identification of *P53* gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science* 1991 ; 52 : 706-9.

13. Mao Li, Hruban RH, Boyle JO, Tockman M, Sidransky D. Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer. *Cancer Res* 1994 ; 54 : 1634-7.

14. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977 ; 37 : 646-50.

15. Koffler D, Agnello V, Winchester R, Kunkel H. The occurrence of single stranded DNA in the serum of patients with SLE and other diseases. *J Clin Invest* 1973 ; 52 : 198-204.

16. Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* 1989 ; 46 : 318-22.

17. Bos JL. *Ras* oncogene in human cancer : a review. *Cancer Res* 1989 ; 49 : 4682-9.

18. Vasyukhin V, Stroun M, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Anker P. K-*ras* point mutations in the blood plasma DNA of patients with colorectal tumors. In : Verna R, Shamoo A, eds. *Challenges of modern medicine, biotechnology today.* Rome : Ares-Serono Symposia Publications, 1994 : 141-50.

19. Vasyukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Point mutations of the N-*ras* in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 1994 ; 86 : 774-9.

20. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli A, Bzik DJ, Yao SL. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994 ; 3 : 67-71.

21. Patel U, Grundfest-Broniatowski S, Gupta S, Banerjee S. Microsatellite instabilities at five chromosomes in primary breast tumors. *Oncogene* 1994 ; 9 : 3695-700.

22. Chen XQ, Stroun M, Magmenat JL, Nicod LP, Kurt AM, Lyautey J, Lederrey C, Anker P. Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nature Med* 1996 ; 9 : 1033-5.

23. Nawroz H, Koch W, Anker P, Stroun M, Sidransky D. Microsatellite alterations in plasma DNA of head and neck cancer patients. *Nature Med* 1996 ; 9 : 1035-7.

Philippe Anker
Maurice Stroun

Laboratoire de biochimie et de physiologie végétale, faculté des sciences de l'université de Genève, pavillon des Isotopes, 20, boulevard d'Yvoy, 1211 Genève, Suisse.

TIRÉS À PART

P. Anker.