

« Peignage d'ADN » et grands réarrangements du gène BRCA1 ou comment dénoncer le monopole de Myriad Genetics sur les tests de prédisposition au cancer du sein

Les études de liaison génétique menées dans des familles conjuguant au moins 4 cas de cancers du sein et un cas de cancer de l'ovaire ont permis de retenir que le gène *BRCA1* était impliqué dans 80 % de ces cas [1]. Plus de 800 mutations ponctuelles ou de petite taille de la séquence codante de *BRCA1* ont été répertoriées dans la base de données du *Breast Information Core* (BIC) [2]. Ces altérations ont été détectées par des techniques de criblage fondées sur la PCR, telles que le séquençage direct, SSCP, HDA, DGGE et PTT* [3, 4]. Ces stratégies ne permettent néanmoins d'identifier que 68 % des mutations attendues [1]. Ce faible taux de détection peut s'expliquer, au moins en partie, par l'existence d'altérations de grande taille qui échappent aux techniques employées, fondées sur une PCR classique, l'allèle réarrangé étant masqué par la persistance de l'allèle normal. De fait, plusieurs délétions et une duplication partielle de *BRCA1* ont déjà été détectées par *Southern blot* ou par analyse des transcrits (*figure 1*) [5-11]. Les premières estimations de fréquence de ces réarrangements sont de 15 % dans la population américaine, et de 36 % dans la population hollandaise, cette dernière valeur reflétant un effet fondateur [5, 9]. Les réarrangements décrits varient en taille de 0,5 à 23,8 kb et se répartissent sur

l'ensemble du gène, certains emportant même tout ou partie de la région 5' de *BRCA1*. La caractérisation de leurs points de cassure a permis de montrer qu'ils résultaient d'événements de recombinaison homologue inégale entre des séquences répétées de type *Alu*, nombreuses dans *BRCA1* puisqu'elles représentent 41,5 % des introns [12].

La diversité des réarrangements de *BRCA1* et leur dispersion nous ont conduits à développer une stratégie permettant une vision panoramique du gène et de sa région. Nous avons pour cela retenu la méthode de « peignage moléculaire d'ADN » mise au point par l'équipe d'Aaron Bensimon à l'Institut Pasteur (Paris, France) [13-15] et l'avons adaptée à l'analyse de *BRCA1* à l'Institut Curie (Paris, France) [16]. Cette méthode consiste à ancrer des molécules d'ADN en solution, par une de leurs extrémités, sur des surfaces de verre traitées, et à les allonger de manière homogène et parallèles les unes aux autres, avec un facteur d'étirement de 2 kb/ μm . Notre stratégie associe le peignage d'ADN avec l'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) [16]. Nous avons en premier lieu testé l'ensemble de sondes choisies (*figure 2A*) sur un ADN témoin, et obtenu une cinquantaine de signaux, chacun correspondant à un allèle de *BRCA1* (*figure 2B*). Le découpage en 11 fragments et 4 couleurs a conduit à un véritable « code barre » coloré du gène *BRCA1*. Puis, quatre ADN de sujets porteurs de réarrangements déjà décrits et de taille comprise entre 3 et 23,8 kb ont été testés. Ces

réarrangements sont bien retrouvés avec le « code barre ». Cette étude a permis d'estimer que la taille minimale des réarrangements détectables est de 2 kb [16]. Dans le cadre de la consultation de génétique de l'Institut Curie, une série de 50 patientes, atteintes de cancer du sein et/ou de l'ovaire s'inscrivant dans un contexte familial mais pour lesquelles aucune mutation ponctuelle de *BRCA1* (et de *BRCA2*) n'a pu être détectée, a été constituée et est en cours d'analyse [4]. Dès le criblage par microscopie, nous avons détecté des réarrangements, notamment une nouvelle duplication de 17,2 kb comprenant les exons 3 à 8 [16]. L'ensemble de ces données montre que la contribution des altérations de grande taille dans le spectre de mutations de *BRCA1* n'est pas négligeable, et que leur recherche doit désormais être intégrée dans la stratégie d'analyse des familles sein/ovaire.

Cela est à nouveau illustré par l'étude d'une famille américaine, suivie à Los Angeles, présentant de nombreux cas de cancer du sein et de l'ovaire [17]. La patiente étudiée a été atteinte d'un cancer du sein à l'âge de 30 ans puis d'un cancer de l'ovaire à 49 ans. Une première étude de *BRCA1* et de *BRCA2* avait été effectuée par la société américaine *Myriad Genetics* (*BRCAAnalysis*TM, Salt Lake City, États-Unis). Cette analyse, fondée sur le séquençage direct, n'avait pas détecté de mutation ponctuelle. En revanche, l'analyse par notre technique de « code barre » du gène *BRCA1* a permis de révéler l'existence d'une nou-

* SSCP: single strand conformation polymorphism; HDA: heteroduplex analysis; DGGE: denaturing gradient gel electrophoresis; PPT: protein truncation test; DHPLC: denaturing high performance liquid chromatography.

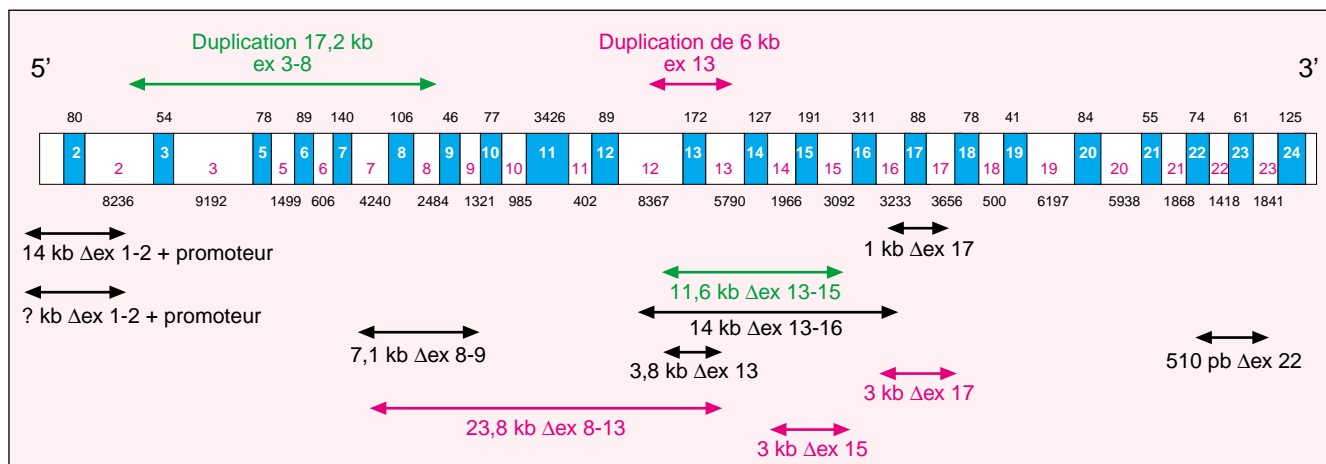


Figure 1. Réarrangements du gène BRCA1. Le gène BRCA1 s'étend sur 81 kb et possède 24 exons (représentés en bleu, taille en paire de bases au-dessus) dont 22 sont codants avec une taille allant de 41 pb à 3,4 kb. Les introns (représentés en blanc, taille en pb en dessous) varient en taille de 402 pb à 9,1 kb. Les réarrangements sont indiqués par des flèches couvrant la région remaniée (Δ pour délétion). En rouge, figurent ceux que nous avons utilisés comme témoins positifs pour la mise au point de l'analyse par la méthode de « code barre » de BRCA1. En vert, sont représentés deux des réarrangements détectés récemment par cette méthode. Le schéma n'est pas représenté à l'échelle.

velle délétion du gène, emportant les exons 13 à 15 (figure 2C) [17]. Cette délétion entraîne un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop dans l'exon 16, conduisant ainsi à une protéine tronquée. Elle est donc clairement à l'origine de la prédisposition au cancer chez cette patiente. Au niveau génomique, la caractérisation des points de cassure a montré la fusion de 2 séquences *Alu*, l'une dans l'intron 12 et l'autre dans l'intron 15 [17]. L'identification de l'altération causale chez le cas index a permis d'offrir un test génétique aux apparentés et, par là même, d'adapter le suivi mammaire et ovarien dans cette famille.

Cet exemple souligne qu'une seule technique, ici le séquençage direct, n'est pas suffisante pour l'exploration du gène *BRCA1*. Rappelons que la société *Myriad Genetics*, qui a remporté la dernière étape de cartographie physique de *BRCA1* et a déposé la séquence du gène dans les banques de données, détient des brevets aux États-Unis et en Europe. Le premier brevet obtenu en Europe en janvier 2001 porte sur une « méthode de diagnostic de prédisposition aux cancers du sein et de l'ovaire » précisément fondée sur l'analyse de la séquence de *BRCA1*. Forte de ses brevets, *Myriad Genetic Laboratories Inc.*,

branche diagnostique de *Myriad*, revendique le monopole de la recherche de mutations chez les cas index. Appliquant une logique industrielle à ses choix stratégiques expérimentaux, *Myriad* a retenu une approche unique, le séquençage direct, qui ne met en évidence que les mutations ponctuelles ou de petite taille. Bien que des réarrangements de *BRCA1* soient décrits depuis 1997 [5-7], et que tout pathologiste moléculaire sache que les grands réarrangements d'un gène peuvent représenter jusqu'à 50 % de ses altérations [18], *Myriad* n'a pas complété sa stratégie d'analyse, en d'autres termes ne s'est pas donnée une obligation de moyens pour proposer un diagnostic de qualité.

Cet exemple montre combien les droits conférés par un brevet peuvent être exorbitants et ne sont plus adaptés aux applications biomédicales, tout au moins aux tests génétiques. Sans ouvrir de nouveau le débat sur le brevetage du génome, rappelons que les détenteurs d'un brevet peuvent exercer de deux façons leur droits : (1) licence(s) de tiers qui reproduise(nt) l'invention, le montant des droits étant laissé à la discrétion du propriétaire du brevet et pouvant, par là, être très élevé ; (2) monopole de l'exécution de l'inven-

tion, c'est-à-dire réalisation du test dans le laboratoire du détenteur du brevet. C'est le droit de monopole qui nous paraît particulièrement inadapté. En effet, lorsque le brevet est fondé sur une réelle invention de l'homme, c'est-à-dire sur sa véritable ingéniosité et son savoir-faire, il n'y a pas, par définition, plusieurs façons de réaliser à nouveau l'invention, c'est-à-dire de l'utiliser au quotidien, et la possibilité d'un monopole semble alors légitime. En revanche, lorsqu'un brevet concerne un test génétique, fondé sur l'analyse comparative de la séquence de référence d'un gène, il existe à l'évidence plusieurs autres techniques d'analyse possibles (séquençage direct, méthodes de préciblage, hybridation de sondes issues de la séquence génomique ou d'ADN complémentaire, et d'autres qui restent à décrire) et, surtout, plusieurs combinaisons de techniques nécessaires pour « réaliser à nouveau l'invention ». Ces techniques sont déjà largement diffusées et donc par là, à la disposition de l'homme du métier. Ainsi, le principe du monopole sur l'exécution d'un test génétique n'apparaît plus adapté au principe même du brevet qui, grâce à la publication de l'invention, devrait servir de base à de nouveaux progrès inventifs. Le monopole devient clairement un

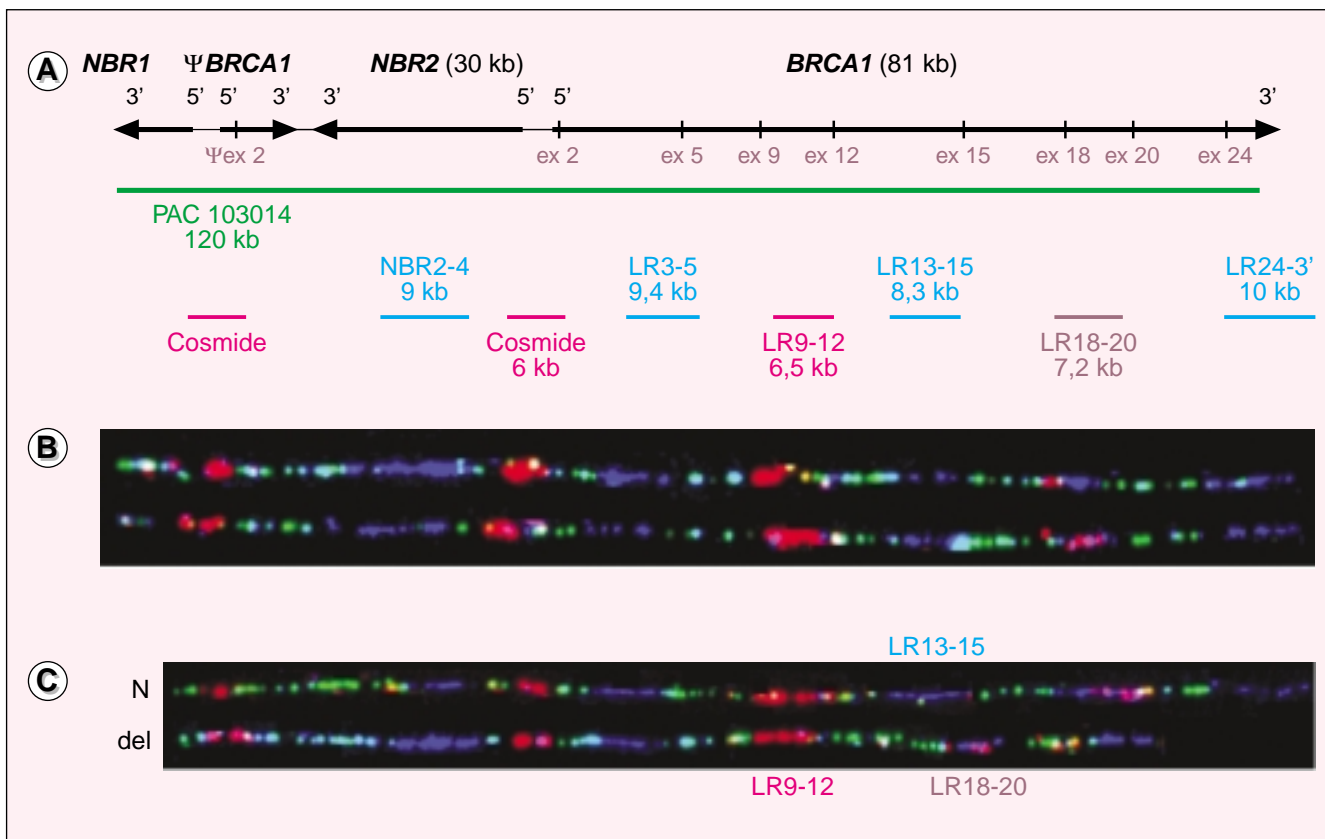


Figure 2. **Code-barre de BRCA1.** **A.** Schéma de la région de BRCA1 en 17q21. Il existe une duplication en tandem d'une part des premiers exons de BRCA1 donnant un pseudogène (Ψ BRCA1) et d'autre part des premiers exons du gène NBR1 donnant le gène NBR2. Comme sondes pour la FISH, un PAC couvrant toute la région et un cosmide dont l'insert est remanié ont été utilisés. Les autres sondes sont des produits de PCR de grande taille, intragéniques ou en 3' du gène. La révélation est réalisée avec 3 fluorescences, et pour la sonde couvrant les exons 18 à 20, la combinaison de 2. **B.** Signaux de BRCA1. Après peignage d'un ADN témoin, hybridation avec les 8 sondes et criblage de la lame au microscope, une cinquantaine de signaux (= allèles de BRCA1) ont été obtenus. Pour faciliter l'analyse, les signaux sont alignés. On voit bien le découpage du gène BRCA1 en 11 fragments aboutissant à un code barre coloré. **C.** Signaux de IC2361. Pour la patiente américaine, dès le criblage au microscope, 2 populations d'allèles étaient distinguables par l'absence de la sonde couvrant les exons 13 à 15, indiquant la présence d'une grande délétion.

frein à toute optimisation diagnostique et à tout développement technologique. De plus, il désorganise fondamentalement le système médicalisé de soins tel que l'ont souhaité la France et de nombreux autres pays. Ne faudrait-il pas revoir les droits conférés par un brevet, droits mis en place au cours du formidable essor industriel de la fin du XIX^e siècle, mais qui n'apparaissent plus adaptés au début du XXI^e siècle ? Ne faudrait-il pas, comme le suggèrent Maurice Cassier et Jean-Paul Gaudillière [19], « promouvoir des régimes de licences très ouverts pour assurer l'accessibilité et l'évaluation des innovations biomédicales » ?

Sophie Gad
Dominique Stoppa-Lyonnet

Service de génétique oncologique, Institut Curie, 26, rue d'Ulm, 75005 Paris, France.

Alain Aurias

Inserm U. 509, Institut Curie, 26, rue d'Ulm, 75005 Paris, France.

Aaron Bensimon

Laboratoire de biophysique de l'ADN, Institut Pasteur, 28, rue du Docteur-Roux, 75015 Paris, France.

1. Ford D, Easton DF, Stratton M, *et al.* Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the *BRCA1* and *BRCA2* genes in breast cancer families. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 676-89.
2. http://www.nhgri.nih.gov/Intramural_research/Lab_transfer/Bic/.
3. Szabo C, King MC. Population Genetics of *BRCA1* and *BRCA2*. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 1013-20.
4. Stoppa-Lyonnet D, Laurent-Puig P, Essioux L, *et al.* *BRCA1* sequence variations in 160 individuals referred to a breast/ovarian family cancer clinic. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 1021-30.
5. Petrij-Bosch A, Peelen T, van Vliet M, *et al.* *BRCA1* genomic deletions are major founder mutations in Dutch breast cancer patients. *Nat Genet* 1997; 17: 341-5.
6. Puget N, Torchard D, Serova-Sinilnikova OM, *et al.* A 1 kb Alu-mediated germ-line deletion removing *BRCA1* exon 17. *Cancer Res* 1997; 57: 828-31.

7. Swensen J, Hoffman M, Skolnick MH, Neuhausen SL. Identification of a 14 kb deletion involving the promoter region of *BRCA1* in a breast cancer family. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 1513-7.

8. Montagna M, Santacatterina M, Torri A, et al. Identification of a 3 kb Alu-mediated *BRCA1* gene rearrangement in two breast/ovarian cancer families. *Oncogene* 1999; 18: 4160-5.

9. Puget N, Stoppa-Lyonnet D, Sinilnikova OM, et al. Screening for germ-line rearrangements and regulatory mutations in *BRCA1* led to the identification of four new deletions. *Cancer Res* 1999; 59: 455-61.

10. Puget N, Sinilnikova OM, Stoppa-Lyonnet D, et al. An Alu-mediated 6 kb duplication in the *BRCA1* gene: a new founder mutation? *Am J Hum Genet* 1999; 64: 300-2.

11. Rohlfes EM, Puget N, Graham ML, et al. An Alu-mediated 7,1 kb deletion of *BRCA1* exons 8 and 9 in breast and ovarian cancer families that results in alternative splicing in exon 10. *Genes Chrom Cancer* 2000; 28: 300-7.

12. Smith TM, Lee MK, Szabo CI, et al. Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene *BRCA1*. *Genome Res* 1996; 6: 1029-49.

13. Bensimon A, Simon A, Chiffaudel A, Croquette V, Heslot F, Bensimon D. Alignment and sensitive detection of DNA by a moving interface. *Science* 1994; 265: 2096-8.

14. Michalet X, Ekong R, Fougerousse F, et al. Dynamic molecular combing: Stretching the whole human genome for high-resolution studies. *Science* 1997; 277: 1518-23.

15. Michalet X, Bensimon A. Peignage moléculaire: cartographie physique du génome et diagnostic médical. *Med Sci* 1997; 13: 1299-305.

16. Gad S, Aurias A, Puget N, et al. Colour bar coding the *BRCA1* gene on combed DNA: a useful strategy for detecting large gene rearrangements. *Genes Chrom Cancer* 2001; 31: 75-84.

17. Gad S, Scheuner MT, Pages-Berhouet S, et al. Identification of a large rearrangement of the *BRCA1* gene using colour bar code on combed DNA in an American breast-ovarian cancer family previously studied by direct sequencing. *J Med Genet* 2001; 38: 388-91.

18. Forrest SM, Cross GS, Speer A, Gardner-Medwin D, Burn J, Davies KE. Preferential deletion of exons in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Nature* 1987; 329: 638-40.

19. Cassier M, Gaudillière JP. Un effet pervers du brevetage des gènes. *La Recherche* 2001; 341: 76-9.

■■■ BRÈVES ■■■

■■■ **Une nouvelle approche du traitement des neuroblastomes: un corps à corps très spécifique.** Les neuroblastomes sont des tumeurs pédiatriques d'autant plus redoutables qu'elles répondent faiblement à toute chimiothérapie. Le seul traitement actuellement encourageant repose sur une polychimiothérapie incluant l'étoposide, un dérivé épipodophyllotoxine inhibiteur de l'ADN topoisomérase II. Cependant, les échecs cliniques sont malheureusement trop fréquents. Dans un article récent [1], une nouvelle approche d'immunochimiothérapie est proposée pour améliorer la réponse thérapeutique. La stratégie ADEPT (*antibody directed enzyme prodrug therapy*) proposée s'avère fort efficace puisqu'elle permet de réduire de 75 % la croissance tumorale de neuroblastomes xénogreffés chez la souris. Son objectif est d'amener une enzyme, l'aldolase, au niveau du site tumoral afin d'activer un précurseur théra-

peutique (pro-drogue) en molécule active. La stratégie mise en œuvre repose sur l'utilisation d'un anticorps catalytique 38C2 antialdolase, préparé par immunisation réactive, qui a démontré auparavant son efficacité *in vitro* pour catalyser l'aldolisation de pro-drogues de différents médicaments anticancéreux comme la doxorubicine et la camptothécine [2]. Les auteurs ont synthétisé une pro-drogue de l'étoposide en estérifiant la fonction phénol par une chaîne de structure complexe qui peut être éliminée *in situ* par des réactions de rétroaldolisation suivie d'une réaction de type rétro-Michael. Dans un modèle de neuroblastome xénogreffé chez la souris syngénique NXS2, les auteurs ont observé une réduction considérable de la croissance tumorale en présence de l'anticorps 38C2 injecté localement et de la pro-drogue administrée par voie systémique. A l'inverse, l'administration de la pro-drogue de l'étoposide à la dose

E-mail : dezutter@lyon151.inserm.fr

maximale tolérée de 40 mg/kg ne produit aucun effet antitumoral. Par ailleurs, les souris qui portent le neuroblastome ne présentent pas de signes de toxicité après l'administration de la pro-drogue à plus de 30 fois la dose maximale tolérée de l'étoposide. Apparemment, l'activation de la pro-drogue est catalysée uniquement par l'anticorps injecté au niveau du site tumoral, sans aucune activation par les enzymes endogènes. Cette étude ouvre de nouvelles perspectives pour le traitement des neuroblastomes et d'autres cancers peu sensibles à la chimiothérapie conventionnelle. D'ores et déjà des anticorps 38C2 humanisés ont été élaborés et permettent d'envisager des essais cliniques chez l'homme.

[1. Shabat D, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98; 7528-33.]

[2. Shabat D, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96; 6925-30.]