



HAL
open science

Prédispositions héréditaires aux cancers du sein et/ou de l'ovaire: expérience Lorraine: de la caractérisation de mutations délétères au sein du gène BRCA1

Cédric Le Caignec

► To cite this version:

Cédric Le Caignec. Prédispositions héréditaires aux cancers du sein et/ou de l'ovaire: expérience Lorraine: de la caractérisation de mutations délétères au sein du gène BRCA1. Sciences du Vivant [q-bio]. 2000. hal-01732947

HAL Id: hal-01732947

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01732947>

Submitted on 14 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

142770

D

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ - NANCY I
2000

FACULTÉ DE MÉDECINE DE NANCY
N° 69

THÈSE



pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement
dans le cadre du troisième cycle de Médecine Spécialisée

par

Cédric LE CAIGNEC

le 8 juin 2000

PREDISPOSITIONS HEREDITAIRES AUX CANCERS DU SEIN ET/OU DE L'OVAIRE.

EXPERIENCE LORRAINE : DE LA CARACTERISATION DE MUTATIONS DELETERES AU SEIN DU GENE BRCA1.

Examineurs de la thèse :

M. P. JONVEAUX
M. P. BEY
M. J.P. MOISAN
Mme. E. LUPORSI

Professeur
Professeur
Professeur
Docteur en Médecine

Président
Juge
Juge
Juge

BIBLIOTHEQUE MEDECINE NANCY 1



D 007 162765 7

96f - ill. 109 réf.

- 9 JUIN 2000



THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement
dans le cadre du troisième cycle de Médecine Spécialisée

par

Cédric LE CAIGNEC

le 8 juin 2000

**PREDISPOSITIONS HEREDITAIRES AUX
CANCERS DU SEIN ET/OU DE L'OVAIRE.**

**EXPERIENCE LORRAINE : DE LA
CARACTERISATION DE MUTATIONS
DELETERES AU SEIN DU GENE BRCA1.**

Examineurs de la thèse :

M. P. JONVEAUX
M. P. BEY
M. J.P. MOISAN
Mme. E. LUPORSI

Professeur
Professeur
Professeur
Docteur en Médecine

Président
Juge
Juge
Juge

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

FACULTÉ DE MÉDECINE DE NANCY

Président de l'Université : Professeur Claude BURLET

Doyen de la Faculté de Médecine : Professeur Jacques ROLAND

Vice-Doyen de la Faculté de Médecine : Professeur Hervé VESPIGNANI

Assesseurs

du 1er Cycle :

du 2ème Cycle :

du 3ème Cycle :

de la Vie Facultaire :

Mme le Docteur Chantal KOHLER

Mme le Professeur Michèle KESSLER

Mr le Professeur Jacques POUREL

Mr le Professeur Philippe HARTEMANN

DOYENS HONORAIRES

Professeur Adrien DUPREZ - Professeur Jean-Bernard DUREUX

Professeur Georges GRIGNON - Professeur François STREIFF

PROFESSEURS HONORAIRES

Louis PIERQUIN - Etienne LEGAIT - Jean LOCHARD - René HERBEUVAL - Gabriel FAIVRE - Jean-Marie FOLIGUET

Guy RAUBER - Paul SADOUL - Raoul SENAULT - Pierre ARNOULD - Roger BENICHOUX - Marcel RIBON

Jacques LACOSTE - Jean BEUREY - Jean SOMMELET - Pierre HARTEMANN - Emile de LAVERGNE

Augusta TREHEUX - Michel MANCIAUX - Paul GUILLEMIN - Pierre PAYSANT

Jean-Claude BURDIN - Claude CHARDOT - Jean-Bernard DUREUX - Jean DUHEILLE - Jean-Pierre GRILLIAT

Pierre LAMY - François STREIFF - Jean-Marie GILGENKRANTZ - Simone GILGENKRANTZ

Pierre ALEXANDRE - Robert FRISCH - Jean GROSDIDIER - Michel PIERSON - Jacques ROBERT

Gérard DEBRY - Georges GRIGNON - Pierre TRIDON - Michel WAYOFF - François CHERRIER - Oliéro GUERCI

Gilbert PERCEBOIS - Claude PERRIN - Jean PREVOT - Pierre BERNADAC - Jean FLOQUET

Alain GAUCHER - Michel LAXENAIRE - Michel BOULANGE - Michel DUC - Claude HURIET - Pierre LANDES

Alain LARCAN - Gérard VAILLANT - Max WEBER

=====
**PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS -
PRATICIENS HOSPITALIERS**

(Disciplines du Conseil National des Universités)

42ème Section : SCIENCES MORPHOLOGIQUES

1ère sous-section : (Anatomie)

Professeur Michel RENARD - Professeur Jacques ROLAND - Professeur Gilles GROSDIDIER

Professeur Pierre LASCOMBES - Professeur Marc BRAUN

2ème sous-section : (Histologie, Embryologie, Cytogénétique)

Professeur Hubert GERARD - Professeur Bernard FOLIGUET - Professeur Bruno LEHEUP

3ème sous-section : (Anatomie et cytologie pathologiques)

Professeur Adrien DUPREZ - Professeur François PLENAT

Professeur Jean-Michel VIGNAUD - Professeur Eric LABOUYRIE

43ème Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE

1ère sous-section : (Biophysique et traitement de l'image)

Professeur Alain BERTRAND - Professeur Gilles KARCHER - Professeur Pierre-Yves MARIE

2ème sous-section : (Radiologie et imagerie médicale)

Professeur Jean-Claude HOEFFEL - Professeur Luc PICARD - Professeur Denis REGENT

Professeur Michel CLAUDON - Professeur Serge BRACARD - Professeur Alain BLUM

44ème Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

1ère sous-section : (*Biochimie et Biologie Moléculaire*)

Professeur Pierre NABET - Professeur Jean-Pierre NICOLAS - Professeur Francine NABET

Professeur Jean-Louis GUEANT

2ème sous-section : (*Physiologie*)

Professeur Jean-Pierre CRANCE - Professeur Jean-Pierre MALLIE

Professeur Hubert UFFHOLTZ - Professeur François MARCHAL - Professeur Philippe HAOUZI

3ème sous-section : (*Biologie cellulaire*)

Professeur Claude BURLET

4ème sous-section : (*Nutrition*)

Professeur Olivier ZIEGLER

45ème Section : MICROBIOLOGIE ET MALADIES TRANSMISSIBLES

1ère sous-section : (*Bactériologie, Virologie-Hygiène*)

Professeur Alain LE FAOU

2ème sous-section : (*Parasitologie et mycologie*)

Professeur Bernard FORTIER

3ème sous-section : (*Maladies infectieuses - maladies tropicales*)

Professeur Philippe CANTON - Professeur Alain GERARD - Professeur Thierry MAY

46ème Section : SANTÉ PUBLIQUE

1ère sous-section : (*Epidémiologie, économie de la santé et prévention*)

Professeur Jean-Pierre DESCHAMPS - Professeur Philippe HARTEMANN

Professeur Serge BRIANÇON - Professeur Francis GUILLEMIN

2ème sous-section : (*Médecine du travail et des risques professionnels*)

Professeur Guy PETIET

3ème sous-section : (*Médecine légale*)

Professeur Henry COUDANE

4ème sous-section (*Biostatistiques et informatique médicale*)

Professeur Bernard LEGRAS - Professeur François KOHLER

47ème Section : HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE, TRANSFUSION, CANCÉROLOGIE ET GÉNÉTIQUE

1ère sous-section : (*Hématologie*)

Professeur Christian JANOT - Professeur Thomas LECOMTE - Professeur Pierre BORDIGONI -

Professeur Pierre LEDERLIN

(*Génie biologique et médical*)

Professeur J.François STOLTZ

2ème sous-section : (*Cancérologie*)

Professeur François GUILLEMIN - Professeur Thierry CONROY

(*Radiothérapie*)

Professeur Pierre BEY

3ème sous-section : (*Immunologie*)

Professeur Gilbert FAURE - Professeur Marie-Christine BENE

4ème sous-section : (*génétiq*)

Professeur Philippe JONVEAUX

48ème Section : ANESTHÉSIOLOGIE, PHARMACOLOGIE, RÉANIMATION ET THÉRAPEUTIQUE

1ère sous-section : (*Anesthésiologie et réanimation chirurgicale*)

Professeur Marie-Claire LAXENAIRE - Professeur Claude MEISTELMAN - Professeur Dan LONGROIS

2ème sous-section : (*Réanimation médicale*)

Professeur Alain LARCAN - Professeur Henri LAMBERT - Professeur Nicolas DELORME

Professeur Pierre-Edouard BOLLAERT

3ème sous-section : (*Pharmacologie fondamentale, Pharmacologie clinique*)

Professeur René-Jean ROYER - Professeur Patrick NETTER - Professeur Pierre GILLET

4ème sous-section : (*Thérapeutique*)

Professeur François PAILLE - Professeur Gérard GAY - Professeur Faiez ZANNAD

49ème Section : PATHOLOGIE NERVEUSE, PATHOLOGIE MENTALE et RÉÉDUCATION

1ère sous-section : (Neurologie)

Professeur Michel WEBER - Professeur Gérard BARROCHE - Professeur Hervé VESPIGNANI

2ème sous-section : (Neurochirurgie)

Professeur Henri HEPNER - Professeur Jean-Claude MARCHAL - Professeur Jean AUQUE

3ème sous-section : (Psychiatrie d'adultes)

Professeur Jean-Pierre KAHN

4ème sous-section : (Pédopsychiatrie)

Professeur Colette VIDAILHET - Professeur Daniel SIBERTIN-BLANC

5ème sous-section : (Médecine physique et de réadaptation)

Professeur Jean-Marie ANDRE

50ème Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE et CHIRURGIE PLASTIQUE

1ère sous-section : (Rhumatologie)

Professeur Jacques POUREL - Professeur Isabelle VALCKENAERE

2ème sous-section : (Chirurgie orthopédique et traumatologique)

Professeur Daniel SCHMITT - Professeur Jean-Pierre DELAGOUTTE - Professeur Daniel MOLE

Professeur Didier MAINARD

3ème sous-section : (Dermato-vénérologie)

Professeur Jean-Luc SCHMUTZ

4ème sous-section : (Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique)

Professeur Michel MERLE - Professeur François DAP

51ème Section : PATHOLOGIE CARDIO-PULMONAIRE et VASCULAIRE

1ère sous-section : (Pneumologie)

Professeur Daniel ANTHOINE - Professeur Jean-Marie POLU - Professeur Yves MARTINET

Professeur Jean-François CHABOT

2ème sous-section : (Cardiologie et maladies vasculaires)

Professeur Etienne ALIOT - Professeur Nicolas DANCHIN - Professeur Yves JUILLIERE - Professeur Nicolas SADOUL

3ème sous-section : (Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire)

Professeur Pierre MATHIEU - Professeur Jacques BORRELLY - Professeur Jean-Pierre VILLEMOT

Professeur Jean-Pierre CARTEAUX

4ème sous-section : (Chirurgie vasculaire)

Professeur Gérard FIEVE

52ème Section : MALADIES DES APPAREILS DIGESTIF et URINAIRE

1ère sous-section : (Hépatologie, gastro-entérologie)

Professeur Pierre GAUCHER - Professeur Marc-André BIGARD

Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI

2ème sous-section : (Chirurgie digestive)

3ème sous-section : (Néphrologie)

Professeur Michèle KESSLER - Professeur Dominique HESTIN (Mme)

4ème sous-section : (Urologie)

Professeur Philippe MANGIN - Professeur Jacques HUBERT

**53ème Section : MÉDECINE INTERNE et CHIRURGIE GÉNÉRALE
MÉDECINE ET CHIRURGIE EXPÉRIMENTALE**

1ère sous-section : (Médecine interne)

Professeur Gilbert THIBAUT - Professeur Francis PENIN

Professeur Denise MONERET-VAUTRIN

Professeur Jean DE KORWIN KROKOWSKI - Professeur Pierre KAMINSKY

2ème sous-section : (Chirurgie générale)

Professeur Patrick BOISSEL - Professeur Laurent BRESLER

**54ème Section : PATHOLOGIE DE L'ENFANT, OBSTÉTRIQUE, SYSTÈME ENDOCRINIEN
REPRODUCTION ET DÉVELOPPEMENT**

1ère sous-section : (*Pédiatrie*)

Professeur Paul VERT - Professeur Danièle SOMMELET - Professeur Michel VIDAILHET - Professeur Pierre MONIN
Professeur Jean-Michel HASCOET - Professeur Pascal CHASTAGNER

2ème sous-section : (*Chirurgie infantile*)

Professeur Michel SCHMITT - Professeur Gilles DAUTEL

3ème sous-section : (*Gynécologie et obstétrique*)

Professeur Michel SCHWEITZER - Professeur Jean-Louis BOUTROY

Professeur Philippe JUDLIN - Professeur Patricia BARBARINO

4ème sous-section : (*Endocrinologie et maladies métaboliques*)

Professeur Jacques LECLERE - Professeur Pierre DROUIN - Professeur Georges WERYHA

5ème sous-section : (*Biologie du développement et de la reproduction*)

55ème Section : SPÉCIALITÉS MÉDICO-CHIRURGICALES

1ère sous-section : (*Oto-rhino-laryngologie*)

Professeur Claude SIMON - Professeur Roger JANKOWSKI

2ème sous-section : (*Ophthalmologie*)

Professeur Antoine RASPILLER - Professeur Jean-Luc GEORGE - Professeur Jean-Paul BERROD

3ème sous-section : (*Stomatologie et chirurgie maxillo-faciale*)

Professeur Michel STRICKER - Professeur Jean-François CHASSAGNE

=====

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

27ème section : INFORMATIQUE

Professeur Jean-Pierre MUSSE

64ème Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Professeur Daniel BURNEL

=====

PROFESSEUR ASSOCIÉ

Hygiène et santé publique

Professeur Roland SCHULZE-ROBBECKE

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

42ème Section : SCIENCES MORPHOLOGIQUES

1ère sous-section : (*Anatomie*)

Docteur Bruno GRIGNON

2ème sous-section : (*Histologie, Embryologie, cytogénétique*)

Docteur Jean-Louis CORDONNIER - Docteur Edouard BARRAT - Docteur Jean-Claude GUEDENET

Docteur Françoise TOUATI - Docteur Chantal KOHLER

3ème sous-section : (*Anatomie et cytologie pathologiques*)

Docteur Yves GRIGNON - Docteur Béatrice MARIE

43ème Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE

1ère sous-section : (*Biophysique et traitement de l'image*)

Docteur Marie-Hélène LAURENS - Docteur Jean-Claude MAYER

Docteur Pierre THOUVENOT - Docteur Jean-Marie ESCANYE - Docteur Amar NAOUN

44ème Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

1ère sous-section : (*Biochimie et biologie moléculaire*)

Docteur Marie-André GELOT - Docteur Xavier HERBEUVAL - Docteur Jean STRACZEK

Docteur Sophie FREMONT - Docteur Isabelle GASTIN - Dr Bernard NAMOUR

2ème sous-section : (*Physiologie*)

Docteur Gérard ETHEVENOT - Docteur Nicole LEMAU de TALANCE - Christian BEYAERT

45ème Section : MICROBIOLOGIE ET MALADIES TRANSMISSIBLES

1ère sous-section : (*Bactériologie, Virologie-Hygiène*)

Docteur Francine MORY - Docteur Michèle WEBER - Docteur Christine LION

Docteur Michèle DAILLOUX

2ème sous-section : (*Parasitologie et mycologie*)

Docteur Marie-France BIAVA - Docteur Nelly CONTET-AUDONNEAU

46ème Section : SANTÉ PUBLIQUE

1ère sous-section : (*Epidémiologie, économie de la santé et prévention*)

47ème Section : HÉMATOLOGIE, CANCÉROLOGIE, IMMUNOLOGIE ET GÉNÉTIQUE

1ère sous-section : (*Hématologie*)

Docteur Jean-Claude HUMBERT - Docteur François SCHOONEMAN

3ème sous-section : (*Immunologie*)

Docteur Marie-Nathalie SARDA

4ème sous-section : (*Génétique*)

48ème Section : ANESTHÉSIOLOGIE, PHARMACOLOGIE, RÉANIMATION ET THÉRAPEUTIQUE

1ère sous-section : (*Anesthésiologie et réanimation chirurgicale*)

Docteur Jacqueline HELMER - Docteur Gérard AUDIBERT

3ème sous-section : (*Pharmacologie fondamentale - Pharmacologie clinique*)

Docteur Françoise LAPICQUE - Docteur Marie-José ROYER-MORROT

Docteur Damien LOEUILLE

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

19ème section : SOCIOLOGIE, DÉMOGRAPHIE

Madame Michèle BAUMANN .

32ème section : CHIMIE ORGANIQUE, MINÉRALE, INDUSTRIELLE

Monsieur Jean-Claude RAFT

40ème section : SCIENCES DU MÉDICAMENT

Monsieur Jean-Yves JOUZEAU

60ème section : MÉCANIQUE, GÉNIE MÉCANIQUE ET GÉNIE CIVILE
Monsieur Alain DURAND

64ème section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
Madame Marie-Odile PERRIN - Mademoiselle Marie-Claire LANHERS

65ème section : BIOLOGIE CELLULAIRE
Mademoiselle Françoise DREYFUSS - Monsieur Jean-Louis GELLY - Madame Anne GERARD
Madame Ketsia HESS - Monsieur Pierre TANKOSIC - Monsieur Hervé MEMBRE

67ème section : BIOLOGIE DES POPULATIONS ET ÉCOLOGIE
Madame Nadine MUSSE

68ème section : BIOLOGIE DES ORGANISMES
Madame Tao XU-JIANG

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS
Médecine Générale
Docteur Gilbert ALIN
Docteur Louis FRANCO

=====

PROFESSEURS ÉMÉRITES

Professeur Georges GRIGNON - Professeur Claude PERRIN
Professeur Jean PREVOT - Professeur Michel MANCIAUX - Professeur Jean-Pierre GRILLIAT
Professeur Michel PIERSON - Professeur Alain GAUCHER - Professeur Michel BOULANGE
Professeur Alain LARCAN - Professeur Michel DUC - Professeur Michel WAYOFF

=====

DOCTEURS HONORIS CAUSA

Professeur Norman SHUMWAY (1972)
Université de Stanford, Californie (U.S.A)
Professeur Paul MICHIELSEN (1979)
Université Catholique, Louvain (Belgique)
Professeur Charles A. BERRY (1982)
Centre de Médecine Préventive, Houston (U.S.A)
Professeur Pierre-Marie GALETTI (1982)
Brown University, Providence (U.S.A)
Professeur Mamish Nisbet MUNRO (1982)
Massachusetts Institute of Technology (U.S.A)
Professeur Mildred T. STAHLMAN (1982)
Wanderbilt University, Nashville (U.S.A)
Professeur Harry J. BUNCKE (1989)
Université de Californie, San Francisco (U.S.A)
Professeur Théodore H. SCHIEBLER (1989)
Institut d'Anatomie de Würzburg (R.F.A)
Professeur Maria DELIVORIA-PAPADOPOULOS (1996)
Université de Pennsylvanie (U.S.A)

Professeur Mashaki KASHIWARA (1996)
Research Institute for Mathematical Sciences de Kyoto (JAPON)
Professeur Ralph GRÄSBECK (1996)
Université d'Helsinki (FINLANDE)
Professeur James STEICHEN (1997)
Université d'Indianapolis (U.S.A)
Professeur Duong Quang TRUNG (1997)
*Centre Universitaire de Formation et de Perfectionnement des
Professionnels de Santé d'Hô Chi Minh-Ville (VIÊTNAM)*

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE,

Monsieur le Professeur P. JONVEAUX

Professeur de Génétique

Vous nous faites l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse.

Nous sommes fiers que vous nous comptiez parmi vos élèves.

Que ce travail soit le témoignage de notre profond respect, de notre reconnaissance et de notre fidélité.

A NOTRE MAITRE ET JUGE

Monsieur le Professeur P. BEY

Professeur de Radiothérapie

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger cette thèse. Nous vous remercions vivement pour la bienveillante attention que vous avez portée à ce travail.

Recevez ici le témoignage de notre sincère reconnaissance.

A NOTRE MAITRE ET JUGE

Monsieur le Professeur Moisan

Professeur de Génétique

Nous vous sommes très reconnaissants d'avoir accepté de juger ce travail.

Veillez trouver ici l'expression de notre gratitude et de nos remerciements les plus sincères.

A NOTRE MAITRE ET JUGE

Madame le Docteur LUPORSI

Praticien hospitalier du service de cancérologie au centre Alexis Vautrin

Votre soutien et votre disponibilité nous ont permis de mener cette étude à bien.

Nous vous sommes très reconnaissants de juger ce travail.

Nous tenons à vous remercier et à vous exprimer notre profond respect.

**Je remercie tous les membres du laboratoire du CHU de Nancy
et tout particulièrement :**

Christophe Philippe pour ses conseils, sa disponibilité et son enthousiasme constants.

Véronique Petit pour son esprit critique et son aide tout au long de mon internat.

Violaine Bourdon pour ses conseils et ses séquences.

Michèle Chery pour son enthousiasme et sa compétence dont elle m'a fait profiter au début de mon internat.

Alain Le Bret pour ses photos.

A mes parents,

sans leur patience, rien n'aurait été possible. Je leur offre ce travail en gage de mon amour.

A ma famille.

A tous mes amis.

SERMENT

"Au moment d'être admis à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité. Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux. Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité. J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences. Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me sont confiés. Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs. Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité. Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré et méprisé si j'y manque".

TABLES DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	17
INTRODUCTION	18
1- Epidémiologie	19
2- Formes cliniques	20
2.1. Site spécifique	20
2.2. Sphère spécifique	21
2.3. Sphère anatomique différente	21
2.4. Cancer du sein chez l'homme	23
2.5. Maladie par aberration chromosomique	24
3- Génétique formelle	24
3.1. Le gène, unité de fonction	24
3.2. Mode de transmission	24
4- Mécanismes moléculaires de la cancérogenèse	25
4.1. Le cycle cellulaire	26
4.2. Les proto-oncogènes	30
4.3. Les gènes suppresseurs de tumeur	30
4.4. Les gènes <i>Caretakers</i> et <i>Gatekeepers</i>	33
5- Gènes de prédisposition aux cancers du sein et /ou de l'ovaire	34
5.1. BRCA1 (BREast CANcer 1)	34
5.1.1. Le gène	34
5.1.2. La protéine	35
5.1.3. Les fonctions	36
5.1.4. Les mutations	40
5.1.5. Corrélations génotype-phénotype	41
5.2. BRCA2 (BREast CANcer 2)	42

5.2.1. Le gène	42
5.2.2. La protéine	43
5.2.3. Les mutations	43
6- Méthodes de détection des mutations inconnues	43
6.1. Détection des mutations dans des produits de PCR de petite taille, sans localisation précise	45
6.1.1. L'électrophorèse d'ADN simple brin (SSCP)	45
6.1.2. L'électrophorèse d'ADN hétéroduplex (HMA et CSGE)	45
6.1.3. La méthode DGGE	47
6.2. Méthodes permettant le criblage de fragments d'ADN de grande taille	48
6.2.1. Le test de protéine tronquée (PTT)	48
6.2.2. La méthode FAMA	48
6.2.3. La méthode DHPLC	49
6.2.4. Les puces à ADN	50
7- Indications d'une recherche de mutation germinale	50
8- La consultation d'oncogénétique	53
8.1. Objectifs de la consultation d'oncogénétique	53
8.2. Indications d'une consultation d'oncogénétique	54
8.3. Problèmes posés par la consultation d'oncogénétique	54
9- Prise en charge	55
9.1. Cas des femmes n'ayant pas développé de cancer du sein ou de l'ovaire	55
9.2. Cas des femmes ayant déjà été traitées pour un cancer du sein ou de l'ovaire	58
OBJECTIF DE L'ETUDE	59

MATERIEL ET METHODES	62
1- Recueil des familles	63
2- Extraction et dosage de l'ADN génomique total	63
3- Amplification <i>in vitro</i> d'ADN par PCR	63
4- Technique de CSGE	66
4.1. Préparation du gel	66
4.2. Préparation des échantillons	67
5- Séquençage	70
RESULTATS	71
1- Recueil des familles	72
2- Mise au point des PCR	72
3- Recherche de variant par CSGE	73
4- Séquençage	74
DISCUSSION	79
1- Choix de la stratégie	79
2- Choix des exons à tester	79
3- Etape de pré-criblage, choix de la technique de CSGE	80
4- Identification de mutations délétères	80
5- Identification de polymorphismes	84
CONCLUSION	87
BIBLIOGRAPHIE	89

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS

°C :	Degré Celsius
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc:	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm:	Acide ribonucléique messenger
AT :	Ataxie-Télangiectasie
BRCA1 :	BReast CAncer 1, gène majeur de prédisposition au cancer du sein
BRCA2 :	BReast CAncer 2, gène majeur de prédisposition au cancer du sein
CSGE :	Conformation sensitive gel electrophoresis
CSP :	Codon stop prématuré
DGGE :	Denaturing gradient gel electrophoresis
DHPLC :	Denaturing high performance liquid chromatography
dNTP :	Mélange des quatre désoxyribonucléotides triphosphates
EDTA :	Acide éthylène diamine tétra-acétique
FAMA :	Fluorescence assisted mismatch analysis
FNCLCC :	Fédération nationale des centres de lutte contre le cancer
HMA :	Heteroduplex mobility assay
HNPCC :	Hereditary non polyposis colorectal cancer
INSERM :	Institut national de la santé et de la recherche médicale
kb :	Kilobase
kDa :	Kilodalton
LOH :	Loss of heterozygosity
M, nM, pM :	molaire, nanomolaire, picomolaire
MgCl ₂ :	Chlorure de magnésium
ml, µl :	millilitre, microlitre
min :	Minute
pb :	Paires de bases
PCR :	Polymerase chain reaction
PTT :	Protein truncation test
RB :	Rétinoblastome
RT-PCR :	Transcription reverse suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne
SSCP :	Single-strand conformation polymorphism
Taq :	Thermus aquaticus
U :	Unité
UV :	Ultraviolet

INTRODUCTION

1- Epidémiologie

Le cancer du sein est la tumeur maligne la plus fréquente de la femme dans le monde (71). En France, près de 26 000 nouveaux cas sont diagnostiqués tous les ans avec une survie à 5 ans, tous stades confondus, supérieure à 50%. Une femme sur 10 à 12 en sera atteinte (11). Le cancer de l'ovaire est 7 à 10 fois moins fréquent. Il représente, cependant, le quatrième cancer de la femme et la cinquième cause de mortalité par cancer en partie en raison d'un diagnostic à un stade avancé (17, 53). La survie du cancer de l'ovaire à 5 ans est de 30%. Ces données correspondent à l'ensemble des cancers, qu'ils soient liés ou non à une prédisposition génétique.

Concernant les cancers se développant chez des personnes ayant une prédisposition d'origine génétique, les études épidémiologiques ont montré qu'entre 5 et 10% des cas de cancer du sein et de l'ovaire sont dus à une prédisposition transmise selon le mode autosomique dominant (74, 104). Ce faible pourcentage représente, cependant, de part la fréquence élevée de ces deux localisations tumorales, un nombre de sujets plus important que n'importe quelle autre pathologie héréditaire non cancéreuse. On peut en effet estimer, chaque année, entre 1 300 et 2 600 le nombre de cancers du sein et entre 200 et 400 le nombre de cancers de l'ovaire liés à une prédisposition génétique. BRCA1 (BReast CAncer 1) et BRCA2 (BReast CAncer 2) sont les deux gènes le plus souvent retrouvés mutés dans ces formes héréditaires (50% des syndromes familiaux de cancers du sein et de l'ovaire).

Au plan individuel, les femmes ayant une altération du gène BRCA1 ont un risque de développer un cancer du sein avant l'âge de 80 ans compris entre 56 (89) et 87% (28) (le risque cumulé de cancer du sein est de 8% pour les femmes non porteuses du gène muté). La mortalité du cancer du sein étant de 40%, environ 20 à 30% des femmes ayant une mutation de BRCA1 risquent de mourir d'un cancer du sein (le risque est de 3% pour les femmes sans prédisposition génétique). Le risque de développer un cancer de l'ovaire avant 80 ans est estimé à 16 % (89) pour les femmes porteuses d'une mutation de BRCA1 (le risque cumulé de cancer de l'ovaire est de 0,9% pour les femmes non porteuses du gène muté). La mortalité du cancer de l'ovaire étant de l'ordre de 75%, environ 12 à 14% des femmes ayant une mutation de BRCA1 risquent de mourir d'un cancer de l'ovaire (le risque est de 0,7% pour

une femme sans prédisposition génétique). On peut ainsi évaluer à 1 sur 200 le nombre de femmes ayant le niveau de risque conféré par une mutation de BRCA1 prédisposant au cancer du sein/ovaire dans la population générale des pays industrialisés.

2- Formes cliniques

L'analyse des résultats issus d'études d'épidémiologie a permis, en premier lieu, de suggérer l'existence d'une prédisposition génétique au cancer puis d'identifier certaines présentations cliniques ou phénotypes particuliers associés à un contexte héréditaire et d'estimer leurs paramètres génétiques (fréquence génique, pénétrance, expressivité et mode de transmission) (83). Certaines caractéristiques cliniques évocatrices de prédisposition génétique ont été décrites dans des modèles que sont le rétinoblastome, la polypose colique familiale et le cancer médullaire de la thyroïde. Il s'agit de la précocité, de la bilatéralité, de la multifocalité des atteintes, de l'existence d'un état précancéreux ou d'associations tumorales. Cependant, pour les tumeurs communes, il est souvent difficile d'affirmer l'hérédité et ainsi de différencier un cas héréditaire d'un cas sporadique (association fortuite de tumeurs sporadiques). Pour porter le diagnostic de formes héréditaires (ou prédispositions génétiques), il faut rechercher des arguments supplémentaires et notamment une histoire familiale évocatrice, l'existence dans la famille ou chez un même individu d'associations tumorales caractéristiques ou de certains symptômes évoquant un syndrome rare tel que la maladie de Cowden ou syndrome des hamartomes multiples.

Dans les formes héréditaires, les cancers du sein ou de l'ovaire peuvent être associés ou non à d'autres lésions et l'on décrit principalement les présentations suivantes :

2.1. Site spécifique

Cette forme, appelée syndrome du cancer du sein familial isolé ou syndrome du cancer du sein seul est la plus commune (21). De la même manière, il a été décrit de rares formes familiales de cancer de l'ovaire isolé sans association à des cancers du sein précoces (87).

2.2. Sphère spécifique

Les femmes d'une même famille peuvent développer indifféremment des tumeurs du sein ou de l'ovaire. Ce phénotype, appelé syndrome du cancer du sein et de l'ovaire, ou syndrome sein-ovaire, est le mieux défini. D'autres lésions ont été retrouvées associées aussi bien au cancer du sein seul qu'au syndrome sein-ovaire (21). Pour les familles liées à BRCA1, il s'agit principalement des cancers du colon et de la prostate (3, 28, 19). Dans d'autres cas liés au gène BRCA2, on retrouve un spectre d'expression tumoral plus varié avec, outre les néoplasies précédemment décrites, des cancers du pancréas, de l'estomac, de l'endomètre, des hémopathies malignes (4, 93, 95). Ces associations peuvent rappeler des syndromes de Lynch ou HNPCC (*Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer*). Le pourcentage de cancers du sein lié à BRCA2 semble plus faible que ce qui avait été initialement estimé et des analyses de liaison sont en faveur de l'existence d'un ou plusieurs autres gènes de prédisposition aux cancers du sein ou de l'ovaire (citons, en particulier, la localisation de BRCA3 sur le bras court du chromosome 8 dans la région p12-21).

2.3. Sphère anatomique différente

Le syndrome de Li-Fraumeni (54, 55) de transmission autosomique dominante associe, dans une branche familiale, un sarcome avant l'âge de 45 ans, un apparenté au premier degré ayant développé un cancer quel qu'il soit avant l'âge de 45 ans et un apparenté au premier degré ou deuxième degré ayant développé un sarcome quel que soit l'âge ou un cancer avant l'âge de 45 ans. Le cancer du sein est la tumeur la plus représentée chez les femmes atteintes (43% d'après une étude internationale sur 81 familles) (92). Le risque de cancer du sein d'une femme atteinte d'un syndrome de Li-Fraumeni, avant 45 ans, est multiplié par 18 par rapport à la population générale (33) et pourrait être de 50% à 50 ans. Ce risque n'augmenterait que faiblement après la ménopause. L'anomalie responsable de la majorité des cas est une mutation germinale du gène TP53 qui a pu être mise en évidence dans 50 à 70% des familles étudiées. Ce gène, situé sur le bras court du chromosome 17, est un gène suppresseur de tumeur qui joue un rôle central dans l'ensemble des mécanismes de l'ontogenèse, en particulier, la régulation du cycle cellulaire, l'induction du système de réparation de l'ADN, les processus d'apoptose.

Le syndrome de Lynch II (syndrome du cancer familial) de transmission autosomique dominante associe le plus souvent aux cancers mammaires, des tumeurs coliques, gastriques, endométriales, ovariennes et des voies urinaires (60, 61). Le cancer du sein ne fait pas habituellement partie du spectre d'expression tumorale de ce syndrome. Cependant, il a été décrit certaines familles présentant un nombre élevé de cancers du sein. Il peut s'agir d'agrégations fortuites, d'une double hérédité ou d'un phénomène rare non mis en évidence dans les études de population du fait de la trop petite taille des échantillons analysés. Cette association a notamment été décrite au sein de familles impliquant hMLH1 (44), gène impliqué dans les systèmes de réparation de l'ADN.

La maladie de Cowden ou syndrome des hamartomes multiples est une maladie rare où l'on trouve principalement des lésions cutanéomuqueuses (plus de six trichilemmomes , hyperkératose palmoplantaire en îlot, papillomatose buccale, langue scrotale) et des néoplasies de divers organes (thyroïde, sphère gynécologique, tractus digestif). 20% des femmes présentent un adénocarcinome mammaire d'apparition précoce et souvent bilatéral. La transmission héréditaire est de type autosomique dominant. Le gène en cause, PTEN, a été cloné en 1997 et est localisé sur le chromosome 10.

L'ataxie télangiectasie (AT) est une maladie autosomique récessive associant instabilité chromosomique et déficit immunitaire combiné (6). Elle affecte environ un enfant sur 40 000 naissances vivantes. Les patients présentent des télangiectasies cutanées (surtout faciales) et conjonctivales apparaissant après 5 ans, une ataxie cérébelleuse progressive d'origine dégénérative apparaissant à partir de 1 à 2 ans et généralement toujours présente à 6 ans, avec parfois dyspraxie oculomotrice et dysarthrie progressive, un déficit de l'immunité cellulaire et humorale avec anomalie du développement thymique (dysgénésie), une hypersensibilité aux rayons ionisants mais non aux ultra violets, un important risque de pathologies cancéreuses et un vieillissement précoce. L'aggravation neurologique est inéluctable. L'évolution est péjorative puisque l'âge moyen de décès est de 25 ans. Les deux causes de mortalité les plus fréquentes sont les cancers et les infections bactériennes. La prédisposition héréditaire aux cancers est importante, puisque, avant l'âge de 12 ans, 10% des enfants porteurs de la maladie ont déjà développé un cancer. Le plus souvent, il s'agit

d'hémopathies lymphoïdes malignes (leucémie lymphoïde, lymphome) se développant surtout avant 15 ans, l'incidence devenant ensuite plus faible (91). Après 15 ans, la fréquence des tumeurs épithéliales augmente alors, affectant l'estomac, le foie, l'utérus ou encore l'ovaire. Les hétérozygotes sont généralement sains mais présentent une radiosensibilité cellulaire et une instabilité chromosomique spontanée (non détectable en étude cytogénétique). Différents auteurs ont rapporté un taux d'incidence de cancers plus élevé que dans la population générale (73) (risque relatif de cancer à 3,7 chez l'homme et à 3,5 chez la femme) et en particulier un risque accru pour les femmes de développer un cancer du sein (8). Considérant la fréquence estimée des hétérozygotes AT dans la population générale (0,5 à 1%) et le risque relatif des cancers du sein, 4,3% des nouveaux cas de cancers du sein apparaîtraient chez des femmes hétérozygotes AT. Pourtant, cette notion de risque de néoplasies mammaires chez les femmes hétérozygotes AT reste imprécise car ne reposant que sur quelques études (2).

2.4. Cancer du sein chez l'homme

Il est rare puisqu'il représente moins de 1% de l'ensemble des cancers du sein. On peut cependant retrouver chez certaines familles des cancers du sein chez l'homme associés aux tumeurs gynécologiques et principalement dans le cancer du sein seul et le syndrome sein-ovaire (52, 88). Par contre, les familles où seuls les hommes sont atteints sont exceptionnelles. C'est le cas du syndrome de Reifenstein, affection récessive liée au chromosome X, où les sujets présentent des signes de résistance aux androgènes. Dans la littérature, on ne retrouve que deux familles présentant ce syndrome associé au cancer du sein chez l'homme (57, 107). Il correspond à des mutations dans le gène codant le récepteur aux androgènes et se traduit phénotypiquement par une ambiguïté sexuelle chez un homme 46,XY avec un hypospadias périnéoscrotal, une pilosité pubienne et axillaire normales, une barbe rare, une gynécomastie, des testicules souvent cryptorchides, aucun dérivé müllérien et un développement des structures wolffiennes variable selon le degré de masculinisation. Biologiquement, on note un taux de LH plasmatique élevé, un taux de testostérone plasmatique normal ou élevé, un taux plasmatique et une production d'œstrogènes plus élevés que chez des hommes normaux.

2.5. Maladie par aberration chromosomique

Bien qu'il ne s'agisse pas à proprement parler de maladies héréditaires, citons le syndrome de Klinefelter et le syndrome de Turner pour lesquelles des associations respectivement avec le cancer du sein et de l'ovaire ont été rapportées (24, 59).

3- Génétique formelle

3.1. Le gène, unité de fonction

Un gène est l'unité fonctionnelle élémentaire du patrimoine génétique de tout être vivant. L'ensemble des gènes détermine à la fois les caractéristiques communes à tous les membres d'une espèce et les caractéristiques propres à chaque individu. On estime qu'il y a chez l'homme entre 70 et 100.000 gènes différents. Un gène est une combinaison définie de 4 lettres A, T, C, G, initiales des 4 bases organiques élémentaires (Adénine, Thymine, Cytosine, Guanine). Cet alphabet de 4 lettres constitue le code génétique. La combinaison de 3 bases constitue un second alphabet de 20 acides aminés.

3.2. Mode de transmission des formes liées à BRCA1 et BRCA2

On connaît actuellement les 2 gènes majeurs dont les anomalies peuvent être responsables d'un risque très élevé de cancer du sein (et à un degré moindre de l'ovaire). La transmission d'une altération d'un des deux gènes BRCA est dite autosomique dominante :

- « autosomique » signifie que la prédisposition génétique intéresse des gènes non situés sur les gonosomes mais sur 2 autosomes distincts (chromosomes 13 et 17),
- « dominante » car il suffit qu'un seul gène altéré provenant du père ou de la mère soit transmis à une de leurs filles, pour que son risque de développer un cancer du sein à l'âge adulte soit très élevé. Le second gène transmis présent sur le chromosome homologue est normal. La prédisposition est transmise à l'état hétérozygote.

Les hommes comme les femmes, peuvent être porteurs d'une anomalie de l'un ou l'autre de ces gènes, la transmettre à leur descendance, sans développer eux-mêmes la maladie. On parle de pénétrance incomplète (la pénétrance est le rapport entre le nombre des individus exprimant un trait phénotypique donné et le nombre des individus porteurs du caractère génotypique correspondant). Chez la femme, elle est élevée, estimée à 80% pour BRCA1, ce qui signifie que sur 100 femmes porteuses d'une mutation germinale au sein du gène de prédisposition, 80 développeront un cancer du sein au cours de la vie. Il arrive, qu'un homme soit atteint d'un cancer du sein. Ces cas sont très rares et sont le plus souvent associés à une anomalie du gène BRCA2 (la pénétrance liée à ce gène chez l'homme reste cependant faible).

4- Mécanismes moléculaires de la cancérogenèse

Les avancées considérables de la biologie moléculaire ont permis d'identifier des altérations moléculaires à l'origine de tumeurs sporadiques ou de prédispositions génétiques aux cancers.

L'étude moléculaire des formes héréditaires et des formes sporadiques de cancers a montré que ces deux formes résultaient, dans la plupart des cas, de l'altération des mêmes gènes. Le cancer est une maladie génétique de la cellule. La transformation d'une cellule normale en une population de cellules tumorales passe par une accumulation d'altérations touchant des gènes intervenant dans le fonctionnement normal de la cellule. Chacune des anomalies génétiques acquises par la cellule lui confère un avantage sélectif. Cette cellule va se multiplier plus rapidement que les cellules voisines, donner naissance à des cellules filles identiques qui vont continuer à se diviser de façon anarchique. Cette population cellulaire va poursuivre le processus de cancérisation. L'exposition à des agents cancérogènes divers (substances chimiques, radiations...) augmente la probabilité d'aboutissement de ce processus multi-étapes (cancérogenèse) jusqu'au point où il devient irréversible et correspond alors à une tumeur maligne, un «cancer». Le nombre d'événements génétiques nécessaires intervenant dans la cancérogenèse est probablement très variable en fonction du type de processus néoplasique.

Les cancers sporadiques, fréquents dans la population générale, sont liés à l'accumulation d'anomalies génétiques acquises par les cellules tumorales.

Pour les cancers héréditaires, qui représentent seulement 5% (11, 20, 74) de la plupart des cancers, il existe une première anomalie génétique constitutionnelle (prédisposition génétique), transmissible, présente dans toutes les cellules du corps. Le fait qu'elle soit constitutionnelle (innée), explique la survenue précoce, multifocale et bilatérale des cancers chez les sujets porteurs d'une telle anomalie génétique. Dans les formes héréditaires de cancer la première étape du processus de cancérisation est en effet franchie dès la conception du sujet dont on dira qu'il est prédisposé à un ou plusieurs cancer(s), selon le(s) gène(s) altéré(s).

4.1. Le cycle cellulaire

Une cellule qui ne cesse de se diviser passe par quatre phases successives (figure 1) :

- la phase G1 (pour Gap1 ou intervalle 1) est une phase de préparation, sa durée est très variable (de quelques heures à quelques jours). Cette phase définit la durée du cycle cellulaire puisque les autres phases ont une durée relativement constante,
- après cette phase, la cellule entre en phase S, phase de synthèse durant laquelle l'ADN est dupliqué (7 heures),
- suit une deuxième phase Gap G2, d'une durée d'environ 3 heures.
- Enfin, se produit la phase de mitose M.

A la fin de la mitose, deux cellules identiques à la première sont obtenues ces deux cellules entrent en phase G1 et le cycle reprend. Il existe, en fin de phase G1, un point de restriction R qui constitue un point de non-retour. Quand les cellules ont atteint ce stade, elles ne peuvent qu'entamer un cycle cellulaire ; auparavant, il leur est possible de se différencier. Ce point constitue une limite de réversibilité entre les choix dans le développement d'une cellule.

Si les cellules arrêtent de se diviser, le cycle est interrompu. Les cellules entrent en phase G0 ou phase quiescente. Certaines cellules, comme les cellules nerveuses, y resteront durant

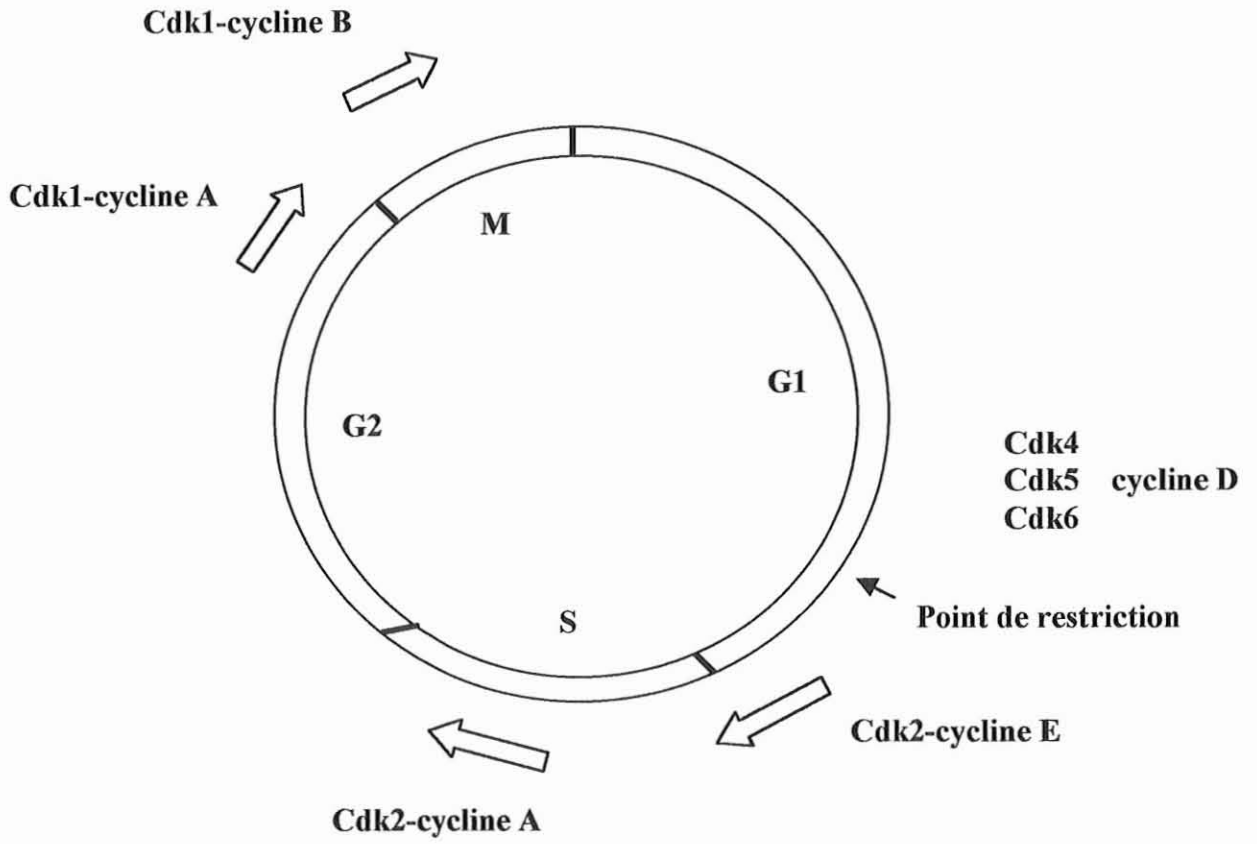


Figure 1. Cycle cellulaire physiologique. Principales Cdk-cyclines

toute la vie de l'individu. D'autres y resteront un temps indéterminé jusqu'à ce qu'un stimulus les introduise à nouveau en phase G1 et les réintègre dans un cycle mitotique.

Dans les cellules humaines, plus d'une cinquantaine de gènes sont induits par la présence de dommages sur l'ADN. Des réponses cellulaires aux lésions de l'ADN concourent à initier le programme d'élimination des cellules endommagées (apoptose), à bloquer la progression des cellules dans le cycle et, par là-même, à accorder un délai au cours duquel la réparation de l'ADN lésé est effectuée. La coordination des événements associés à la progression des cellules dans le cycle est essentielle pour la transmission d'un matériel génétique non endommagé, d'où l'existence de voies métaboliques de contrôle de l'intégrité du génome.

L'ensemble des transitions du cycle cellulaire est contrôlé par une famille de protéines kinases appelées Cdk (*Cyclin-dependent kinase*) et leurs partenaires obligatoires pour activer le cycle cellulaire, les cyclines. A ce jour, huit Cdk (1 à 8) et les huit types de cyclines (A à H) ont été mises en évidence. La régulation du cycle cellulaire réside dans l'existence de « points de contrôle » entre les différentes phases. Le point de contrôle le plus important est le point de restriction R en fin de phase G1.

La formation et l'activation des complexes Cdk-cyclines, à des moments précis et ordonnés, permettent la progression le long du cycle cellulaire et le passage des différents points de contrôle. Un dysfonctionnement de ces « points de contrôle » est observé dans un grand nombre de tumeurs. L'originalité de ce point de contrôle vient du fait que chaque cycline est synthétisée à une période bien précise du cycle cellulaire et s'associe avec une série définie de kinases Cdk. Les principales cyclines sont actuellement divisées en deux groupes, les cyclines mitotiques (A et B) et les cyclines G1 (C, D et E).

Aux cours des deux dernières décennies, de nombreuses altérations génétiques perturbant le cycle cellulaire ont été identifiées. Ces travaux ont conduit à reconnaître deux mécanismes fondamentaux dans la transformation maligne : l'activation de proto-oncogènes et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur. Par exemple, le produit du gène du rétinoblastome (RB), suppresseur de tumeur, joue un rôle important dans le passage des points de contrôle : inactivé lorsqu'il est phosphorylé, il se dissocie des facteurs de

transcription de la famille E2F et permet l'expression des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN par excision de nucléotides. La protéine p53, autre gène suppresseur de tumeur, est également un relais moléculaire important dans le contrôle du cycle cellulaire. Les dommages produits dans l'ADN par les radiations ou par certains agents chimiques provoquent une accumulation de cette protéine dans le noyau de cellules de mammifère conduisant à un arrêt du cycle cellulaire en G1/S.

L'activation de proto-oncogènes représente la dérégulation d'un potentiel de stimulation de la prolifération cellulaire par un gène possédant déjà cette fonction bien contrôlée dans la physiologie de la cellule normale. Trois mécanismes peuvent expliquer ce gain de fonction :

- une modification qualitative de l'activité biologique du produit du gène par suite d'une mutation (exemple activité Tyrosine protéine kinase constitutive),
- une augmentation du nombre de copies du gène sauvage par amplification génique (exemple erbB-2) (96),
- une transcription constitutive par déplacement en aval d'un promoteur fort lors d'un réarrangement chromosomique (exemple myc privé de ses régions de contrôle et placé dans un domaine chromatinien actif dans la translocation (8;14) est responsable du lymphome de Burkitt) (23).

Par opposition, **l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeur** a pour conséquence la perte de fonction d'un gène de contrôle négatif de la division cellulaire (50, 102). Cette perte de fonction peut résulter soit d'une mutation ponctuelle (exemple TP53), soit d'une délétion partielle ou complète du gène (exemple p16), soit d'une anomalie de méthylation du gène (exemple hMLH1) dont la conséquence est l'extinction de l'expression. Les gènes RB ou TP53 sont les exemples les mieux décrits de gènes suppresseurs de tumeur.

Le cancer résulte de la transformation maligne de cellules ayant subi une cascade de mutations mettant en œuvre une combinatoire de gains et de pertes de fonction. La très grande majorité des cancers serait sporadique, les mutations ayant été acquises accidentellement à la suite de l'exposition à des agents génotoxiques (substances chimiques ou irradiations). On

peut néanmoins reconnaître des formes héréditaires de la plupart des cancers (environ 5% de la totalité des cancers).

4.2. Les proto-oncogènes

L'activation de proto-oncogènes cellulaires en oncogènes a été le premier mécanisme identifié lors de l'oncogénèse chez l'homme. Les proto-oncogènes cellulaires ont été initialement définis par leur homologie avec les oncogènes des rétrovirus transformants qui sont responsables de tumeurs d'apparition rapide chez l'animal. Ultérieurement, les proto-oncogènes cellulaires ont été identifiés par des expériences de transformation *in vitro* de fibroblastes de souris, après transfection (introduction dans la cellule) d'ADN génomique extrait de tumeurs humaines. Cette expérience, permettant de détecter la forme activée de certains proto-oncogènes ou oncogènes, est positive dans environ 15% des tumeurs malignes humaines. Enfin, l'activation de proto-oncogènes pouvant résulter d'un réarrangement chromosomique (telle une translocation), leur étude moléculaire, réalisée spécifiquement dans les cancers, constitue une approche très efficace pour identifier de nouveaux proto-oncogènes. Les protéines codées par les proto-oncogènes interviennent normalement dans toutes les étapes de transduction de signaux de la membrane au noyau qui, en particulier, régissent de façon positive la division cellulaire et contrôlent la différenciation cellulaire.

4.3. Les gènes suppresseurs de tumeur

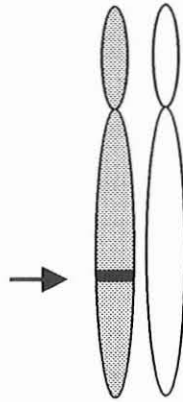
L'hypothèse de l'existence de facteurs cellulaires capables de prévenir le développement de tumeurs a été formulée pour la première fois en 1969. En effet, à cette époque, Harris et coll. (40) ont montré chez la souris que la fusion *in vitro* d'une lignée cellulaire tumorigène avec une lignée non tumorigène engendrait des hybrides non tumorigènes. En 1981, l'équipe de Stanbridge (86) montra que de tels hybrides cultivés *in vitro* pouvaient redevenir tumorigènes à la suite de la perte sélective de certains chromosomes suggérant que des gènes présents sur ces chromosomes étaient capables de supprimer le phénotype tumorigène.

L'histoire des gènes suppresseurs de tumeur est étroitement liée à l'étude des formes héréditaires de cancer. Dès 1971, Alfred Knudson (49) proposait, pour expliquer la double présentation du rétinoblastome, sporadique ou familial, un modèle basé sur la nécessité de deux événements (figure 2). Dans les formes familiales, le premier événement est germinale et le second somatique. Le premier événement correspond à la transmission d'un allèle muté au niveau d'un locus hypothétique, appelé locus RB. Cette mutation est donc présente à l'état hétérozygote dans toutes les cellules de l'individu qui l'hérite, mais ne s'exprime pas phénotypiquement car elle est récessive au niveau cellulaire. Le second événement correspondrait à la perte ou à la mutation de l'allèle normal RB provenant de l'autre parent, ce qui démasquerait la mutation préexistante du gène RB. Ce deuxième événement serait somatique et conduirait à la transformation cellulaire lorsqu'il se produit dans certaines cellules, en particulier celles de la rétine. Dans les formes sporadiques, les deux événements altérant successivement les deux allèles surviendraient au niveau somatique. Ainsi, quelle que soit la présentation épidémiologique de la maladie, le résultat serait donc l'altération, dans une cellule de la rétine, des deux allèles RB.

L'identification du gène Rb en 1986 (31), a permis de valider le modèle de Knudson sur le plan moléculaire. Par la suite, de nombreux gènes suppresseurs de tumeur ont été rapidement identifiés par une approche classique de clonage positionnel à partir des familles atteintes de formes héréditaires de cancer. L'observation d'anomalies chromosomiques constitutionnelles associées a facilité, dans certains cas, le clonage des gènes suppresseurs de tumeur. Ce fut le cas des délétions 13q14 identifiées chez environ 5% des patients atteints de rétinoblastomes héréditaires ou des translocations équilibrées impliquant la région q11 du chromosome 17 observées dans la neurofibromatose de type 1.

D'autres approches d'identification de nouveaux gènes suppresseurs de tumeur, basées sur le modèle de Knudson, ont été développées. Ces approches consistent à comparer le génome des cellules normales à celui des cellules tumorales afin de détecter et de localiser une ou des perte(s) allélique(s). Ces délétions sont mises en évidence en comparant l'ADN tumoral à l'ADN des lymphocytes du même patient au niveau de locus polymorphes, ce qui permet de détecter des pertes d'hétérozygotie (*loss of heterozygosity* ou LOH). Ces altérations identifiées à la fin des années 80 ne correspondaient pas aux altérations caractéristiques des

1^{er} événement : mutation dans l'ADN germlinal ou somatique



2^{ème} événement : un accident somatique dans une cellule perturbe le même locus sur le chromosome homologue



ADN tumoral

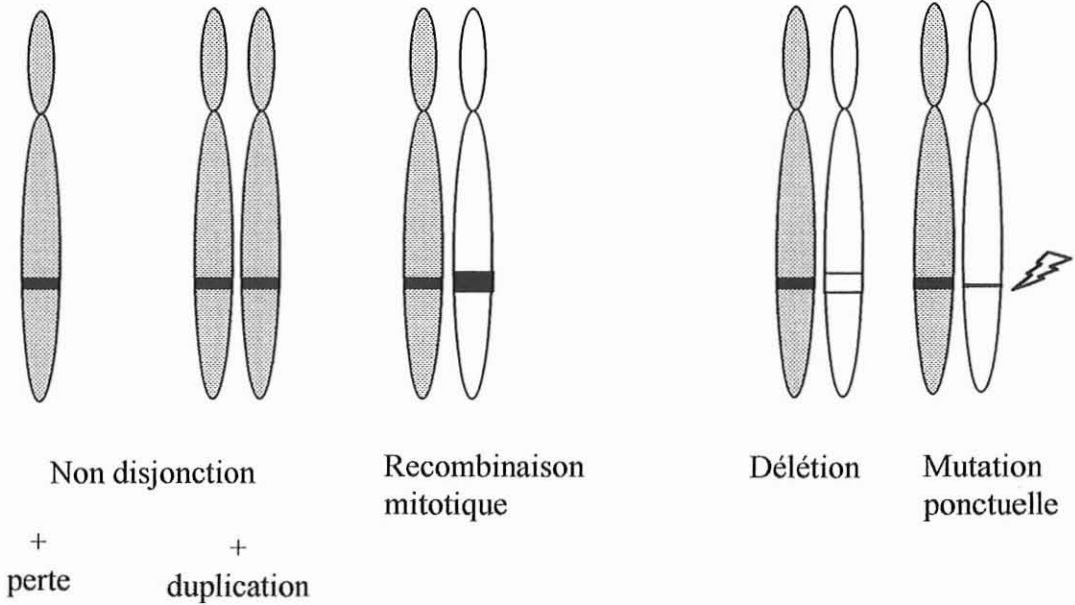


Figure 2. Modèle de Knudson. Déterminisme des mutations récessives portant sur des gènes suppresseurs de tumeur

proto-oncogènes, ce qui a étayé la thèse de l'existence d'un nouveau mécanisme à l'origine de la transformation maligne. Aujourd'hui, la perte d'hétérozygotie à un locus donné dans un cancer est un argument en faveur de la présence d'un gène suppresseur de tumeur dans la zone délétée.

Il est important de noter qu'il existe un apparent paradoxe entre le mode de transmission et les mécanismes moléculaires: en effet, cet événement est dominant sur le plan génétique puisqu'il constitue la base moléculaire des formes héréditaires de cancer dont la transmission est autosomique dominante. En revanche, cet événement apparaît récessif sur le plan cellulaire, puisque la transformation maligne de la cellule nécessitera l'inactivation du second allèle. Cet apparent paradoxe s'explique probablement par le taux élevé de mutations somatiques dans un tissu. Alors que ces mutations n'auront pas d'effet phénotypique chez un individu normal, elles aboutiront de façon quasi systématique, en revanche, chez l'individu présentant dans toutes ses cellules une mutation constitutionnelle d'un gène suppresseur de tumeur, à l'inactivation complète de ce gène et donc à la transformation de la cellule.

4.4. Les gènes *Caretakers* et *Gatekeepers*

Ce concept récent (48) est né de la découverte de certains gènes qui ne sont pas impliqués directement dans le processus néoplasique mais qui augmentent le risque d'apparition d'un cancer : les gènes de réparation de l'ADN.

Les gènes *Gatekeepers* sont des gènes qui agissent directement sur la croissance tumorale en l'inhibant ou en induisant l'apoptose (mort cellulaire programmée). L'inactivation d'un gène *Gatekeeper* donné est responsable d'un cancer d'un tissu précis. Par exemples, les mutations héritées dans le cadre du rétinoblastome, de la neurofibromatose de type 1 ou de la polypose colique familiale touchent la rétine, les cellules de Schwann ou le colon, respectivement. L'apparition d'une tumeur nécessite l'altération des deux copies, maternelle et paternelle, du gène en accord avec le modèle de Knudson.

En revanche, l'inactivation d'un gène *Caretaker* n'initie pas directement la tumeur mais entraîne une instabilité génétique responsable d'une plus grande fréquence de mutations de tous les gènes dont les gènes *Gatekeepers*. Dans cette situation, trois événements supplémentaires sont nécessaires à l'apparition d'une tumeur : une mutation de l'allèle normal du gène *Caretaker* hérité du parent sain, suivi d'une mutation des deux allèles d'un gène

Gatekeeper. Trois mutations étant nécessaires, le risque de cancer dans une famille prédisposée est 5 à 50 fois supérieur à celui de la population générale mais reste cependant nettement inférieur à celui lié à une prédisposition d'un gène *Gatekeeper*. Qui plus est, les mutations des gènes *Caretakers* sont rarement attendues dans les cancers sporadiques, puisqu'il faut 4 mutations successives pour permettre l'apparition de la tumeur (l'altération des deux allèles du gène *Caretaker* suivie de l'inactivation des deux allèles du gène *Gatekeeper*). Parmi les gènes *Caretakers* connus, citons, entre autres, les gènes de réparation de l'ADN responsable en particulier du syndrome HNPCC et du xeroderma pigmentosum et le gène ATM impliqué dans l'ataxie télangiectasie. Les gènes BRCA1 et BRCA2 appartiennent également probablement à cette famille de gènes.

5- Gènes de prédisposition aux cancers du sein et /ou de l'ovaire

5.1. BRCA1 (BREast CAncer 1)

5.1.1. Le gène

L'histoire est jalonnée de descriptions anecdotiques de familles avec agrégation de cas de cancers du sein mais la première description d'une famille faisant suspecter une origine héréditaire au cancer a été publiée par P. Broca en 1866. Ce n'est que plus d'un siècle plus tard, en 1990, que sera localisé sur le bras long du chromosome 17 dans la région q21 (38) le premier gène de prédisposition au cancer du sein et de l'ovaire. Quatre ans plus tard, le gène BRCA1 était cloné par le groupe de Mark Skolnick (63). C'est un gène de très grande taille, composé de 24 exons recouvrant plus de 80 kb d'ADN génomique. Sa séquence codante est constituée de 22 exons et donne naissance à un ARN messager d'une longueur de 7,8 kb. Cependant, un grand nombre de variants a été décrit (épissages alternatifs) ; ainsi, certains messagers ne comprennent pas l'exon 11, correspondant à plus de 50% de la séquence codante (58, 63). BRCA1 est exprimé de manière ubiquitaire, bien que plus abondamment dans le testicule et le thymus. Ce gène, bien que très polymorphe, est assez bien conservé chez les mammifères.

5.1.2. La protéine

L'ARN messager majeur du gène BRCA1 code une protéine nucléaire de 1863 acides aminés (63), de poids moléculaire de 220 kDa. Cette protéine présente trois domaines identifiés par analogie de séquence avec des motifs polypeptidiques connus (figure 3) :

- un domaine à doigt Ring (5, 63) situé dans la région amino-terminale liant potentiellement le zinc suggérant que la protéine BRCA1 puisse être impliquée dans des interactions avec d'autres protéines et/ou avec l'ADN (76). Ce domaine est effectivement impliqué dans l'interaction avec BARD1 (BRCA1 associated RING domain) (108), l'un des partenaires protéiques identifiés de BRCA1,
- un excès net de 70 résidus acides, responsable d'une surcharge négative à proximité de l'extrémité carboxy-terminale comprenant un motif de type granine consensus entre les acides aminés 1214-1223. La protéine est de fait retrouvée dans des vésicules de sécrétion et le complexe golgien, comme les granines (protéines localisées dans les grains de sécrétion et exprimées dans les tissus neuroendocrines dont les seins et les ovaires font partis) (46). Il existe aussi une forme membranaire de la protéine. Ceci signifie que la protéine BRCA1 pourrait avoir des fonctions autocrines/paracrines et devrait avoir un récepteur. Ces résultats sont actuellement discutés en raison d'un problème de spécificité des anticorps anti-BRCA1 utilisés pour ces démonstrations expérimentales. Des réactions croisées avec d'autres protéines, en particulier HER2 ou du type EGF ou de son récepteur, ont en effet été rapportées (51, 105),
- une répétition carboxy-terminale d'un motif appelé BRCT qui présente des similarités avec la protéine 53BP1 interagissant avec p53. Décrit initialement dans BRCA1, ce motif est présent dans un groupe de protéines potentiellement impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire (9). Un épissage alternatif de l'ARN messager de BRCA1 produit une protéine avec délétion de la séquence codée par l'exon 11, dont la localisation est cytoplasmique.

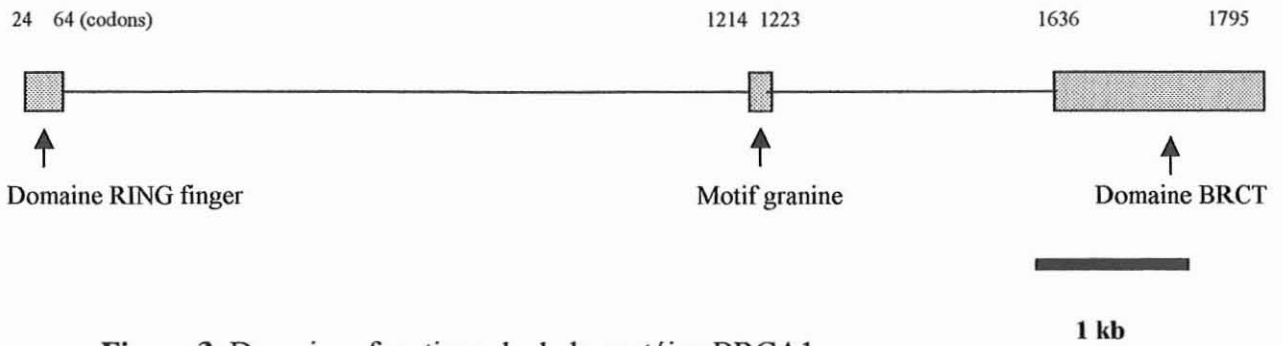


Figure 3. Domaines fonctionnels de la protéine BRCA1.

5.1.3. Les fonctions

Malgré les rares données dont on dispose sur BRCA1, on commence cependant à entrevoir certaines de ces actions.

L'invalidation chez la souris

L'invalidation du gène *Brca1* chez la souris produit des animaux hétérozygotes normaux, fertiles et sans susceptibilité au cancer. En revanche, lorsque les deux copies de *Brca1* sont inactivées (état nullizygote), l'embryogenèse est interrompue au jour 7,5 de gestation (37). Cet effet léthal avant la gastrulation est lié à l'échec de l'activité proliférative nécessaire au développement des différentes couches embryonnaires. L'arrêt de la réplication de l'ADN induit par l'activité du gène *p21* est à l'origine de cet effet antiprolifératif. Un phénotype très semblable, bien que moins sévère, a été observé chez les embryons *Brca2* $-/-$ qui survivent jusqu'au jour 8,5 de gestation. Les doubles nullizygotes *Brca1* $-/-$ *Brca2* $-/-$ présentent un phénotype identique à celui des simples nullizygotes. Ces phénotypes délétères démontrent clairement que *Brca1* et *Brca2* assurent des fonctions essentielles dans les processus de réplication de l'ADN au cours du développement. Leur interprétation doit cependant prendre en compte deux observations divergentes : la construction de souris portant une mutation homozygote de *Brca2*, probablement moins délétère, a permis d'obtenir des animaux adultes (12, 29); une femme nullizygote a eu une existence, et en particulier un développement normal, jusqu'au diagnostic de tumeur mammaire à l'âge de 32 ans. La mutation portée par cette femme, prédit la production d'une protéine tronquée de 900 résidus,

dont l'activité potentiellement suffisante pour le développement, pourrait être déficiente pour la susceptibilité au cancer du sein. Cependant, il n'est pas exclu que le modèle murin puisse ne refléter qu'imparfaitement la biologie de BRCA1 chez l'homme. A cet égard, on rappelle que l'identité entre les protéines BRCA1 humaine et Brca1 murine n'excède pas 50%, suggérant que leurs activités biologiques respectives puissent n'être pas totalement identiques.

Les mutations dans la pathogénie des cancers mammaires

Les mutations germinales augmentent le risque de cancer. Plus de deux cents mutations germinales du gène BRCA1 et plus d'une centaine de mutations du gène BRCA2 ont été décrites dans des familles présentant un excès de cancer du sein et /ou de l'ovaire, confirmant ainsi le rôle majeur de ces événements dans la susceptibilité à ces cancers. Bien qu'il n'y ait aucun doute sur la relation causale entre ces mutations et la prédisposition au cancer, l'hétérogénéité du spectre de tumeurs associées à la ségrégation de différents allèles mutés de BRCA1 ou BRCA2 dans les familles pose encore des questions relatives à la pénétrance et à l'hétérogénéité allélique. Pourquoi les femmes porteuses de mutations de BRCA1 développent-elles quasi exclusivement des cancers du sein et/ou de l'ovaire ? Pourquoi, dans une famille donnée, des femmes porteuses du même allèle muté développent un cancer du sein pour certaines, un cancer de l'ovaire pour d'autres ou même les deux cancers pour un troisième groupe ? Certains résultats suggèrent que la position des mutations dans les gènes BRCA1 ou BRCA2 déterminent les risques respectifs de cancer du sein ou de l'ovaire. Par ailleurs, il est vraisemblable que des effets génétiques modulateurs, peut-être sensibles à l'environnement individuel, puissent être à l'origine de ces variations phénotypiques.

Les mutations somatiques de BRCA1 ou de BRCA2 ont été recherchées dans les tumeurs sporadiques du sein et de l'ovaire. Des mutations (acquises) de BRCA1 ont été mises en évidence dans environ 10% des tumeurs ovariennes, alors qu'aucune mutation n'a été observée dans les tumeurs mammaires. La fréquence de mutation de BRCA2 dans les tumeurs mammaires ou ovariennes sporadiques est également très faible. Les mutations sporadiques de BRCA1 ou BRCA2 sont donc des événements exceptionnels dans les cancers sporadiques. Cela peut paraître surprenant si l'on considère qu'une fraction importante de tumeurs du sein,

sporadiques ou familiales, présente une délétion affectant les régions 17q21 ou 13q12-13, contenant respectivement les gènes BRCA1 et BRCA2. La perte simultanée de BRCA1 et de BRCA2 a même été observée dans des tumeurs mammaires sporadiques de grade 3. Par ailleurs, la transition des carcinomes mammaires, *in situ*, en carcinome invasif s'accompagne d'une diminution de 5 à 10 fois de la concentration d'ARNm de BRCA1. Ainsi, alors que l'existence de délétion et l'abaissement quantitatif de l'ARNm suggèrent que BRCA1 et BRCA2 jouent un rôle dans la pathogénie des tumeurs mammaires et ovariennes sporadiques, l'absence de mutations somatiques reste paradoxale vis à vis du modèle classique de Knudson. Il semble que le récent concept des gènes *Gatekeepers* et *Caretakers* éclaire d'une façon nouvelle ce problème.

Gènes suppresseurs de tumeur

L'étude des délétions géniques sur l'ADN tumoral de femmes porteuses d'une mutation germinale de BRCA1 ou BRCA2 indique que l'allèle perdu est systématiquement l'allèle qui était normal. Cette observation constitue un argument très fort en faveur d'une activité de type gène suppresseur de tumeur. Cet élément est conforté par un ensemble de résultats tels que :

- la transfection de fibroblastes murins par un vecteur codant un ARN antisens du gène BRCA1 conduit à la transformation de ces fibroblastes. Cette absence de synthèse protéique mime ainsi une mutation,
- le transfert du gène BRCA1 normal à l'aide d'un vecteur rétroviral a un effet inhibiteur sur la croissance d'une lignée de tumeur mammaire sporadique,
- l'activité antiproliférative de BRCA1 dans les cellules de mammifères (résultant de l'activation de p21),
- l'activité antiproliférative de BRCA1 chez la levure.

Implication de BRCA1 et BRCA2 dans la réponse aux lésions génotoxiques

Scully et coll. ont évoqué, pour la première fois, la possibilité que le gène BRCA1 pourrait faire partie d'une famille fonctionnelle de gènes récemment appelés *Caretakers* (48), capable d'informer la cellule sur l'existence de lésions dans son ADN et, éventuellement, de participer aux processus de réparation. Cette hypothèse repose sur deux observations. D'une part, la protéine BRCA1 est associée, dans les cellules somatiques et dans les cellules en méiose, à RAD51, homologue eucaryote de RecA qui est impliquée dans la reconnaissance (réparation) des cassures double-brin de l'ADN (78). D'autre part, la localisation et l'état de phosphorylation de la protéine BRCA1 sont modifiés par l'exposition des cellules à des agents génotoxiques (77).

La protéine BRCA1 est localisée dans le compartiment nucléaire. Sa distribution est ponctuée dans des corps nucléaires au cours de la phase S, puis diffuse dans la suite du cycle cellulaire. BRCA1 est associée, dans ces corps nucléaires, à plusieurs protéines, dont RAD51, ainsi que BARD1 dont l'interaction avec BRCA1 implique le doigt Ring. L'association de BRCA1 à ces corps nucléaires est perturbée par l'exposition à des agents provoquant des lésions de l'ADN. La protéine se relocalise alors dans des macrostructures de réplication dans lesquelles elle est associée à PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) (77). La signification fonctionnelle des corps nucléaires n'est pas élucidée. Ils pourraient représenter des sites dans lesquels BRCA1 participent activement au processus de réplication (reconnaissance des coupures de l'ADN, échanges de chromatides sœurs...). *A contrario*, ils pourraient représenter des sites de séquestration de BRCA1 dont l'activité serait indésirable avant la phase G2. Le déplacement de la protéine BRCA1 induit par les agents provoquant des lésions de l'ADN vers des sites de réparation pourrait être en faveur de la seconde hypothèse.

BRCA1 est également associée à RAD51 dans les régions axiales (hors des synapses) des complexes synaptonémaux au cours de la méiose mâle (78). Les événements de recombinaison se produisant dans les synapses, il est peu probable que BRCA1 soit directement impliqué dans le crossing over méiotique.

Ces observations démontrent l'existence d'une interaction fonctionnelle entre BRCA1 et RAD51 dans la mitose et la méiose et conduisent à l'hypothèse selon laquelle BRCA1 pourrait jouer un rôle dans la recombinaison, la réparation et donc le maintien de l'intégrité du génome. Il est intéressant de souligner que les souris nullizygotes pour RAD51 présentent un phénotype embryonnaire léthal très semblable à celui des souris nullizygotes pour les gènes *Brca1* ou *Brca2*.

Rôle de BRCA1 et BRCA2 dans la transcription

Les protéines BRCA1 et BRCA2 pourraient être des activateurs de la transcription (10, 64, 65). La protéine BRCA1 est un élément du complexe ARN polymérase II-holoenzyme (79), auquel il est lié via l'interaction entre son domaine BRCT et l'ARN hélicase I (1). De plus, BRCA1 est impliqué dans la réparation couplée à la transcription des lésions oxydatives de l'ADN (36). Le pouvoir antiprolifératif de BRCA1 *in vitro* pourrait être lié à sa capacité d'activer la transcription du gène *p21* (85). Enfin, la protéine BRCA1 serait un co-activateur de la protéine TP53, avec laquelle elle interagit physiquement (69, 109).

5.1.4. Les mutations de BRCA1

Plus de 200 mutations germinales distinctes, dispersées tout au long de la séquence codante, ont déjà été décrites (15, 18). Une banque de donnée internationale (*Breast cancer Information Core*), disponible sur Internet, répertorie l'ensemble des mutations constitutionnelles (30). Seules quelques-unes d'entre elles peuvent être considérées comme récurrentes avec un ancêtre commun, on parle alors d'effet fondateur (c'est le cas de la mutation de l'exon 2 : 185delAG retrouvée dans la population juive ashkénaze) (67, 75) ou fréquentes (c'est à dire de même type mais d'origine différente, telle que la mutation de l'exon 20 : 5382insC) (15).

Plus de 90% des mutations entraînent une protéine tronquée (décalage du cadre de lecture ou mutation non-sens). Pour les mutations faux sens, il est souvent difficile de faire la part entre un variant neutre sans conséquence phénotypique et une mutation délétère (18). En conséquence, ne sont retenues comme pathogènes que les mutations impliquant le domaine

Ring finger ; les autres sont considérées, jusqu'à preuve du contraire, comme des polymorphismes.

5.1.5. Corrélations génotype-phénotype

L'existence de différentes présentations (sein seul, sein/ovaire, ovaire seul) laissent augurer de possibles corrélations entre le génotype (type de mutation) et le phénotype (manifestations cliniques) (figure 4). Ainsi, il a été observé que les mutations siégeant avant l'exon 13 du gène BRCA1 étaient associées à une plus grande incidence des cancers de l'ovaire (34). Des analyses de transfection ont également montré que les mutations du gène BRCA1 entraînant une troncation de la protéine dans la région 5' étaient incapables d'inhiber la prolifération de lignées de cancers de l'ovaire, alors que l'allèle sauvage avait cette propriété (43). Cette région semble donc jouer un rôle protecteur, ou tout au moins limitant, dans le développement des cancers de l'ovaire.

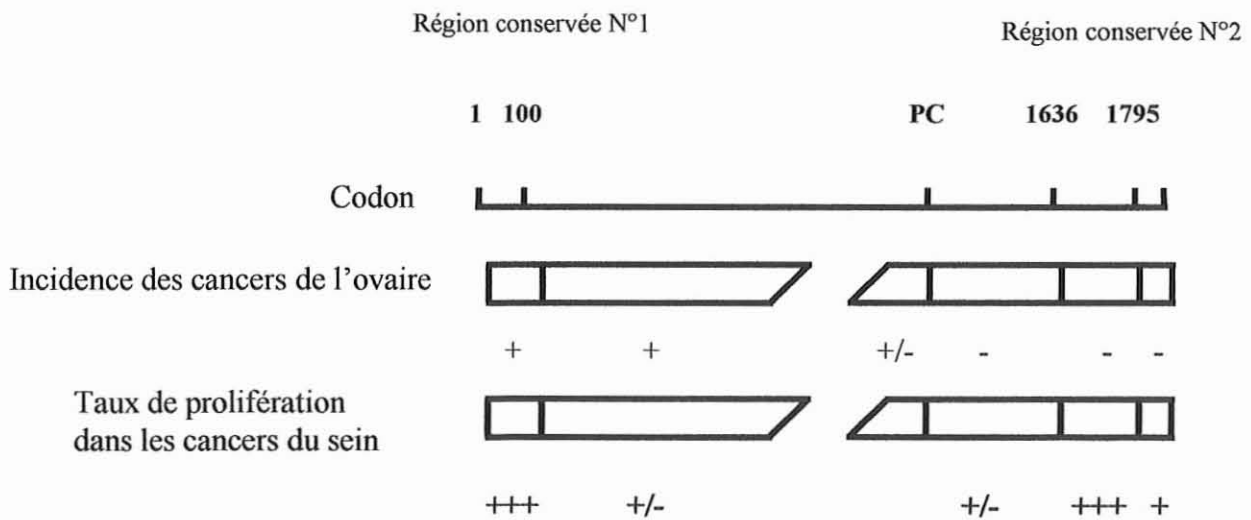


Figure 4. Corrélations phénotype-génotype dans les cancers du sein liés à BRCA1. Régions conservées entre l'homme et la souris du codon 1 à 100 et du codon 1636 et 1795. PC point de changement pour l'incidence des cancers du sein et de l'ovaire.

Il a également été retrouvé une corrélation entre le site des mutations germinales dans le gène BRCA1 et la prolifération des cancers du sein. Les mutations se produisant dans les

deux régions les plus conservées sont le plus souvent associées à des tumeurs hautement prolifératives (index mitotique 3). A l'inverse, on retrouve plus fréquemment des tumeurs faiblement prolifératives lorsque les mutations touchent les régions variables. Il a été confirmé expérimentalement que les deux régions de haute conservation situées aux extrémités de BRCA1 jouent un rôle dans le contrôle de la prolifération cellulaire. En plus de la région N-terminale abritant le domaine RING finger, il existe, en effet, une autre région fonctionnelle impliquée dans le contrôle de la prolifération à l'extrémité C-terminale de BRCA1.

Pour expliquer la plus faible prolifération associée à des mutations de la région variable et plus particulièrement de l'exon 11 de BRCA1, il avait été avancé qu'un épissage alternatif permettait de donner naissance à des protéines fonctionnelles de petite taille. Ainsi, dans les cellules mammaires présentant de telles mutations constitutionnelles, on serait en présence d'un mélange de protéines tronquées non fonctionnelles, de protéines fonctionnelles de petite taille et de protéines normales, le tout ayant pour résultat de freiner la prolifération. Un phénomène similaire a été retrouvé avec des modèles animaux : les souris invalidées pour Brca1. Lorsque l'inactivation a lieu dans le début du gène (domaine RING finger), le phénotype est plus sévère que lorsqu'elle a lieu dans l'exon 11.

5.2. BRCA2 (BREast CAncer 2)

5.2.1. Le gène

Les premières analyses de liaison génétique suggéraient déjà l'existence d'un deuxième gène majeur de prédisposition au cancer (84, 106). Le gène BRCA2, localisé sur le chromosome 13 en q12-13, a été isolé en 1995 (106). Il présente certaines similarités avec BRCA1 dont la taille, la structure et l'expression tissulaire. Il s'agit d'un très grand gène comprenant 26 exons codant dont 3 de grande taille (exons 10, 11 et 27) (90). Sa séquence codante est distribuée sur près de 70 kb d'ADN génomique et donne naissance à un transcrit de 10,4 kb. Il est exprimé dans les mêmes tissus que BRCA1.

5.2.2. La protéine

La protéine est constituée de 3418 acides aminés (90, 106). Des délétions impliquant le locus BRCA2 (analyse de perte d'hétérozygotie) ont été retrouvées à la fois dans les cancers du sein héréditaires et sporadiques, ce qui apporte des éléments en faveur de son rôle suppresseur de tumeur. Une séquence consensus de type granine a également été retrouvée dans la partie carboxy-terminale de la protéine, cependant comme pour BRCA1, le rôle de cette séquence est discuté. Il a également été décrit dans la partie centrale de la protéine un motif répété 8 fois dont la signification biologique n'a pas encore été déterminée et qui semble conservée phylogénétiquement (7).

5.2.3. Les mutations

Plus de 100 mutations réparties sur toute la séquence codante ont été décrites (14, 66, 90, 106). Les microdélétions semblent prédominer. Comme précédemment, il est difficile de faire la différence entre mutations faux sens à effet délétère et polymorphismes. De même, les mutations tronquantes de l'exon 27 n'emportent que la fin de la protéine et ne rendent pas compte de la pathologie de façon certaine (62). Certaines mutations fréquentes ou récurrentes ont été décrites comme pour BRCA1 et notamment une mutation dans la population juive ashkénaze (exon 11 : 6174delT) (66). Un effet fondateur a clairement été démontré en Islande où la majorité des familles présente la même mutation (exon 9 : 999del5).

6- Méthodes de détection des mutations inconnues

Aucune technique d'analyse en génétique moléculaire n'apparaît simple et fiable à 100%. Le choix de la méthode la plus appropriée pour détecter les mutations inconnues dépend de la sensibilité souhaitée, de l'appareillage disponible, de la possibilité de disposer d'ARNm, de la nature des mutations ainsi que de la taille et de la structure de la séquence codante. La diversité des mutations observées et la grande taille des deux gènes majeurs de prédisposition aux cancers du sein et de l'ovaire rendent laborieuse cette recherche.

La stratégie qui consiste en un séquençage direct de l'ADN, manuel ou à l'aide d'un séquenceur automatique, peut être utilisée pour chercher directement les mutations inconnues. Les mutations à l'état hétérozygote sont mieux détectées en séquençage manuel qu'en séquençage automatique. Le séquençage direct manuel, en utilisant une base modifiée au soufre 35, a été utilisé dans de nombreux travaux et a permis notamment de décrire un grand nombre de mutations dans le gène BRCA1 (81). Cependant, dans une perspective de diagnostic de routine, ni le séquençage direct manuel, ni le séquençage automatique, ne semble représenter la solution idéale pour le criblage de gènes complexes et de grande taille et ceci pour des raisons de temps et de coût. Les caractéristiques des différentes méthodes sont résumées dans le tableau 1.

Méthode	Taille du fragment (pb)	Sensibilité	Toxicité des réactifs	Localisation de la mutation	Difficulté de mise au point	Coût
Séquençage direct	500	99%	Non	Oui	+	+++
SSCP	200	70%	Oui	Non	++	+
HMA	300	90%	Non	Non	+	+
CSGE	500	90%	Non	Non	+	+
DGGE	500	95%	Formamide	Non	+++	++
PTT	2000	*	Non	Oui	+++	++
FAMA	1500	99%	Non	Oui	+++	++
DHPLC	500	99%	Non	Non	++	+++

Tableau 1. Caractéristiques des méthodes de détection des mutations.

* : Méthode permettant la mise en évidence des mutations interrompant le cadre de lecture.

Il est donc préférable d'utiliser une ou plusieurs méthodes de pré-criblage et d'établir ensuite, par séquençage ciblé, la nature précise du changement. Nous allons d'abord examiner les caractéristiques de ces méthodes et leurs limites. La contribution de chacune au diagnostic des mutations dans les gènes BRCA1 et BRCA2, ainsi que les stratégies pour un criblage optimal de ces gènes seront discutées à la fin du chapitre.

6.1. Détection de mutations dans des produits de PCR de petite taille, sans localisation précise

Ces différentes méthodes sont basées sur les propriétés physiques de l'ADN.

6.1.1. L'électrophorèse d'ADN simple brin (SSCP)

L'électrophorèse d'ADN simple brin ou SSCP (*Single-Strand Conformation Polymorphism*) (69) exploite le fait que la mobilité électrophorétique de molécules d'ADN simple brin dans un gel d'acrylamide non dénaturant varie selon sa séquence nucléotidique. Du fait de sa facilité de mise en œuvre, cette technique est certainement la plus utilisée, bien que son efficacité de détection ne dépasse guère 70%, de plus la SSCP est limitée à l'analyse de courts fragments d'ADN (<200pb). Les produits d'amplification par PCR d'ADN normaux et mutés sont dénaturés et analysés par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide non dénaturant contenant habituellement du glycérol. La visualisation des fragments d'ADN simple brin requiert généralement leur marquage radioactif mais une détection non radioactive par coloration argentique ou au bromure d'éthidium a également été utilisée avec succès.

6.1.2. L'électrophorèse d'ADN hétéroduplex (HMA et CSGE)

L'électrophorèse d'ADN hétéroduplex, dite HMA (*Heteroduplex Mobility Assay*) (103), permet de détecter les mutations à l'état hétérozygote (mais elle est aussi facilement adaptable à des situations homozygotes ou hémizygotés) de par la présence de mésappariements qui influencent la mobilité dans des conditions particulières d'électrophorèse des molécules double-brin. L'ADN hétéroduplex correspond à l'ADN double-brin obtenu après dénaturation et renaturation d'un mélange de fragments homologues d'ADN normal et mutant. A l'endroit d'une mutation, cet ADN hétéroduplex contiendra une ou plusieurs bases mésappariées. De bons résultats (sensibilité de 90%) ont été rapportés pour des fragments de 300 pb. Plusieurs variations de la méthode HMA ont été proposées. La méthode CSGE (*Conformation Sensitive Gel Electrophoresis*) (32) permet de détecter les mésappariements dans des fragments de plus grande taille (figure 5).



Produits d'amplification par PCR d'un fragment d'ADN du gène BRCA1



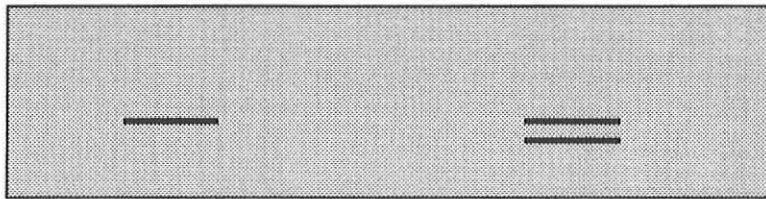
Dénaturation puis renaturation :
formation d'hétéroduplex



Homoduplex



Hétéroduplex :
présence de mésappariements



Technique
de CSGE

Homoduplex : migration
électrophorétique normale
(1 seule bande)

Homoduplex + Hétéroduplex : migration
électrophorétique anormale
(plusieurs bandes)



Séquençage du fragment variant:

- Polymorphisme neutre
- Mutation délétère

Figure 5. Stratégie de recherche de mutations par technique de CSGE puis séquençage.

6.1.3. La méthode DGGE

La méthode DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) (13, 26, 39, 67, 82) est certainement l'une des techniques les plus efficaces. L'électrophorèse est effectuée dans un gel de polyacrylamide contenant une concentration linéairement croissante d'agents dénaturants de l'ADN (urée et formamide). Le fragment analysé migre sous l'influence du champ électrique jusqu'au moment où il atteint la concentration critique d'agents dénaturants qui dissocie ses brins d'ADN au niveau de la région la moins stable, appelée domaine de fusion. La molécule d'ADN partiellement dénaturée présente une structure branchée qui interagit avec la réticulation du gel de polyacrylamide, ce qui ralentit considérablement la vitesse de migration. L'arrangement séquentiel des bases d'un domaine de fusion détermine le degré de stabilité local. Cette stabilité thermodynamique dépend du contenu relatif en bases AT ou GC, ainsi que des interactions linéaires entre bases adjacentes le long du même brin d'ADN. Le changement d'une seule base altère la température de fusion du domaine dans lequel il se trouve ce qui explique que deux fragments d'ADN différents par une seule base, au sein du domaine le moins stable, cessent leur migration électrophorétique à des positions différentes dans le gel. La technique ne peut s'appliquer à un fragment donné que s'il contient au moins deux domaines de stabilité différente. En outre, seules les séquences contenues dans le domaine le moins stable sont accessibles à l'analyse, celles situées dans le dernier domaine de fusion ne pouvant être explorées. Pour contourner ces difficultés, certains auteurs (82) ont proposé d'introduire à l'extrémité du segment d'ADN d'intérêt une séquence très riche en G + C, donc très résistante à la dénaturation, appelée *GC clamp*, qui permet de l'analyser de façon exhaustive. L'efficacité de ce système est remarquable mais son utilisation augmente de façon importante le coût des analyses. La méthode permet une détection efficace de mutations (sensibilité de 95%) pour des fragments de taille inférieure à 500 pb environ mais demande une adaptation, pouvant être assez longue, pour chaque nouvelle région. Lorsque les conditions sont bien établies, cette méthode est à la fois rapide et très efficace.

6.2. Méthodes permettant le criblage de fragments d'ADN de grande taille

6.2.1. Le test de protéine tronquée (PTT)

Le test de protéine tronquée (*Protein Truncation Test*) (42) est un test spécifique permettant de détecter les décalages du cadre de lecture, les mutations de site d'épissage ou les mutations non-sens qui sont responsables de l'apparition de codon stop prématuré (CSP) donc de produits protéiques tronqués. La technique consiste à fabriquer par RT-PCR un ADN complémentaire (ADNc), en utilisant une amorce spéciale qui porte à l'extrémité 5' un promoteur T7, suivi par une séquence eucaryote initiatrice de la traduction. L'ADNc est couplé à un système de transcription-traduction *in vitro*, qui utilise le promoteur T7 pour fabriquer un ARNm et l'initiateur de traduction le traduit. On fait migrer le produit de traduction sur un gel. La présence d'un codon stop prématuré au sein de l'ARNm entraîne la fabrication d'une protéine tronquée dans sa région carboxy-terminale. Le PTT ne détecte que certains types de mutations, en particulier, les mutations faux sens passent inaperçues. Lorsqu'il s'agit du type de mutations prédominant, cette caractéristique représente un inconvénient majeur. En revanche, pour certains gènes, comme celui de la dystrophine (myopathie de Duchenne), les gènes APC (polypose colique familiale) et BRCA, les mutations faux-sens sont rares et généralement non pathogènes. Dans ce cas, le PTT présente plusieurs avantages. Il ignore les substitutions de bases silencieuses non pathogènes ou les substitutions faux-sens et révèle la localisation approximative de toute mutation aboutissant à la création d'un CSP. Par exemple, l'exon 11 du gène BRCA1 peut être testé en utilisant de l'ADN génomique plutôt que par RT-PCR. Les fragments analysés sont de grande taille et l'ensemble de la séquence codante peut être étudié en seulement 6 étapes. Cette technique nécessite, en revanche, une mise au point souvent longue.

6.2.2. La méthode FAMA

La méthode FAMA (*Fluorescence Assisted Mismatch Analysis*) (99) se prête particulièrement bien à l'étude de mutations à l'état hétérozygote, mais elle est aussi

facilement adaptable à des situations homozygotes (98) ou hémizygotés (35) par mélange avec un ADN témoin normal. La région choisie, d'une taille comprise entre 500 et 1500 pb, est amplifiée par PCR à partir d'un échantillon d'ADN génomique ou d'ADN complémentaire (si la recherche est faite au niveau de l'ARNm). Dans une deuxième PCR, les fragments produits sont marqués à leurs extrémités avec des fluorophores spécifiques pour le brin sens et pour le brin antisens. On dénature et renature ces fragments d'ADN double-brin qui contiennent à la fois des produits d'amplification de l'allèle normal et de l'allèle mutant. Deux types d'ADN hétéroduplex sont alors formés, chacun représentant 25% des molécules. Le clivage des mésappariements est effectué en utilisant un protocole de clivage chimique simplifié. Les produits de réaction de clivage sont analysés à l'aide d'un séquenceur automatique, qui détecte quantitativement les ADN simple-brin marqués par différentes fluorescences et en détermine la taille (logiciel GENESCAN). Outre l'avantage d'utiliser des marquages fluorescents à la place de la radioactivité, cette méthode permet d'augmenter de façon importante l'efficacité de détection de mutation, car tous les produits de PCR sont marqués (brin sens et antisens de l'allèle normal et de l'allèle mutant). Le marquage de chaque brin d'ADN avec un fluorophore différent permet aussi de superposer les tracés de plusieurs pistes du même gel et de les comparer. Les mutations sont ainsi détectées, même en présence d'un excès important (environ 10 fois) de la séquence normale, ce qui peut être le cas lors d'un criblage au niveau de l'ARN ou lors de la recherche de mutations somatiques.

6.2.3. La méthode DHPLC

La méthode DHPLC (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography*) (100) permet la détection de mutations de fragments de 500 pb à partir d'ADN génomique avec une sensibilité proche de 100%. Cette technique rapide, basée sur le principe de chromatographie en phase liquide, est certainement la plus sensible disponible à ce jour mais le coût de l'appareil (entre 400 000 et 600 000 francs) la réserve à quelques laboratoires en France.

6.2.4. Les puces à ADN

Plusieurs groupes travaillent au développement de nouvelles méthodes automatisées de dépistage de mutations. Les plus prometteuses sont très certainement les puces à ADN (*DNA chips*) (27). Plusieurs milliers ou dizaines de milliers de sondes oligonucléotidiques sont fixées à un support de silicone ou de verre dont la surface n'excède pas quelques centimètres. Ces outils devraient permettre de détecter n'importe quelle mutation dans une séquence au cours d'une seule réaction.

En conclusion, la possibilité de cribler des fragments d'ADN de 1 kb ou plus est intéressante notamment dans les cas relativement fréquents de gènes qui, comme BRCA1 et BRCA2, contiennent un ou plusieurs exons de grande taille ou assez rapprochés pour être amplifiés en une seule PCR sur de l'ADN génomique. Par exemple, des études utilisant la méthode FAMA ont montré que 5 produits de PCR chevauchants permettent de cribler l'exon 11 de BRCA2 et 4 produits pour l'exon 11 de BRCA1 qui est plus court.

Les méthodes permettant une détection de mutations dans des produits de PCR de petite taille ont pour avantage d'être de mise au point rapide. En revanche, le taux de détection n'excède pas, en général, 80% et la méthode nécessite de réaliser un grand nombre d'amplifications et de gels pour chaque individu à tester.

7- Indications d'une recherche de mutation germinale

Bien que certaines caractéristiques commencent à se dégager, 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 antécédents rapportés durant la consultation. L'analyse initiale reposera donc essentiellement sur des informations d'ordre anamnésique. Un autre élément de confusion est l'existence d'une hétérogénéité génétique, plusieurs gènes peuvent être à l'origine des mêmes présentations cliniques. Ainsi, comme nous l'avons déjà évoqué pour les cancers du sein et de l'ovaire, deux gènes majeurs, BRCA1 et BRCA2, ont été isolés et un troisième, BRCA3, serait localisé sur le chromosome 8 (il pourrait en exister d'autres encore non identifiés) (45, 47, 80). Il faut signaler également qu'à côté de ces mutations à forte

pénétrance, on évoque la participation de mutations à pénétrance plus faible, voire de mutations qui confèreraient une certaine protection vis à vis du cancer du sein.

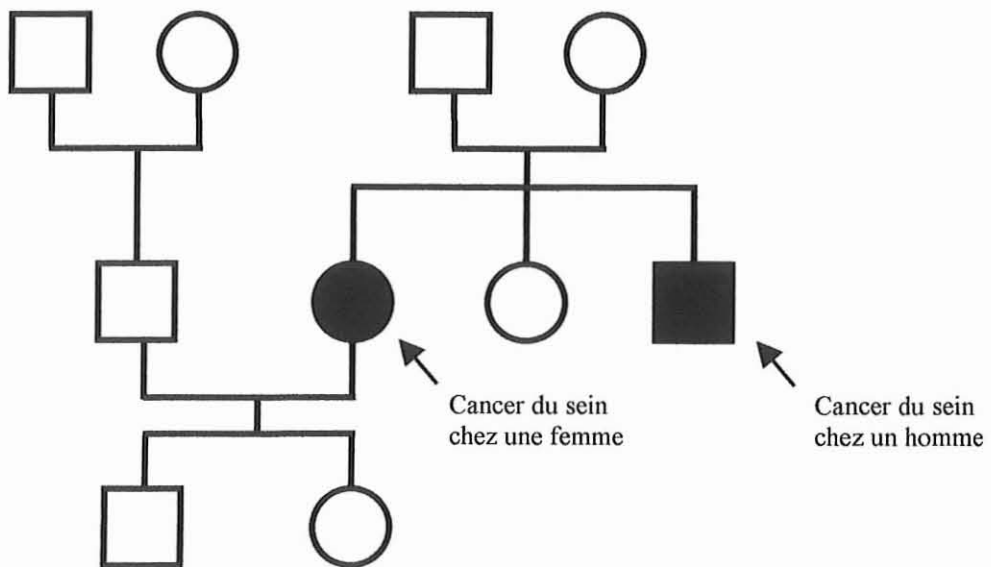
Des critères cliniques ont été retenus afin d'orienter les demandes d'analyses moléculaires aux familles pour lesquelles le risque que les cancers du sein ou de l'ovaire soient liés à BRCA1 ou BRCA2 est élevé (Expertise INSERM-FNCLCC, 1998) (22) :

Critère 1 : Présence d'au moins trois cas de cancers du sein ou de l'ovaire chez des sujets appartenant à la même branche parentale et unis entre eux par un lien de premier ou second degré.

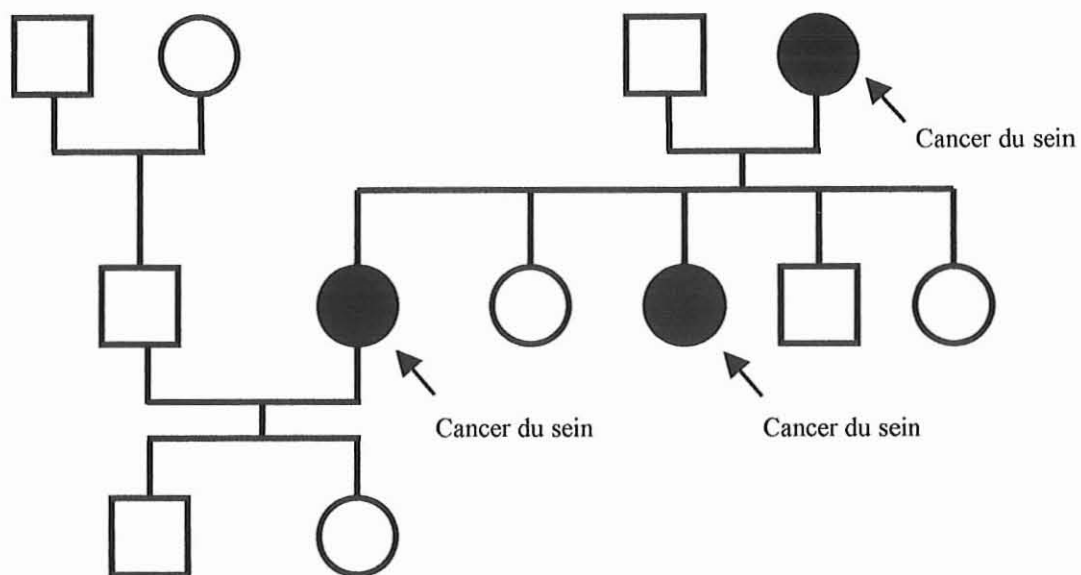
Critère 2 : Présence chez des sujets unis par un lien de premier degré d'au moins deux cas de cancers du sein dont l'âge au diagnostic dans un cas est au plus de 40 ans ou dont un cas est masculin. Présence chez des sujets unis par un lien de premier degré d'un cas de cancer du sein et d'un cas de cancer de l'ovaire, ou de deux cas de 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.

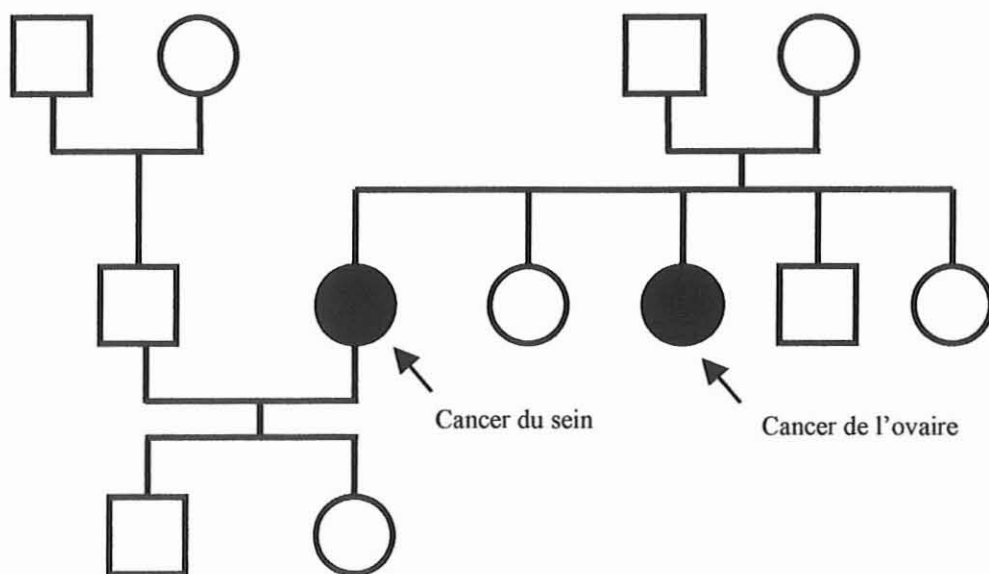
On recherchera également des éléments cliniques pouvant orienter vers un syndrome autre que les formes de cancers du sein seul ou sein/ovaire et notamment la maladie de Cowden et le syndrome de Li-Fraumeni.



Présence de deux cas de cancers du sein chez des sujets appartenant à la même branche parentale et unis entre eux par un lien de parenté de premier degré dont un cas est masculin.



Présence de trois cas de cancers du sein chez des sujets appartenant à la même branche parentale et unis entre eux par un lien de parenté de premier degré.



Présence d'un cas de cancer du sein et d'un cas de cancer de l'ovaire chez des sujets appartenant à la même branche parentale et unis entre eux par un lien de parenté de premier degré.

8- La consultation d'oncogénétique

8.1. Objectifs de la consultation d'oncogénétique

Elles ont pour objectifs de répondre au consultant s'interrogeant sur ses risques tumoraux et de l'informer des possibilités de prévention et de dépistage adapté. Les consultations d'oncogénétique orientées vers les prédispositions aux cancers du sein et de l'ovaire ont pris leur essor aux Etats-Unis et en Europe, au début des années 90 avec la localisation du gène BRCA1. En effet, cette avancée, perçue alors comme une étape décisive de la compréhension des formes héréditaires de cancer du sein, a suscité beaucoup d'espoirs dans les possibilités de prédiction et, à terme, de prise en charge des personnes à haut risque tumoral.

Avec l'identification des gènes BRCA1 et BRCA2 en 1994 et 1995, de réelles possibilités de prédiction des risques tumoraux sont apparues. Les connaissances sur les prédispositions génétiques aux cancers du sein et de l'ovaire sont encore récentes mais devraient s'étoffer. Elles concernent aussi bien les relations génotype-phénotype et l'identification de facteurs influençant la pénétrance et l'expressivité que l'optimisation de la prise en charge médicale des sujets prédisposés. Elles posent aussi la question de l'analyse du retentissement psychologique de l'annonce du résultat des tests, de l'évaluation de l'adhésion des sujets prédisposés à des recommandations de surveillance et de l'efficacité de celle-ci. Les consultations d'oncogénétique devraient faciliter la recherche clinique qui aura pour objectif de répondre à ces questions. L'interprétation non univoque d'une histoire familiale de cancers du sein (fortuite ou reflet d'une prédisposition sous-jacente) et la diversité des altérations génétiques responsables qui sont le plus souvent différentes d'une famille à l'autre, limitent à l'heure actuelle la réalisation des tests de prédisposition.

Ces tests de prédisposition sont à l'origine de deux situations différentes de consultation. La première est une consultation consacrée à l'analyse de l'histoire familiale et éventuellement à sa caractérisation moléculaire, elle correspond souvent à la démarche d'une femme ayant déjà développé un cancer du sein dans un contexte familial de cancers et venant

consulter non seulement pour elle mais surtout pour sa famille. La seconde correspond au test de prédisposition proprement dit chez un sujet indemne de cancer et venant consulter parce qu'une altération a été identifiée chez l'un de ses apparentés.

8.2. Indications d'une consultation d'oncogénétique

L'état de nos connaissances, encore limitées aux prédispositions génétiques majeures, et la lourdeur des investigations familiales et moléculaires, conduisent à poser des indications de consultation avec le souci de retenir les cas familiaux vraisemblablement d'origine génétique. Les indications retenues le plus couramment à l'heure actuelle sont celles conduisant à proposer une analyse moléculaire (voir plus haut). Néanmoins, une telle consultation ne peut être refusée à une personne à faible risque mais inquiète.

Lorsqu'elle est proposée, la consultation d'oncogénétique constitue un acte médical nécessitant impérativement au moins deux consultations spécialisées, une avant la réalisation du test et une au moment de la communication des résultats.

8.3. Problèmes posés par la consultation d'oncogénétique

Les consultations d'oncogénétique posent des problèmes particuliers. En effet, si plus de la moitié des consultants sont déjà atteints de cancer, d'autres sont des personnes indemnes de toute pathologie tumorale. Pour ces dernières, on est cependant parfois amené à confirmer une prédisposition et l'éventualité de la transmission d'une anomalie génétique à leurs descendants. Le recueil initial de l'information passe par la reconstitution de l'arbre généalogique (histoire familiale). Cette étape est à la fois délicate car elle fait intervenir des tiers à la consultation et douloureuse pour les consultantes car pratiquement toutes, même celles pour lesquelles le risque génétique ne sera pas retenu, ont une histoire familiale où coexistent plusieurs cancers. La prise en charge des personnes à risque va s'effectuer sur une longue période, souvent des dizaines d'années. Parmi les possibilités d'intervention, certaines comme la chirurgie prophylactique sont mutilantes et irréversibles. La consultation a un retentissement psychologique au niveau personnel, familial et des conséquences sociales.

Enfin, il existe pour les personnes ayant une mutation délétère, un risque considérable de survenue de pathologies graves, redoutées et encore fréquemment mortelles.

Pour ces raisons, il est important de rappeler l'importance du respect de certaines règles relatives aux interventions médicales.

Il faut que l'action envisagée pour la personne lui procure un bénéfice. Pour respecter cet objectif majeur, les médecins doivent affronter deux difficultés. La première est celle de la nature du bénéfice attendu chez une femme présentant une mutation germinale au sein d'un gène de prédisposition au cancer du sein et/ou de l'ovaire (espérance de vie, qualité de vie, dignité, conséquences psychologiques et sociales). Les femmes indemnes de mutations dans les familles informatives (mutations connues) peuvent être rassurées, en sachant que le risque chez ces personnes n'ayant pas hérité de la mutation familiale reste celui de la population générale du même âge. La seconde est celle des modalités de prise en charge. Les interventions proposées présentent toutes des inconvénients potentiels. Le bénéfice attendu est donc un rapport entre les risques et les avantages. La possibilité de sauver des vies ne peut cependant servir à elle seule à justifier tous les types d'intervention et elle doit être mise en balance avec les échecs, les insuffisances et leur acceptabilité.

Il faut examiner la réalité de la demande des personnes consultantes et leur laisser le libre choix des décisions.

9- Prise en charge

9.1. Cas des femmes n'ayant pas développé de cancer du sein ou de l'ovaire

Stratégie de dépistage du cancer du sein en dehors de l'imagerie

Un examen clinique devrait être pratiqué par un médecin 2 ou 3 fois par an dès l'âge de 20 ans (41). Un examen clinique des seins très attentif doit également être réalisé

systématiquement dès la première visite de grossesse, au cours des suivantes et en post-partum.

Stratégie de dépistage du cancer du sein par imagerie

Concernant la prescription de dépistage mammographique systématique, aucune donnée n'existe sur une éventuelle efficacité d'une telle stratégie pour les femmes ayant un risque génétique (97), cependant cette option paraît justifiée (malgré les hypothèses parfois avancées de risque de cancers radio-induits) (16) avec une préférence pour les règles suivantes :

Planification

- 1- Age de début 30 ans et éventuellement plus tôt selon l'histoire familiale (cas très précoce) ou individuelle (anomalie clinique)
- 2- Une mammographie pourrait être pratiquée avant une grossesse si cette dernière était prévue et dans les 6 mois du post-partum
- 3- Mammographie annuelle couplée à un examen clinique
- 4- Cette surveillance doit être poursuivie tant que le gain espéré n'est pas compromis par l'espérance de vie limitée des femmes suivies (pathologie ou vieillissement)

Organisation et techniques utilisées

- 1- Comparaison des clichés antérieurement réalisés
- 2- Deux incidences par sein : face et oblique externe (101)
- 3- Première lecture immédiate permettant de décider d'une incidence supplémentaire ou d'une échographie. L'échographie doit être systématique si la mammographie est jugée insuffisante ou chez une femme, qui n'a pas atteint l'âge du dépistage mammographique, pour évaluer une anomalie clinique
- 4- Deuxième lecture systématique (94)
- 5- L'IRM peut être utilisée seule et doit faire l'objet de protocoles évaluatifs (25)

- 6- Les examens doivent être pratiqués dans des centres ayant une expérience et une pratique suffisante des examens sénologiques et ayant adhéré à un centre assurant le contrôle de qualité
- 7- En cas d'anomalie douteuse (catégorie 3 à 5 de l'American College of Radiology) la décision d'effectuer une biopsie ou de surveiller doit être prise de manière collégiale

Indications

- 1- Les femmes ayant une anomalie constatée par des analyses de biologie moléculaire.
- 2- En ce qui concerne les femmes pour lesquelles il n'est pas possible d'obtenir cette information, il est utile de proposer une surveillance de cette nature à celles qui ont plus de 20% de risque de développer un cancer du sein. Il n'est pas justifié de la proposer aux femmes qui ont un risque tumoral inférieur à 10% (moins de 5% de risque d'avoir une anomalie génétique constitutionnelle). Ces dernières doivent se voir proposer les stratégies standard de prise en charge.

Procédure

Les femmes auxquelles cette stratégie est proposée doivent être informées que :

- 1- Malgré l'absence de certitude concernant son efficacité, cette procédure est jugée capable de réduire la mortalité due au cancer du sein
- 2- Le dépistage doit être régulier pour être efficace
- 3- Une anomalie clinique perçue même quelque temps après un examen de dépistage normal est une raison suffisante pour consulter un médecin qui jugera de l'opportunité de réaliser ou non à nouveau un examen d'imagerie
- 4- Certaines équipes craignent une augmentation des cancers radio-induits

Stratégie de chirurgie prophylactique pour le cancer du sein

Une chirurgie prophylactique pour le cancer du sein (mammectomie) peut être discutée et réalisée chez des femmes de plus de 30 ans mais elle n'est jamais préconisée. Il est rappelé qu'il s'agit d'une mutilation et que cette intervention n'est justifiée que si elle présente un intérêt thérapeutique. La détermination de ce dernier relève de l'appréciation du médecin et donc de sa responsabilité propre. La demande d'une patiente de procéder à une telle intervention est en soi insuffisante pour la légitimer. En revanche, les médecins doivent recueillir préalablement à l'intervention, le consentement de la femme.

Stratégie de chirurgie prophylactique pour le cancer de l'ovaire

Une chirurgie prophylactique pour le cancer de l'ovaire (ovariectomie) peut être proposée à partir de l'âge de 40 ans ou lorsqu'une femme a eu le nombre d'enfants qu'elle souhaitait. Lorsqu'il s'agit d'un contexte familial où il existe des cancers du sein et de l'ovaire ou de l'ovaire seul, l'ovariectomie prophylactique est alors recommandée à partir de 40 ans.

9.2. Cas des femmes ayant déjà été traitées pour un cancer du sein ou de l'ovaire

Une prise en charge médicale adaptée leur est proposée afin de prévenir une récurrence et/ou une nouvelle atteinte sur un autre site (sein controlatéral, ovaire).

La fréquence des examens de surveillance et les techniques d'imagerie mises en œuvre ne diffèrent pas de celles qui sont proposées à une femme à haut risque indemne de cancer. En ce qui concerne la prévention, telle qu'elle peut être actuellement proposée, les entretiens individuels avec les patientes montrent qu'une chirurgie prophylactique est plus acceptable pour une femme qui a déjà subi une chirurgie thérapeutique que pour une femme plus jeune qui n'a pas été traitée pour un cancer. L'ovariectomie, parce qu'elle ne touche pas à l'image du corps et qu'elle est proposée à un âge plus avancé, est relativement bien tolérée.

OBJECTIF DE L'ETUDE

Le risque cumulé sur la vie d'une femme d'un pays occidental de développer un cancer du sein est de 8 à 10% (26 000 nouveaux cas par an en France). Ce cancer est ainsi le plus fréquent de la femme et pose donc un problème de santé publique. 5 à 10% des cancers du sein sont liés à une mutation constitutionnelle d'un gène majeur de prédisposition et représentent les formes héréditaires. Si une femme est porteuse d'un gène de prédisposition muté, ce risque de développer un cancer passe à plus de 80% d'où l'importance de repérer ces femmes à très haut risque pour une prise en charge multidisciplinaire adaptée. Ainsi, les familles dans lesquelles ségrègent une prédisposition héréditaire au cancer du sein et/ou de l'ovaire et répondant aux critères cliniques définis par l'expertise collective INSERM-FNCLCC (1998) peuvent faire l'objet d'une recherche de mutation.

BRCA1 (BREast CAncer 1) et BRCA2 (BREast CAncer 2) sont les deux gènes le plus souvent retrouvés mutés dans ces formes héréditaires (80% des formes familiales de cancers du sein et/ou de l'ovaire). La diversité de mutations observées et la grande taille de ces deux gènes rendent laborieuse la recherche de la mutation germinale. Aucune technique d'analyse en génétique moléculaire n'apparaît simple et fiable à 100%. Ainsi, le séquençage direct se révèle particulièrement coûteux.

Notre approche consiste, en un premier temps, en un test de pré-criblage par technique de CSGE (*Conformation Sensitive Gel Electrophoresis*). Une migration électrophorétique anormale des hétéroduplex permet la mise en évidence de fragments variants. La mutation germinale est identifiée dans un second temps par séquençage de ce fragment. Lorsque celle-ci est retrouvée, sa recherche peut être ensuite étendue aux apparentés à risque de la famille. Les femmes dont le risque génétique a été identifié au niveau individuel par cette analyse font l'objet d'une prise en charge adaptée. Les femmes ne portant pas le risque génétique lié à BRCA1 et BRCA2 sont toutefois surveillées de la même manière qu'une femme de la population générale (figure 6).

Amplifications d'ADN génomique par PCR des 18 fragments sélectionnés du gène BRCA1 (sauf cancer du sein chez un homme, 1^{ère} intention BRCA2)

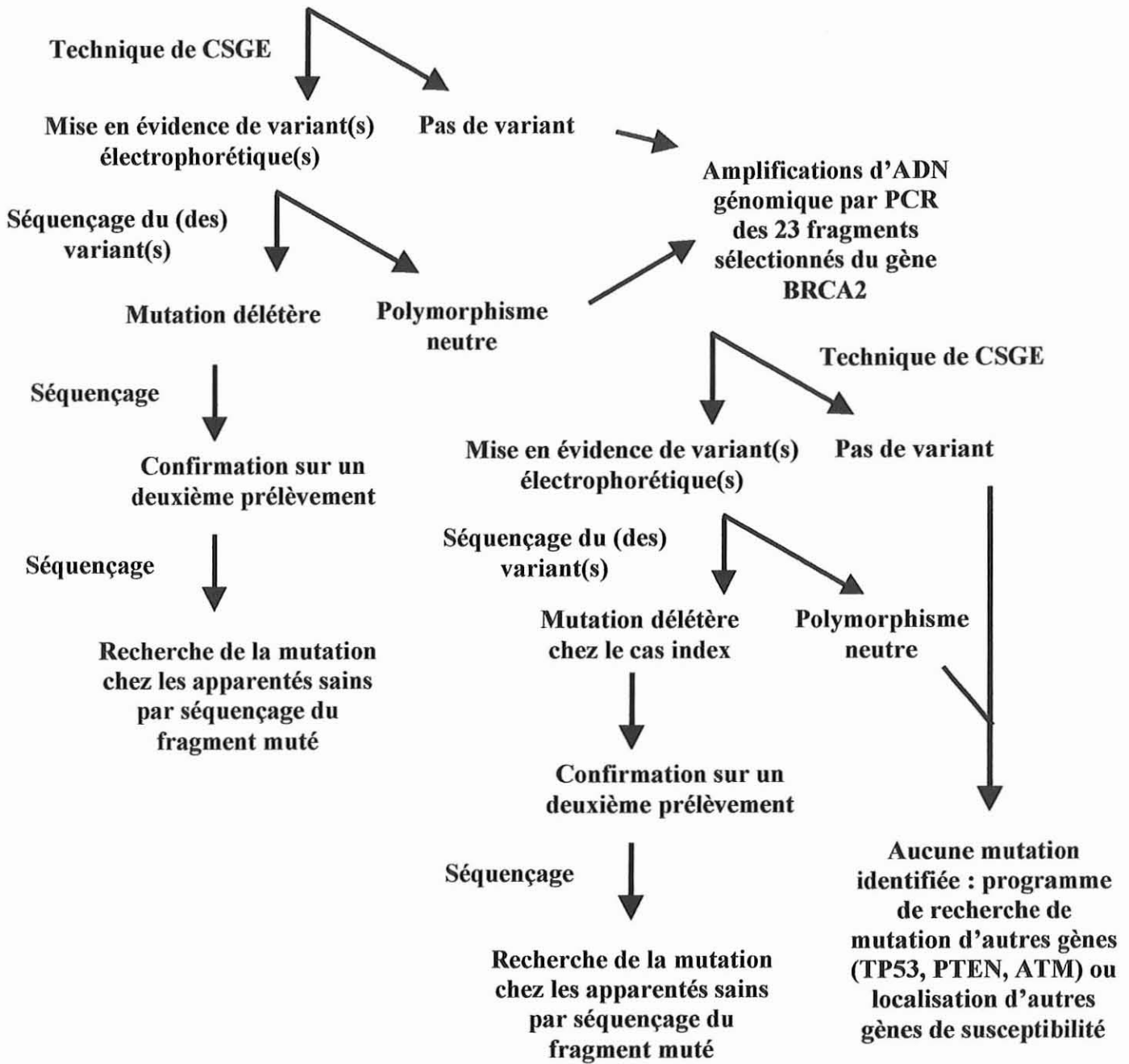


Figure 6. Stratégie d'identification de mutation germinale d'une famille répondant aux critères cliniques définis par l'expertise INSERM-FNCLCC

MATERIEL ET METHODES

1- Recueil des familles

46 familles ont été collectées en région lorraine grâce à la consultation d'oncogénétique du Dr Luporsi du Centre Alexis Vautrin. Toutes les familles testées répondent aux critères définis par l'expertise collective INSERM-FNCLCC (1998) justifiant la recherche d'une mutation germinale d'un gène de prédisposition au cancer du sein/ovaire. Un consentement libre et éclairé permettant la recherche d'une mutation germinale sur ADN génomique a été obtenu pour chaque personne prélevée.

2- Extraction et dosage de l'ADN génomique total

L'ADN génomique est extrait à partir de 14 ml de sang veineux périphérique prélevé sur tube EDTA (kit Nucleon BACC3, Amersham-Life technologies). Pour certains prélèvements, une étape préalable, qui n'est actuellement plus de mise au laboratoire, a été réalisée, consistant en une séparation des lymphocytes grâce à un gradient de Ficoll (le culot lymphocytaire est ensuite conservé à -80°C). Cette étape préalable conduit à une extraction d'ADN, cependant le rendement est nettement inférieur à celui obtenu directement sur sang total (facteur 10). Le dosage d'ADN se fait au fluorimètre. L'ADN génomique est dilué à la concentration finale de 20 ng/ μl .

3- Amplification *in vitro* d'ADN par PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Les amplifications par PCR sont réalisées grâce à l'enzyme Ampli Taq Gold à 5 UI/ μl (Perkin Elmer). Un mélange réactionnel de PCR comprend (volume final de 25 μl) :

dNTP 1.25 mM	4 μl	concentration finale 200 μM
Tp PCR 10X	2.5 μl	concentration finale 1X
MgCl ₂ 25 mM	1.5 μl	concentration finale 3 mM
Ampli Taq Gold	0.25 μl	2.5 UI
H ₂ O	13.25 μl	(QSP 21.5 μl)

Dans chaque tube 0.2 ml, on ajoute à 21.5 μ l du mélange réactionnel ci-dessus 1 μ l d'un mélange d'amorces sens et antisens (10 μ M) puis 2.5 μ l d'ADN génomique (20 ng/ μ l). Une quantité minimale d'ADN génomique (50 ng) est amplifiée dans un volume final réduit également au minimum (25 μ l/tube).

Dans un thermocycleur Perkin Elmer 9700, on réalise une dénaturation initiale à 95°C pendant 10 min, puis 40 cycles comprenant une dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, une hybridation spécifique des amorces pendant 30 secondes, respectivement à 55°C (BRCA1) ou à 50°C (BRCA2) suivie d'une élongation à 72°C pendant 30 secondes. Une élongation terminale est réalisée à 72°C pendant 10 min. La spécificité du produit de PCR est contrôlée sur gel d'agarose 2% (figure 7). L'intensité du produit de PCR (10 μ l de produit initial) comparée à celle du marqueur de taille XIV (Boehringer Mannheim) permet de réaliser un dosage semi-quantitatif. Ce dosage permet d'estimer le volume de produit à déposer au moment de la technique de CSGE, volume qui peut varier de 2.5 à 6 μ l. La conservation des produits de PCR se fait à 4°C jusqu'à leur utilisation.

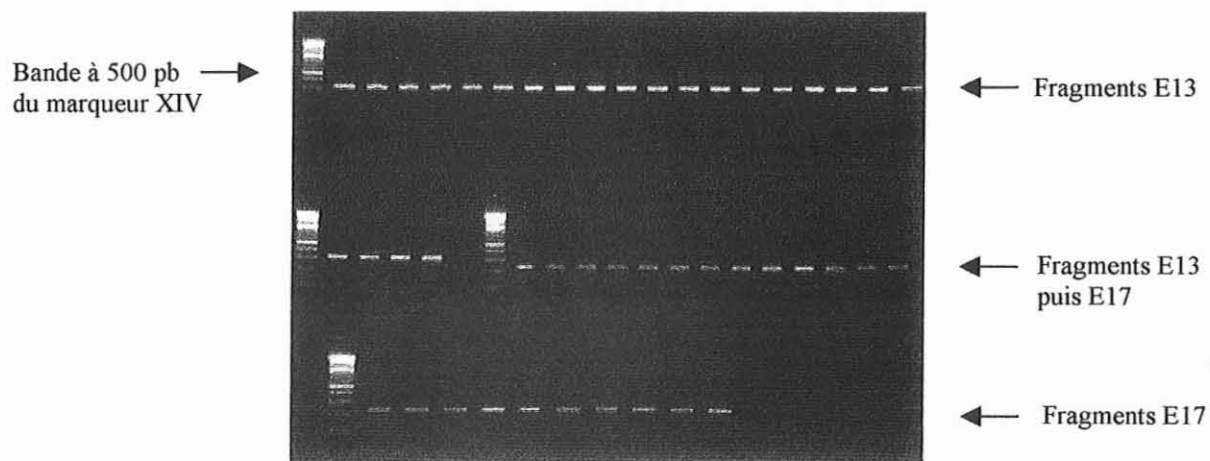


Figure 7. Produits d'amplification par PCR des fragments E13 et E17 du gène BRCA1 de 23 cas index contrôlés sur gel d'agarose 2%. La taille des fragments est estimée grâce à une échelle 100 pb (marqueur XIV de Roche Boehringer Mannheim).

Tous les couples ont été testés sur deux ADN témoins et les conditions optimisées de façon à ne consommer qu'une quantité minimale d'ADN de chaque patient à chaque réaction.

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce	Taille du produit d'amplification par PCR d'ADN génomique
BRCA1 2F BRCA1 2R	GAAGTTGTCATTTTATAAACCTTT TGTCCTTTCTCCCTAGTATGT	258 pb
BRCA1E11AF BRCA1E11AR	ATATAGCCAGTTGGTTGATTT ATTACAGAATTCAGCCTTTTC	351 pb
BRCA1E11BF BRCA1E11BR	ACAGCATGAGAACAGCAGTTT CTGGAAAACCACTCATTAAC	315 pb
BRCA1E11CF BRCA1E11CR	GTCCTTGGATAAACTAAAT TCAGTTACATGGCTTAAGTTG	329 pb
BRCA1E11DF BRCA1E11DR	TTGGGAAAACCTATCGGAAGA CGAGTGATTCTATTGGGTTAG	342 pb
BRCA1E11E2F BRCA1E11E2R	TCAGGGAACCTAACCAAACGGA CCATGTTGTAGGTTTCTTGCTG	410 pb
BRCA1E11FF BRCA1E11FR	TTGATAGTTGTTCTAGCAGTGA AACCTTTCTCCACTTAACAT	350 pb
BRCA1E11GF BRCA1E11GR	AATGCTGAAGACCCCAAAGA TATGCTTGTTTCCCGACTGT	309 pb
BRCA1E11HF BRCA1E11HR	ACACAGAAGGCTTTAAGTATC GCATTATCAACTGGCTTATCT	352 pb
BRCA1E11IF BRCA1E11IR	CAAGGAAAGAATGAGTCTAAT TGCTCACTGTAAGTGGAAATGT	346 pb
BRCA1E11JF BRCA1E11JR	AAAGAGAAATGGGAAATGAG TTCAGGATGCTTACAATTACTTC	290 pb
BRCA1E11KF BRCA1E11KR	CCTGAGGTCTATAAACAAAGTCT GGGTGAAAGGGCTAGGACTC	326 pb
BRCA1E11LF BRCA1E11LR	TTAGCAAAAAGCGTCCAGAAAAG TGTTTCTCCTACTAAGGTGATGT	338 pb

BRCA1E11MF	TATTGGCAAAGGCATCTCAG	346 pb
BRCA1E11MR	TCCCCAAAAGCATAAACATT	
BRCA1 13F	AATGGAAAGCTTCTCAAAGTA	320 pb
BRCA1 13R	ATGTTGGAGCTAGGTCCTTAC	
BRCA1 17F	GTGTAGAACGTGCAGGATTG	263 pb
BRCA1 17R	TCGCCTCATGTGGTTTAA	
BRCA1E18-1F	CAGCCTCTGATTCTGTAC	322 pb
BRCA1E18-1R	AGCATCAGCAAAAACCTTAG	
BRCA1 20F3	GCTCCACTCCATTGAAGGAAG	231 pb
BRCA1 20R2	AGCGGCCCATCTCTGCAAAG	

Tableau 2. Nom, séquence et taille des amorces utilisées pour les amplifications d'ADN génomique par PCR du gène BRCA1.

4- Technique de CSGE

4.1. Préparation du gel

Le gel d'une épaisseur de 0,8 mm contient 10% de polyacrylamide :bis (acryoyl) pipérazine (99 :1), 15% de formamide, 10% d'éthylène glycol préparé grâce à un tampon tolérant le glycérol (89 mM Tris, 7mM Taurine et 0,1mM EDTA). La plaque de verre libre est dégraissée à l'alcool tandis que la plaque de verre faisant partie du réservoir de tampon (système d'électrophorèse vertical BioRad) est passée au Sigmacote (Sigma). Cette solution grasse permet au gel de ne pas adhérer à la plaque au moment du démoulage. Des espaceurs de 0.8 mm d'épaisseur sont placés sur les côtés entre les deux plaques. Après une heure, lorsque le gel est polymérisé, le système est placé verticalement dans une cuve contenant 1 litre de tampon TTE 1X tandis qu'un autre litre de tampon TTE 0.25X est déposé en haut de la cuve. Le gel est préchauffé 1 heure à 500 volts. Deux types de cuves sont utilisés selon les fragments à analyser. L'une permet le dépôt simultané de 48 échantillons grâce à un peigne 48 puits. L'autre plus étroite ne permet le dépôt simultané que de 24 échantillons. En revanche, cette seconde cuve, plus haute, a pour avantage d'autoriser l'analyse de fragments de plus petite taille dont la migration est plus rapide.

4.2. Préparation des échantillons

Pendant le préchauffage du gel, les produits de PCR sont dénaturés à 98°C pendant 5 min puis incubés à 68°C pendant une heure, autorisant ainsi la formation des hétéroduplex. 2 µl de tampon de charge (30% glycérol, 0.25% M/V xylène cyanol et 0.25% M/V de bleu de bromophénol) sont ajoutés au produit de PCR (2.5 à 6 µl selon l'intensité de signal obtenue lors du contrôle sur gel d'agarose 2%) puis déposés sur le gel d'acrylamide. Pour chaque gel, trois dépôts successifs à 10 min d'intervalle de 23 ou 46 produits de PCR, selon la cuve utilisée, peuvent être effectués. La migration électrophorétique se fait sur la nuit, à 400 volts, pendant 14 ou 15 heures selon les fragments pour la cuve 48 puits et à 500 volts pendant 20 heures pour la cuve 24 puits. Après migration, les deux plaques sont séparées de façon à ce que le gel reste collé à la plaque dégraissée à l'alcool. Le gel est ensuite coloré au bromure d'éthidium (1 µg/ml) pendant 10 min puis rincé à l'eau milliQ. La localisation approximative des bandes est réalisée dans un premier temps grâce à une lampe à ultra violets en chambre noire (muni de gants et d'un masque de protection oculaire). Une bande de gel d'une dizaine de centimètres contenant les fragments est découpée. Le transfert du gel sur la plaque UV se fait grâce à une bande de papier Whatman 3M mouillé à l'eau de largeur légèrement supérieure à celle du gel. La visualisation définitive est réalisée grâce à un analyseur de gel BioRad. La finesse du gel est telle qu'elle n'autorise pas le transfert de toute la longueur d'un gel 48 puits. Le transfert se fait donc en deux fois après division du gel en son milieu. Le gel est finalement photographié et analysé. En l'absence d'ADN hétéroduplex, une bande unique est mise en évidence correspondant au seul ADN homoduplex formé. En revanche, lorsqu'il existe une variation de la séquence nucléotidique du fragment à analyser, plusieurs bandes sont visibles, l'une correspondant à l'ADN homoduplex, l'autre à l'ADN hétéroduplex. La migration est dite anormale (présence d'un variant ou « shift ») (figures 8, 9 et 10). Cette migration anormale ne nous renseigne pas sur le caractère délétère ou non de la variation nucléotidique. Pour ce faire, le fragment est séquencé.

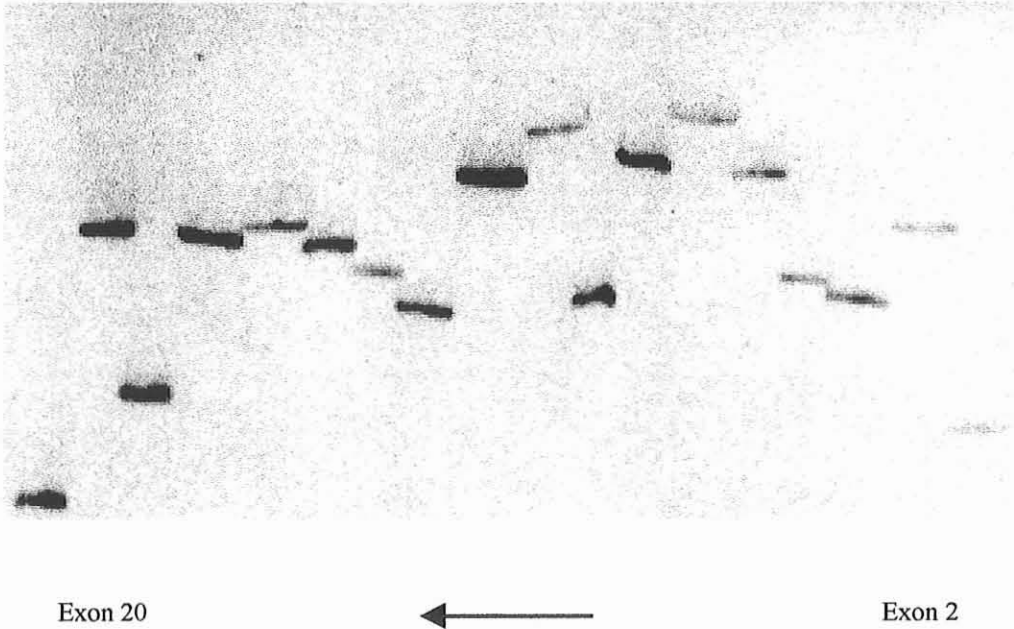


Figure 8. Analyse du profil de migration électrophorétique par technique de CSGE des 18 fragments sélectionnés après amplification par PCR.

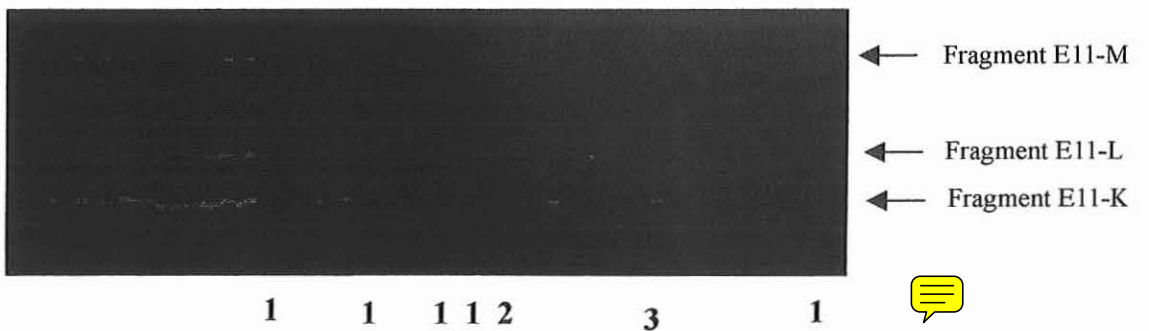


Figure 9. Analyse par CSGE de 3 fragments de l'exon 11 du gène BRCA1 de 23 cas index. 1, 2 et 3 : 3 profils de migration anormale de 7 cas index.

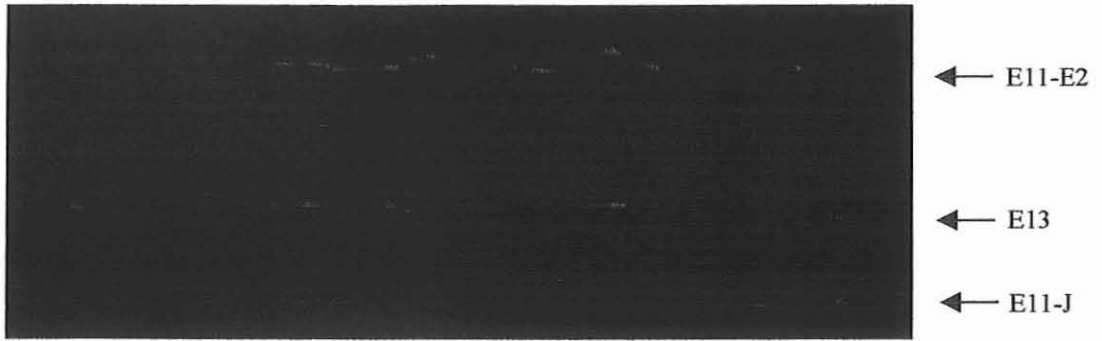


Figure 10. Analyse par CSGE de 3 fragments du gène BRCA1 de 23 cas index. Les fragments E13 et E11-J présentent une migration anormale pour 11 cas index.

5- Séquençage

Le fragment est à nouveau amplifié grâce au même couple d'amorces dans un volume de 50 μ l. Le produit d'amplification est contrôlé sur gel d'agarose 2%, purifié sur colonne échangeuse d'ions (QIAquick gel extraction kit, Quiagen) afin d'éliminer l'excès d'amorces et de sels, le produit de PCR ainsi purifié est repris dans 30 μ l de tampon TE 10:1 (Tris :EDTA). Un dosage semi-quantitatif sur gel d'agarose 1% du produit de PCR purifié permet d'estimer le volume nécessaire à la réaction de séquence. Ce dosage se fait par comparaison de l'intensité de signal de 8 μ l de produit de PCR purifié à 500 ng et 1 μ g de marqueur de taille XIV. 30 ng de produit de PCR purifié sont nécessaires à cette réaction. Une seule amorce par réaction est donc utilisée de façon à ne synthétiser le brin d'ADN que dans un seul sens. Les amorces utilisées sont les mêmes que précédemment mais à une concentration plus faible (3.2 pmoles).

Mélange de PCR de séquence :

Big Dye	4 μ l
Tp 5X	5 μ l
Produit de PCR purifié	30 ng
Amorce (3.2 μ M)	1 μ l

Il est souvent nécessaire de compléter à 20 μ l par de l'eau milliQ le volume du produit de PCR purifié. La réaction se fait à 96°C pendant 10 min puis à 50°C pendant 5 sec et à 60°C pendant 4 min. Les trois étapes sont répétées 20 fois. Une purification sur billes grâce au principe de gel filtration (DyeEx Spin kit, Quiagen) permet d'éliminer l'excès de ddNTP marqués par des fluorophores. Les produits de séquence marqués sont ensuite séchés à 60°C dans une atmosphère dépressurisé (Speed Vac) puis le culot sec est repris dans 25 μ l de TSR (Template Suppression Reagent, ABI PRISM). Les séquences sont analysées grâce à un séquenceur d'ADN microcapillaire PE ABI 310 puis interprétées visuellement par comparaison avec la séquence d'un fragment contrôle (présentant une migration normale par CSGE).

RESULTATS

1- Recueil des familles

65 familles collectées en région lorraine grâce à la consultation d'oncogénétique du Dr Luporsi répondant aux critères définis par l'expertise collective INSERM-FNCLCC ont été retenues parmi 200 étudiées. La présence d'une mutation germinale de BRCA1 a été recherchée pour 46 d'entre elles.

2- Mise au point des PCR

Nous avons choisi, grâce aux données de la littérature et aux contacts pris auprès d'équipes françaises ayant l'expérience des recherches de mutations germinales de BRCA1, 18 couples d'amorces parmi 35 permettant l'amplification d'autant de fragments d'ADN du gène BRCA1. Les fragments amplifiés ont une taille qui varie de 231 pb à 410 pb. Les conditions d'amplification ont été testées puis optimisées, pour chacun d'eux, sur deux ADN témoins. Il a été nécessaire de changer la séquence de certains couples d'amorces lorsque le produit d'amplification n'était pas parfaitement spécifique. Les conditions d'amplification sont les mêmes quel que soit le fragment. L'avantage est majeur, ainsi, grâce au thermocycleur PE 9700, 4 fragments différents de 23 patients (96 réactions) peuvent être amplifiés simultanément. L'utilisation de barrettes colorées de 8 tubes facilite les différentes étapes de PCR, minimise les coûts et surtout diminue les risques d'erreurs. A chaque fragment est attribuée une couleur différente, soit 3 barrettes de même couleur par fragment pour tester 23 patients, le dernier puits correspondant au blanc de PCR. Pour chaque PCR, 4 mélanges seulement sont préparés, chacun d'eux avec un couple d'amorces différent puis répartis dans les 96 tubes. L'ensemble des 18 fragments testés pour BRCA1 de 23 cas index peut donc être passé en 5 fois ($96 \times 5 = 480$ tubes). A l'avenir, l'utilisation d'une pipette distributrice permettra un gain de temps et un confort de travail non négligeable. Lorsque l'ADN de 8 patients est réparti dans les 8 tubes d'une barrette, celle-ci est facilement décalée minimisant les risques d'erreur de distribution. Le grand nombre de réactions (18 pour BRCA1 et 23 pour BRCA2) ajouté à la faible quantité d'ADN disponible pour certains patients nécessite de réduire au maximum la quantité d'ADN par réaction. Le volume est ainsi réduit à 25 μ l et la quantité d'ADN à 50 ng par réaction. Le dépôt de 10 μ l de produit de PCR sur gel d'agarose

2% permet non seulement de contrôler la spécificité du produit mais également, comparé à l'intensité de signal donné par le dépôt de 500 ng de marqueur de taille XIV, d'estimer le volume de produit à déposer au moment de la technique de CSGE. Ainsi, lorsque l'intensité de signal du produit de PCR est du même ordre que la bande à 500 pb du marqueur, il est recommandé de déposer 3 μ l du produit de PCR en CSGE tandis que lorsque le signal est plus intense que la bande à 500 pb, 2.5 μ l suffisent. En revanche, lorsque le signal est moins intense, il est souhaitable de déposer jusqu'à 6 μ l de produit de PCR.

3- Recherche de variants par CSGE

Deux cuves d'électrophorèse aux caractéristiques différentes sont utilisables au laboratoire. L'une est large et permet de déposer jusqu'à 46 échantillons simultanément. L'autre est étroite et permet le dépôt de 23 échantillons simultanément, cependant cette cuve présente l'avantage d'être plus haute et d'analyser des fragments de petite taille. Avec les deux cuves, il est possible de faire 3 dépôts successifs à 10 min d'intervalle, temps minimum nécessaire à la pénétration du produit de PCR dans le gel. La cuve large permet donc de tester jusqu'à 138 échantillons par gel tandis que la cuve étroite permet d'en tester jusqu'à 69. Chaque fragment migre à une vitesse propre qui dépend de sa conformation tridimensionnelle dans le gel (fonction, elle-même, de sa taille et de sa séquence). Cette vitesse de migration est difficile à connaître *a priori*. Nous avons donc déposé simultanément un échantillon de chaque fragment sur un même gel afin de déterminer les différentes vitesses de migration. Trois fragments migrant à des vitesses différentes peuvent ainsi être déposés successivement dans un même puits à seulement 10 min d'intervalle. La cuve étroite nous permet de tester 3 fragments de petite taille difficilement analysable grâce à la cuve large. A raison de 6 fragments de 23 patients par gel pour la cuve large et de 3 fragments de 23 patients pour la cuve étroite, 4 gels (3 avec la grande cuve et 1 avec la petite) suffisent pour analyser les 18 fragments de BRCA1 combinés judicieusement par 3 (tableau 3).

Les variants, correspondant aux fragments dont la migration est anormale, sont identifiés après coloration au bromure d'éthidium et visualisation sous ultra violets grâce à un analyseur de gel BioRad. 157 variants dans 12 fragments différents ont été identifiés. 21

patients sur les 46 étudiés présentent de façon tout à fait inattendue 6 à 7 fragments variants (E11F, E11G, E11H, E11J, E13, E17 et E18).

Cuve large, migration à 400 volts, 14 heures au maximum

E11-F	E11-I	3 ^{ème} dépôt
E11-M	E11-L	2 ^{ème} dépôt
E11-K	E2	1 ^{er} dépôt

Cuve large, migration à 400 volts, 15 heures au maximum

E11-H	E11-E2	3 ^{ème} dépôt
E11-C	E13	2 ^{ème} dépôt
E11-G	E11-J	1 ^{er} dépôt

E11-A		3 ^{ème} dépôt
E11-D		2 ^{ème} dépôt
E11-B		1 ^{er} dépôt

Cuve haute, migration à 500 volts, 20 heures au maximum

E18		3 ^{ème} dépôt
E17		2 ^{ème} dépôt
E20		1 ^{er} dépôt

Tableau 3. Combinaison de produits d'amplification des fragments du gène BRCA1 pouvant migrer simultanément par technique de CSGE. Pour chaque fragment, 23 produits correspondant à autant de cas index sont déposés.

4- Séquençage

Lorsqu'un variant est identifié, une nouvelle PCR est réalisée dans 50 µl. L'étape de séquençage nécessite, en effet, un minimum de 30 ng d'ADN après purification du produit de PCR. Les fragments sont séquencés indépendamment grâce à l'amorce sens puis grâce à l'amorce antisens. 14 mutations délétères sont identifiées. Toutes consistent en une délétion d'au moins 2 bases sauf une correspondant en une insertion d'une adénine. Elles conduisent toutes à l'apparition d'un codon stop prématuré.

Mutations délétères

L'ensemble des mutations délétères identifiées est répertorié figure 11.

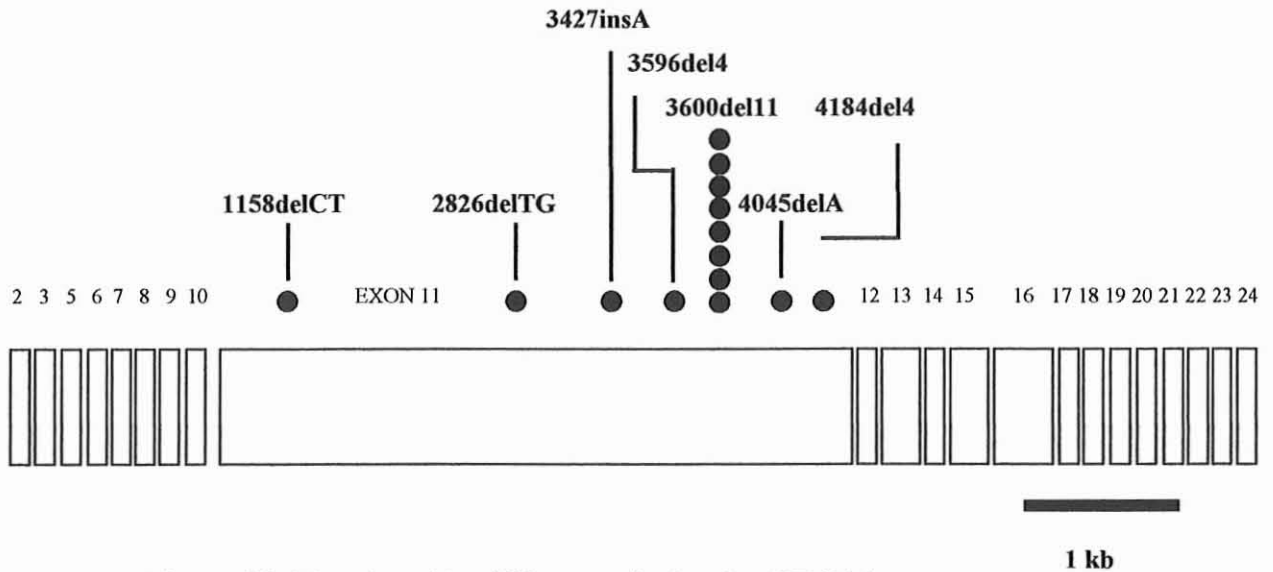


Figure 11. Mutations identifiées au sein du gène BRCA1

La localisation au sein des produits d'amplification est la suivante :

Fragment E11K (10 mutations)

- 1 délétion 3596del4
- 1 insertion 3427insA (figure 12)
- 8 délétions 3600del11 (figure 13)

Fragment E11M (2 mutations)

- 1 délétion 4045delA
- 1 délétion 4184del4

Fragment E11B (1 mutation)

- 1 délétion 1158delCT

Fragment E11H (1 mutation)

- 1 délétion 2826delTG

Polymorphismes

Un exemple de double polymorphisme est présenté figure 14.

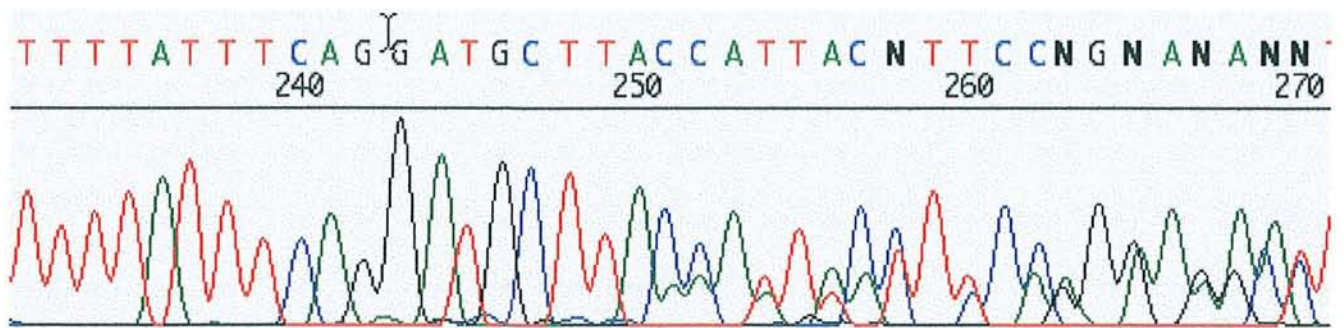
Les différents polymorphismes observés sont les suivants (tableau 4) :

Exon 11 : 955 T->G, 1186 A->G, 2196 G->A, 2201 C->T, 2430 T->C, 2731 C->T, 3232 A->G, 3238 A->G

Exon 13 : 4427 C->T

Exon 17 : 57946 A->G, 57970 A->G

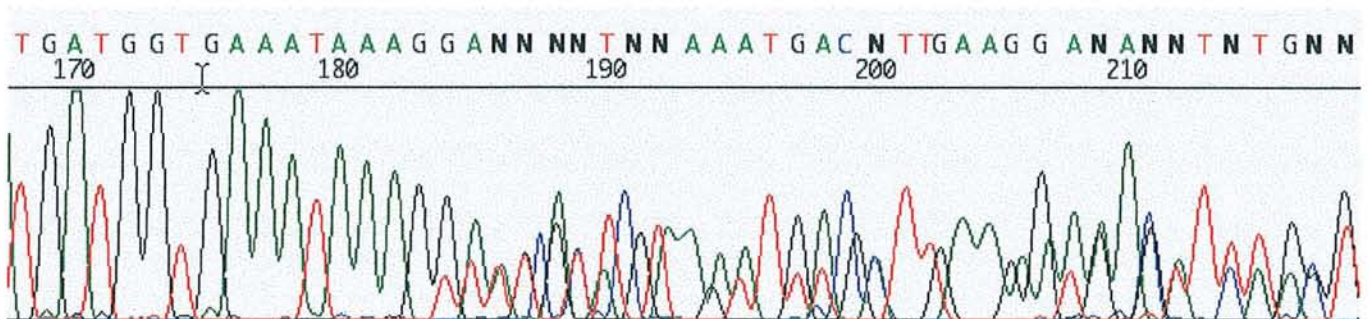
Exon 18 : 61729 C->T



CAATTACTTCCA
 ACAATTACTTCC

Décalage du cadre de lecture par insertion d'une adénine

Figure 12. Analyse de séquence d'un fragment de l'exon 11 du gène BRCA1 d'un cas index présentant une mutation par insertion d'une adénine en position 3427.



Décalage du cadre de lecture

Figure 13. Analyse de séquence d'un fragment de l'exon 11 du gène BRCA1 d'un cas index présentant une mutation par délétion de 11 bases en position 3600. Dans cette étude, cette mutation est observée 8 fois.

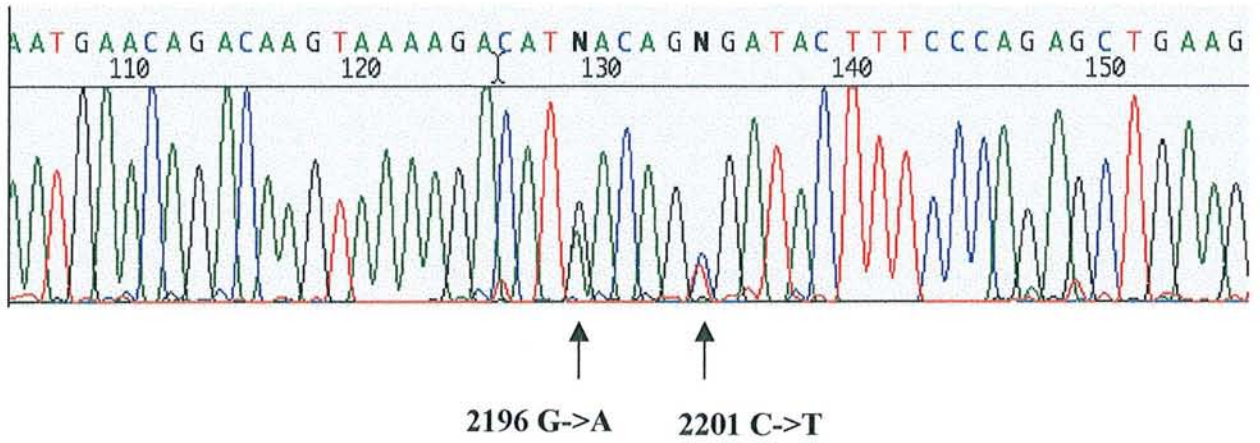


Figure 14. Double polymorphisme neutre en position 2196 et 2201 de l'exon 11 du gène BRCA1.

DISCUSSION

1- Choix de la stratégie

Le choix de la méthode la plus appropriée pour détecter les mutations inconnues dépend de l'équipement, du coût, des habitudes du laboratoire ainsi que des marges d'insuccès que l'on accepte de tolérer. De nombreux gènes impliqués dans des pathologies génétiques sont constitués, comme BRCA1 ou BRCA2, d'une séquence codante de très grande taille. L'absence de points chauds de mutations complique d'autant la recherche de mutations germinales qui est laborieuse et coûteuse quelle que soit la technique employée. Aucune d'entre elles n'est fiable à 100%. Ainsi, le séquençage systématique ne semble pas représenter la solution idéale pour le criblage de gènes complexes et de grande taille, et ceci pour des raisons de temps et de coût.

Nous avons choisi d'adopter une stratégie en deux temps. Le premier temps consiste en une étape de pré-criblage par technique de CSGE reconnue pour une efficacité de dépistage de 80%. Elle permet rapidement et à moindre coût d'identifier les fragments présentant une variation nucléotidique sans que l'on puisse dire à ce stade si cette variation traduit une mutation délétère ou, au contraire, si elle n'a aucune conséquence fonctionnelle sur la protéine (polymorphisme neutre). Cette information est obtenue à la seconde étape par séquençage de ce fragment.

2- Choix des exons à tester

Plusieurs protocoles de recherche de mutations germinales dans le gène de prédisposition au cancer du sein BRCA1 sont disponibles en consultant la littérature. Nous avons également pris contact auprès d'équipes françaises ayant l'expérience de ces recherches. Quel que soit le protocole, la grande taille du gène BRCA1 et la technique de CSGE, qui impose d'étudier des fragments dont la taille n'excède pas 500 pb, nous obligent à découper le gène en un grand nombre de fragments. Notre choix s'est porté sur un protocole dont la mise au point a été réalisée par une équipe française (Dr Bressac, Institut Gustave Roussy). L'étude complète du gène nécessite de découper la séquence codante en 35 fragments dont 13 pour l'exon 11 (60% de la séquence codante). Nous avons consulté la littérature, les données fournies par le Breast cancer Information Core (BIC) recensant l'ensemble des mutations décrites ainsi que les données françaises (Groupe Génétique et

Cancer). Plus de 200 mutations différentes ont été décrites, dispersées tout le long de la séquence codante. Bien qu'il n'existe pas de véritable point chaud de mutation, certaines ont été décrites plusieurs fois (mutation récurrente ou fréquente). On estime que 10 mutations différentes rendent compte de 50% des formes liées à BRCA1. A l'inverse, certains exons ne sont qu'exceptionnellement mutés voire jamais. En choisissant 18 fragments parmi les 35, nous estimons détecter 80 à 90% de l'ensemble des mutations. L'ensemble de l'exon 11 est étudié, découpé en 13 fragments, ainsi que les exons 2 (où siège fréquemment la mutation 185delAG principalement dans la population juive ashkénaze), 13 (mutation Arg1443ter), 17 (mutation 5149del4), 18 (mutation 5249ter) et enfin l'exon 20 (mutation 5382insC). Dans notre étude, aucune mutation n'a été identifiée en dehors de l'exon 11. Afin d'être certain que ces mutations sont bien détectables par technique de CSGE, il sera important de tester chacune d'elle grâce à l'ADN de sujets mutés (témoins positifs).

3- Etape de pré-criblage, choix de la technique de CSGE

Notre choix s'est porté sur une technique d'analyse d'ADN hétéroduplex, technique de CSGE (*Conformation Sensitive Gel Electrophoresis*). Elle permet de détecter les mutations par la présence de mésappariements qui influencent la mobilité dans des conditions particulières d'électrophorèse des molécules double-brin obtenues après dénaturation et renaturation d'un mélange de fragments homologues d'ADN normal et mutant. A l'endroit d'une mutation, cet ADN hétéroduplex contiendra une ou plusieurs bases mésappariées. La méthode de CSGE repose sur le même principe que la méthode HMA (*Heteroduplex Mobility Assay*). Des améliorations ont cependant été apportées. Des fragments de plus grande taille peuvent être étudiés (jusqu'à 500 pb au lieu des 300 à 400 habituels). Cette technique est rapide de mise en œuvre d'autant plus que nous en avons l'expérience au laboratoire, peu coûteuse et non radioactive. Sa sensibilité est bonne, de l'ordre de 80%, et permet la détection de mutations faux sens.

4- Identification de mutations délétères

Quatorze mutations (13 délétions et 1 insertion) conduisant à un arrêt prématuré de la synthèse protéique ont été identifiées parmi les 46 familles étudiées. Ces mutations donnent

naissance à des protéines non fonctionnelles, tronquées ou absentes par destruction d'un ARNm contenant un CSP. Elles sont considérées comme délétères. Le taux de détection de mutation délétère obtenu est supérieur à 30% (14/46). Ce résultat concorde avec les données de la littérature puisque, selon les équipes, il varie entre 20 et 35% pour BRCA1. Au moins 3 paramètres expliquent ce bon résultat :

- la sélection des familles selon les stricts critères définis par l'expertise collective INSERM-FNCLCC
- la bonne sensibilité de la technique de CSGE (de l'ordre de 80%)
- le choix des 18 fragments sur 35 permettant d'identifier 80 à 90% des mutations

Il faut cependant tenir compte du fait que le gène BRCA1 rend compte d'environ 50% seulement des cancers du sein héréditaires et que la stratégie adoptée est une recherche non exhaustive des mutations qui tient compte des coûts dépendant essentiellement du personnel, des consommables et du matériel disponible.

Dans notre étude, toutes les mutations siègent dans l'exon 11 dont 10 dans un seul fragment (E11K). Dix d'entre elles sont connues tandis que quatre autres sont nouvelles.

Fragment E11K : 10 mutations

8 délétions 3600del11

1 délétion 3596del4

1 insertion 3427insA (non décrite)

Fragment E11M : 2 mutations

1 délétion 4045delA (non décrite)

1 délétion 4184del4

Fragment E11B : 1 mutation

1 délétion 1158delCT (non décrite)

Fragment E11H : 1 mutation

1 délétion 2826delTG (non décrite)

Délétion 3600del11

La mutation 3600del11 est une des mutations françaises les plus fréquentes puisqu'elle est retrouvée dans 9% des familles testées (Groupe Génétique et Cancer). Nous retrouvons cette délétion dans 17% des cas de notre série (8/46). Cette délétion retrouvée deux fois plus fréquemment dans notre série de familles lorraines, pourrait traduire un éventuel effet fondateur. Il serait intéressant de vérifier cette hypothèse en cherchant un haplotype commun au voisinage du gène BRCA1 chez ces différentes personnes. Cette mutation préférentielle, représentant plus de la moitié des mutations détectées, 8/14 (57%) conduit à améliorer la stratégie de détection. La recherche des mutations doit naturellement commencer par ce fragment. L'analyse par CSGE permettra l'identification des variants et le séquençage la mise en évidence de la mutation. Une approche encore plus rapide par PCR suivie d'une digestion enzymatique par l'enzyme de restriction *MaeI* peut également être proposée. Le fragment normal présente deux sites de restriction, le premier dans la région de 11 paires de bases, perdu en cas de délétion, le second hors de cette région. Chez un sujet normal, l'enzyme de restriction coupe le fragment initial en trois nouveaux fragments (2 sites de restriction) de longueurs différentes (217, 95 et 14 pb). En présence de la délétion 3600del11, un des deux sites disparaît. Ce fragment initial n'est plus coupé qu'en deux fragments de tailles différentes (301 et 14 pb). Un mélange de fragments normaux et anormaux (chez un cas porteur de la mutation, celle-ci est présente à l'état hétérozygote) donnera naissance à 4 fragments de longueurs différentes (301, 217, 95 et 14 pb). La présence du fragment de 217 pb permet la mise en évidence de la mutation. En cas de profil anormal, le séquençage du fragment permet la confirmation formelle de la mutation (figure 15).

Il faut, en revanche, noter que nous n'avons pas identifié les autres mutations retrouvées fréquemment dans la population française, en particulier, la mutation 5382insC dans l'exon 20 retrouvé, en France, dans 11.3% des cas. Afin d'éliminer un éventuel problème de sensibilité de la technique de CSGE, il serait important de confirmer que nous mettons effectivement bien en évidence une migration anormale sur gel à partir d'ADN d'un patient présentant cette mutation.

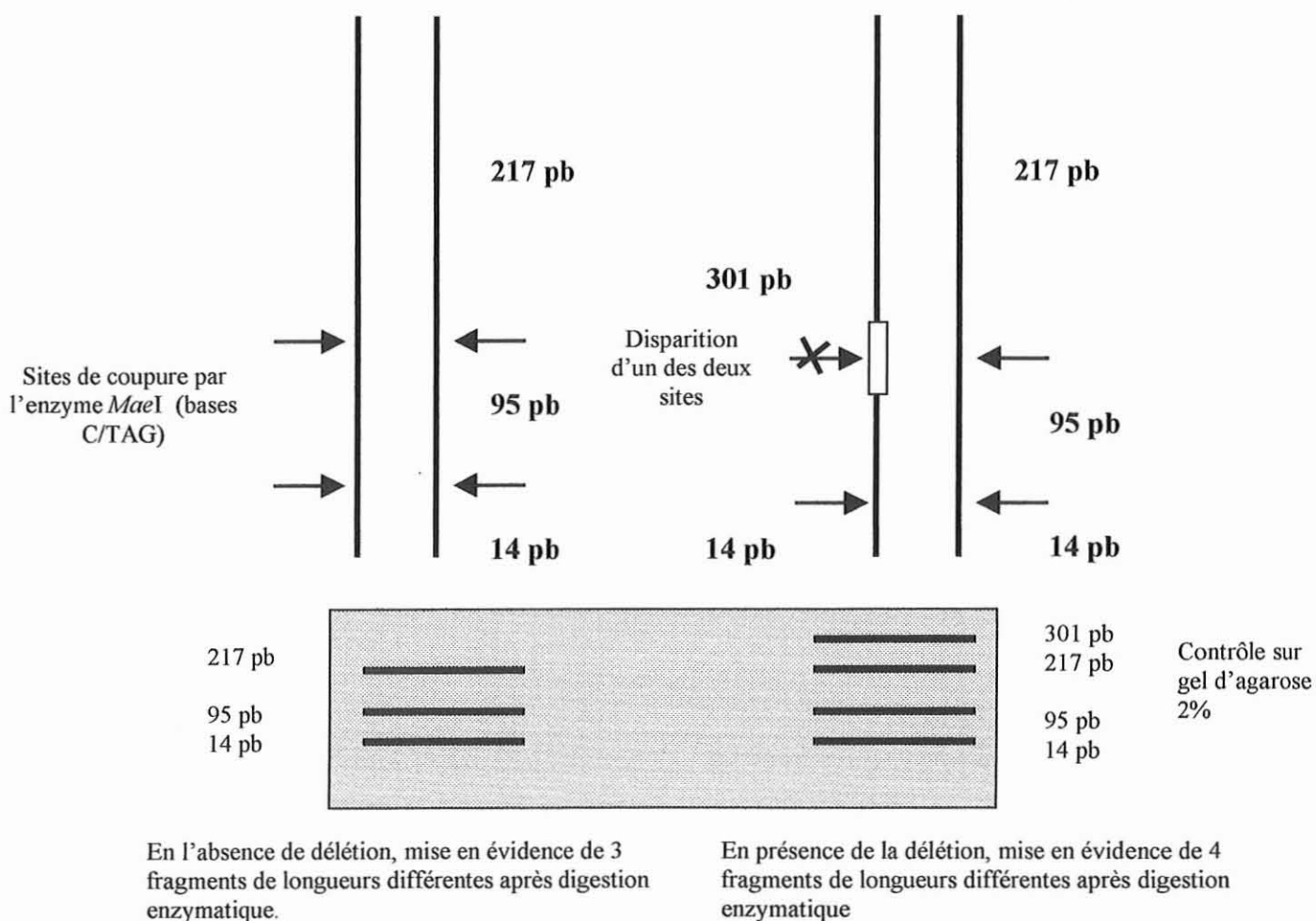
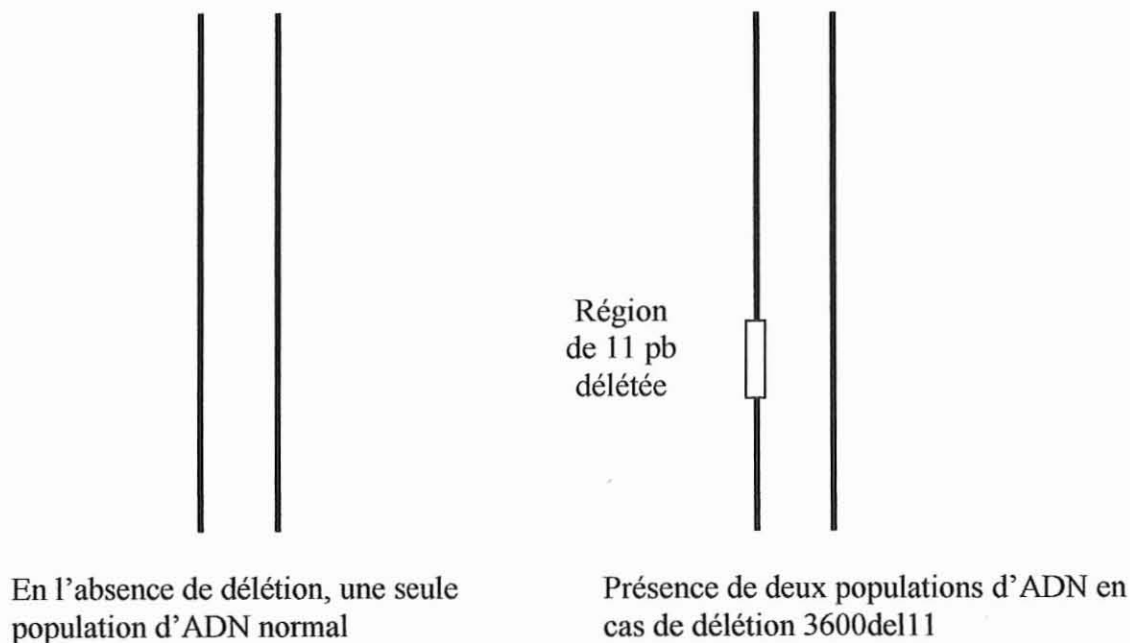


Figure 15. Mise en évidence de la mutation 3600del11 par PCR suivie d'une digestion enzymatique par l'enzyme de restriction *MaeI*.

Caractéristiques des familles présentant une mutation délétère

Les mutations siégeant avant l'exon 13 de BRCA1 sont, en général, associées à une plus grande incidence de cancers de l'ovaire. Toutes les mutations que nous avons identifiées sont situées avant cet exon. Après une première étude des dossiers des familles au sein desquelles ségrègent une mutation, aucune corrélation génotype-phénotype évidente ne nous est apparue confirmant la difficulté d'établir ces corrélations ainsi que la nécessité de grandes séries. Les caractéristiques précises des familles liées à la mutation 3600del11 seront également à évaluer.

De la même manière, les cancers du sein liés à BRCA1 sont des tumeurs volontiers précoces (le risque tumoral à 50 ans est de l'ordre de 50% en moyenne), bilatérales (dans plus de 50% des cas), de grade histopronostique 3, hautement prolifératives (index mitotique 3), indifférenciées et rarement associés à une composante intracanaulaire (CIS). Paradoxalement malgré ces éléments, il semble que le pronostic de ces cancers ne soit pas plus défavorable en termes d'espérance de vie. Il sera important de confronter ces données à celles de notre série de familles pour lesquelles une mutation est identifiée.

5- Identification de polymorphismes

Parmi 157 variants identifiés par la technique de CSGE, le séquençage a permis de montrer que 14 correspondent à une mutation délétère et 143 à des polymorphismes rencontrés chez 26 patients différents. Parmi ces 26 patients, 5 ne présentent qu'un seul polymorphisme. En revanche, de façon étonnante, 21 patients présentent un profil polymorphe très proche. On identifie, en effet, 6 à 7 polymorphismes identiques chez chacun d'eux. L'ensemble des polymorphismes est recensé dans le tableau 4. Ces données concordent avec celles de la littérature malgré le peu d'informations disponibles. Au moins deux raisons expliquent cette absence d'information. La première est due au fait que lorsqu'une mutation délétère est mise en évidence, l'étude chez ce patient s'arrête. La seconde tient à l'évolution des techniques. La tendance est aux méthodes qui mettent en évidence une protéine tronquée. Par conséquent, les variants polymorphes ne sont pas détectés.

Ce profil polymorphe s'apparente à un haplotype commun présent chez presque une personne sur deux (21/46) dans notre population de femme présentant des cancers du sein

familiaux. Il serait intéressant de rechercher s'il existe un lien entre cet haplotype et la présence d'un risque lié à une mutation germinale de BRCA1. Notre étude rapporte 8 patients avec délétion parmi les 21 présentant le profil polymorphe (39%) tandis que parmi les 25 autres patients ne présentant pas ce profil, seulement 6 sont délétés (24%). Bien entendu, notre série est trop petite pour tirer une information statistiquement significative. Cependant, la proportion de patients mutés appartenant à ce profil polymorphe est supérieure à la proportion de patients ne présentant pas ce profil particulier. La connaissance du profil polymorphe dans la population lorraine témoin permettrait de mieux approcher ces résultats préliminaires.

Au-delà de ces interrogations, la sensibilité de la technique est confirmée par la mise en évidence de ces différents polymorphismes qui sont l'équivalent, d'un point de vue comportement électrophorétique, à des mutations faux sens. On peut noter, en revanche, que la détection des mutations faux sens représente un inconvénient de la méthode puisqu'elle oblige à séquencer un grand nombre de fragments correspondant à des mutations faux sens souvent non délétères. Cet inconvénient est contourné par les techniques telle que la PTT, qui n'identifie que les mutations tronquantes, représentant la très grande majorité des mutations délétères du gène BRCA1.

Patient	E11A	E11B	E11F	E11G	E11H	E11J	E13	E17	E18
	955 T->G (+)	1186 A->G (+)	2196 G->A (+) 2201 C->T (o)	2430 T->C (+)	2731 C->T (+)	3232 A->G (+) 3238 A->G (o)	4427 C->T (+)	57946 A->G (+) 57970 A->G (o)	61729 C->T (+)
1			(+) (o)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)(o)	(+)
2			(o)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)(o)	
3	(+)		(+) (o)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)(o)	
4			(o)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)(o)	
5			(+) (o)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)(o)	(+)
6			(+) (o)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)(o)	(+)
7			(o)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)(o)	
8		(+)	(o)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)(o)	
9			(o)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)(o)	
10			(o)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)(o)	
11			(o)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)(o)	
12			(o)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)(o)	
13			(o)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)(o)	
14			(o)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)(o)	
15			(o)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)(o)	
16			(o)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)(o)	
17			(o)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)(o)	
18		(+)	(+) (o)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)(o)	
19			(o)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)(o)	
20			(o)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)(o)	
21			(+) (o)	(+)	(+)	(+)(o)	(+)	(+)(o)	
22		(+)							
23		(+)							
24		(+)							
25		(+)							
26		(+)							

Tableau 4. Récapitulatif de l'ensemble des polymorphismes identifiés.

CONCLUSION

Nous avons recherché la présence d'une mutation germinale au sein du gène BRCA1 pour 46 cas index de 46 familles répondant aux critères cliniques définis par l'expertise collective INSERM-FNCLCC (1998). Une stratégie en deux temps a été retenue. La première étape consiste en un test de pré-criblage par technique de CSGE (*Conformation Sensitive Gel Electrophoresis*). Une migration électrophorétique anormale des hétéroduplex permet la mise en évidence de fragments variants. La mutation germinale est identifiée dans un second temps par séquençage de ce fragment. Une des limites de notre approche est de ne tester qu'une partie de la séquence codante du gène BRCA1. Les mutations siégeant dans les exons non testés ou dans des régions non codantes (pouvant affecter la stabilité de l'ARN ou de la protéine) ne sont pas détectées. Il est probable que l'évolution des techniques, en particulier la technologie des puces à ADN, rendra prochainement possible une détection rapide des mutations germinales.

Notre étude a permis la mise en évidence de 143 polymorphismes. Il est important de préciser leur implication dans la pathogénie de ces cancers. Pour chacun d'eux, trois approches sont envisageables : une étude familiale, l'analyse de la fréquence allélique du variant dans la population générale et des analyses fonctionnelles.

14 mutations délétères donnant naissance à une protéine non fonctionnelle ont été identifiées. Pour ces 14 familles, la recherche peut être ensuite étendue aux apparentés à risque par simple séquençage du fragment portant la mutation.

Les femmes dont le risque génétique a été identifié au niveau individuel par cette analyse ont un risque de développer un cancer du sein de plus de 80% à 80 ans. Une prise en charge adaptée est proposée à ces femmes. Dans certaines situations, une mammectomie et une ovariectomie prophylactiques sont discutées. Cet aspect de la prise en charge reste insatisfaisant et on peut espérer que de nouvelles formes de chimiothérapie préventive le rendront rapidement obsolète.

Les femmes ne portant pas le risque génétique lié à BRCA1 ne présentent pas d'augmentation de risque par le fait d'être apparentée à une personne prédisposée. Elles présentent toutefois le risque de toute femme de la population générale du même âge de développer un cancer du sein ou de l'ovaire et sont donc surveillées de la même manière. Elles peuvent également être rassurées quant à l'absence de risque pour leur descendance.

BIBLIOGRAPHIE

1. Anderson SF, Schlegel BP, Nakajima T, Wolpin ES, Parvin JD. BRCA1 protein is linked to the RNA polymerase II holoenzyme complex via RNA helicase A. *Nat Genet.* 1998;19: 254-256.
2. Angele S, Hall J. The ATM gene and breast cancer: is it really a risk factor?. *Mutat Res* 2000 Apr 1;462(2-3):167-178.
3. Arason A, Barkardottir RB, Egilsson V. Linkage analysis of chromosome 17q markers and breast-ovarian cancer in Icelandic families, and possible relationship to prostatic cancer. *Am. J. Hum. Genet.* 1993;52: 711-717.
4. Berman DB, Costalas J, Schultz DC, Grana G, Daly M, Godwin AK. A common mutation in BRCA2 predisposes to a variety of cancers is found in both Jewish Ashkenazi and non-Jewish individuals. *Cancer Res.* 1996;56:3409-14.
5. Bienstock RJ, Darden T, Wiseman R, Pedersen L, Barrett JC. Molecular modeling of the amino-terminal zinc ring domain of BRCA1. *Cancer Res.* 1996 Jun 1;56(11):2539-45.
6. Boder E, Sedgwick RP. Ataxia-telangiectasia. (Clinical and immunological aspects). *Psychiatr Neurol Med Psychol Beih.* 1970;13-14:8-16.
7. Bork P, Blomberg N, Nilges M. Internal repeats in the BRCA2 protein sequence. *Nat Genet.* 1996 May;13(1):22-3.
8. Broeks A, Urbanus JH, Floore AN, Dahler EC, Klijn JG, Rutgers EJ, Devilee P, Russell NS, van Leeuwen FE, van't Veer LJ. ATM-heterozygous germline mutations contribute to breast cancer-susceptibility. *Am J Hum Genet.* 2000 Feb;66(2):494-500.
9. Callebaut I, Mornon JP. From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair. *FEBS Lett.* 1997 Jan 2;400(1):25-30.
10. Chapman MS, Verma IM. Transcriptional activation by BRCA1. *Nature.* 1996 Aug 22;382(6593):678-9.
11. Claus EB, Risch N, Thompson WD. Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study. *Am. J. Hum. Genet.* 1991;48:232-242.
12. Connor F, Bertwistle D, Mee PJ, Ross GM, Swift S, Grigorieva E, Tybulewicz VL, Ashworth A.. Tumorigenesis and a DNA repair defect in mice with a truncating Brca2 mutation. *Nat Genet.* 1997 Dec;17(4):423-30.
13. Costes B, Girodon E, Ghanem N, Chassignol M, Thuong NT, Dupret D, Goossens M. Psoralen-modified oligonucleotide primers improve detection of mutations by denaturing gradient gel electrophoresis and provide an alternative to GC-clamping. *Hum Mol Genet.* 1993 Apr;2(4):393-7.
14. Couch FJ, Farid LM, DeShano ML, Tavtigian SV, Calzone K, Campeau L, Peng Y, Bogden B, Chen Q, Neuhausen S, Shattuck-Eidens D, Godwin AK, Daly M, Radford DM, Sedlacek S, Rommens J, Simard J, Garber J, Merajver S, Weber BL. BRCA2 germline mutations in male breast cancer cases and breast cancer families. *Nat Genet.* 1996;13:123-5
15. Couch FJ, Weber B. L. Breast Cancer Information Core : Mutations and polymorphisms in the familial early-onset breast cancer (BRCA1) gene. *Hum. Mutat.* 1996;8: 8-18.
16. Den Otter W, Merchant TE, Beijerinck D, Koten JW. Breast cancer induction due to mammographic screening in hereditarily affected women. *Anticancer Res.* 1996 Sep-Oct;16(5B):3173-5.
17. Devesa SS, Blot WJ, Stone BJ, Miller BA, Tarone RE, Fraumeni JF Jr. Recent cancer trends in the United States. *J Natl Cancer Inst.* 1995 Feb 1;87(3):175-82.

18. Durocher F, Shattuck-Eidens D, McClure M, Labrie F, Skolnick MH, Goldgar DE, Simard J. Protein Comparison of BRCA1 polymorphisms, rare sequence variants and/or missense mutations in unaffected and breast/ovarian cancer populations. *Hum Mol Genet.* 1996 Jun;5(6):835-42.
19. Durocher F, Tonin P, Shattuck-Eidens D, Skolnick M, Narod SA, Simard J. Mutation analysis of the BRCA1 gene in 23 families with cases of cancer of the breast, ovary, and multiple other sites. *J Med Genet.* 1996 Oct;33(10):814-9.
20. Easton D, Peto J. The contribution of inherited predisposition to cancer incidence. *Cancer Surv.* 1990;9(3):395-416.
21. Easton DF, Bishop DT, Ford D, Crockford GP. Breast Cancer Linkage Consortium : Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. *Am. J. Hum. Genet.* 1993;52: 678-701.
22. Eisinger F, Alby N, Bremond A, Dauplat J, Espie M, Janiaud P, Kuttenn F, Lebrun JP, Lefranc JP, Pierret J, Sobol H, Stoppa-Lyonnet D, Thouvenin D, Tristant H, Feingold J [INSERM-FNCLCC collective expert's report. Recommendations for management of women having a genetic risk of developing breast and/or ovarian cancer. National Federation of Centers of the Fight Against Cancer]. *Ann Endocrinol (Paris).* 1998;59(6):470-84.
23. Escot C, Theillet C, Lidereau R, Spyrtos F, Champeme MH, Gest J, Callahan R. Genome Genetic alteration of the c-myc protooncogene (MYC) in human primary breast carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Jul;83(13):4834-8.
24. Evans DB, Crichlow RW. Carcinoma of the male breast and Klinefelter's syndrome: is there an association? *CA Cancer J Clin.* 1987 Jul-Aug;37(4):246-51.
25. Eyre H, Sondik E, Smith RA, Kessler L. Joint meeting on the feasibility of a study of screening premenopausal women (40-49 years) for breast cancer: April 20-21, 1994. *Cancer.* 1995 Mar 15;75(6):1391-403.
26. Fanen P, Ghanem N, Vidaud M, Besmond C, Martin J, Costes B, Plassa F, Goossens M. Molecular characterization of cystic fibrosis: 16 novel mutations identified by analysis of the whole cystic fibrosis conductance transmembrane regulator (CFTR) coding regions and splice site junctions. *Genomics.* 1992 Jul;13(3):770-6.
27. Favis R, Day JP, Gerry NP, Phelan C, Narod S, Barany F. Universal DNA array detection of small insertions and deletions in BRCA1 and BRCA2. *Nat Biotechnol.* 2000 May;18(5):561-564.
28. Ford D, Easton DF, Bishop DT, Narod SA, Goldgar DE. Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. *Lancet.* 1994;343:692-5
29. Friedman LS, Thistlethwaite FC, Patel KJ, Yu VP, Lee H, Venkitaraman AR, Abel KJ, Carlton MB, Hunter SM, Colledge WH, Evans MJ, Ponder BA. Thymic lymphomas in mice with a truncating mutation in Brca2. *Cancer Res.* 1998 Apr 1;58(7):1338-43
30. Friend S, Borresen AL, Brody L, Casey G, Devilee P, Gayther S, Goldgar D, Murphy P, Weber BL, Wiseman R. Breast cancer information on the web. *Nat Genet.* 1995 Nov;11(3):238-9.
31. Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, Dryja TP. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature.* 1986;323: 643-646.
32. Ganguly A, Rock MJ, Prockop DJ. Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments: evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Nov 1;90(21):10325-9.

33. Garber JE, Goldstein AM, Kantor AF, Dreyfus MG, Fraumeni JF Jr, Li FP. Follow-up study of twenty-four families with Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Res.* 1991 Nov 15;51(22):6094-7.
34. Gayther SA, Warren W, Mazoyer S, Russell PA, Harrington PA, Chiano M, Seal S, Hamoudi R, van Rensburg EJ, Dunning AM, Love R, Evans G, Easton D, Clayton D, Stratton MR, Ponder BAJ. Germline mutations of the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer families provide evidence for a genotype-phenotype correlation. *Nat Genet.* 1995;11: 428-433.
35. Germain D, Biasotto M, Tosi M, Meo T, Kahn A, Poenaru L. Fluorescence-assisted mismatch analysis (FAMA) for exhaustive screening of the alpha-galactosidase A gene and detection of carriers in Fabry disease. *Hum Genet.* 1996 Dec;98(6):719-26.
36. Gowen LC, Avrutskaya AV, Latour AM, Koller BH, Leadon SA. BRCA1 required for transcription-coupled repair of oxidative DNA damage. *Science.* 1998;281: 1009-1012.
37. Hakem R, de la Pompa JL, Sirard C, Mo R, Woo M, Hakem A, Wakeham A, Potter J, Reitmair A, Billia F, Firpo E, Hui CC, Roberts J, Rossant J, Mak TW. The tumor suppressor gene *Brcal* is required for embryonic cellular proliferation in the mouse. *Cell.* 1996;85: 1009-1023.
38. Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King M-C. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science.* 1990;250: 1684-1689.
39. Hamelin R, Jegou N, Laurent-Puig P, Vidaud M, Thomas G. Protein Efficient screening of p53 mutations by denaturing gradient gel electrophoresis in colorectal tumors. *Oncogene.* 1993 Aug;8(8):2213-20.
40. Harris H, Sidebottom E, Grace DM, Bramwell ME. The expression of genetic information: a study with hybrid animal cells. *J Cell Sci.* 1969 Mar;4(2):499-525.
41. Hayward RS, Steinberg EP, Ford DE, Roizen MF, Roach KW. Preventive care guidelines: 1991. American College of Physicians. Canadian Task Force on the Periodic Health Examination. United States Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 1991 May 1;114(9):758-83.
42. Hogervorst FB, Cornelis RS, Bout M, van Vliet M, Oosterwijk JC, Olmer R, Bakker B, Klijn JG, Vasen HF, Meijers-Heijboer H. Rapid detection of BRCA1 mutations by the protein truncation test. *Nat Genet.* 1995 Jun;10(2):208-12.
43. Holt JT, Thompson ME, Szabo C, Robinson-Benion C, Arteaga CL, King MC, Jensen RA. Growth retardation and tumour inhibition by BRCA1. *Nat Genet.* 1996;12:298-302.
44. Hutter P, Couturier A, Scott RJ, Alday P, Delozier-Blanchet C, Cachat F, Antonarakis SE, Joris F, Gaudin M, D'Amato L, Buerstedde JM. Complex genetic predisposition to cancer in an extended HNPCC family with an ancestral hMLH1 mutation. *J Med Genet.* 1996 Aug;33(8):636-40.
45. Imbert A, Chaffanet M, Essioux L, Noguchi T, Adelaide J, Kerangueven F, Le Paslier D, Bonaiti-Pellie C, Sobol H, Birnbaum D, Pebusque MJ. Integrated map of the chromosome 8p12-p21 region, a region involved in human cancers and Werner syndrome. *Genomics.* 1996 Feb 15;32(1):29-38.
46. Jensen RA, Thompson ME, Jetton TL, Szabo CI, van der Meer R, Helou B, Tronick SR, Page DL, King M-C, Holt JT. BRCA1 is secreted and exhibits properties of a granin. *Nat Genet.* 1996;12: 303-308.
47. Kerangueven F, Essioux L, Dib A, Noguchi T, Allione F, Geneix J, Longy M, Lidereau R, Eisinger F, Pebusque MJ, 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 Mar 2;10(5):1023-6.
48. Kinzler KW, Vogelstein. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature.* 1997 Apr 24;386(6627):761, 763.

49. Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971 Apr;68(4):820-3.
50. Knudson AG. Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Dec 1;90(23):10914-21.
51. Koonin EV, Altschul SF, Bork P. BRCA1 protein products ... Functional motifs... *Nat Genet*. 1996 Jul;13(3):266-8.
52. Kozak FK, Hall JG, Baird PA. Familial breast cancer in males. A case report and review of the literature. *Cancer*. 1986 Dec 15;58(12):2736-9.
53. Laplanche A, Benhamou E. [Estimation of cancer incidence in France]. *Bull Cancer (Paris)*. 1991;78(5):405-14.
54. Li FP & Fraumeni JF Jr. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med*. 1969;71:747-52
55. Li FP, Fraumeni JF Jr, Mulvihill JJ, Blattner WA, Dreyfus MG, Tucker MA, Miller RW. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res*. 1988 Sep 15;48(18):5358-62.
56. Lloyd KM and Denis M. Cowden's disease: a possible new syndrome with multiple system involvement. *Ann Intern Med* 1963; 58: 136-142.
57. Lobaccaro JM, Lumbroso S, Belon C, Galtier-Dereure F, Bringer J, Lesimple T, Heron JF, Pujol H, Sultan C. Male breast cancer and the androgen receptor gene. *Nat Genet*. 1993 Oct;5(2):109-10.
58. Lu M, Conzen SD, Cole CN, Arrick BA. Protein, Nucleotide Characterization of functional messenger RNA splice variants of BRCA1 expressed in nonmalignant and tumor-derived breast cells. *Cancer Res*. 1996 Oct 15;56(20):4578-81.
59. Lynch HT, Bewtra C, Lynch JF. Familial ovarian carcinoma. Clinical nuances. *Am J Med*. 1986 Dec;81(6):1073-6.
60. Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, Cavalieri RJ, Boland CR. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology*. 1993 May;104(5):1535-49.
61. Lynch HT, Watson P, Lanspa SJ, Marcus J, Smyrk T, Fitzgibbons RJ Jr, Kriegler M, Lynch JF. Natural history of colorectal cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I and II). *Dis Colon Rectum*. 1988 Jun;31(6):439-44.
62. Mazoyer S, Dunning AM, Serova O, Dearden J, Puget N, Healey CS, Gayther SA, Mangion J, Stratton MR, Lynch HT, Goldgar DE, Ponder BA, Lenoir GM. A polymorphic stop codon in BRCA2. *Nat Genet*. 1996 Nov;14(3):253-4.
63. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, Bell R, Rosenthal J, and 33 others. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 1994;266: 66-71.
64. Milner J, Ponder B, Hughes-Davies L, Seltmann M, Kouzarides T. Transcriptional activation functions in BRCA2. *Nature*. 1997;386:772-3
65. Monteiro AN, August A, Hanafusa H. Evidence for a transcriptional activation function of BRCA1 C-terminal region. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:13595-9
66. Neuhausen S, Gilewski T, Norton L, Tran T, McGuire P, Swensen, J, Hampel H, Borgen P, Brown K, Skolnick M, Shattuck-Eidens D, Jhanwar S, Goldgar D, Offit K. Recurrent BRCA2 6174delT mutations in Ashkenazi Jewish women affected by breast cancer. *Nat Genet*. 1996;13: 126-128.

67. Offit K, Gilewski T, McGuire P, Schluger A, Hampel H, Brown K, Swensen J, Neuhausen S, Skolnick M, Norton L, Goldgar D. Germline BRCA1 185delAG mutations in Jewish women with breast cancer. *Lancet*. 1996 Jun 15;347(9016):1643-5.
68. Olschwang S, Turet A, Laurent-Puig P, Muleris M, Parc R, Thomas G. Restriction of ocular fundus lesions to a specific subgroup of APC mutations in adenomatous polyposis coli patients. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):959-68.
69. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Apr;86(8):2766-70.
70. Ouchi T, Monteiro AN, August A, Aaronson SA, Hanafusa H. BRCA1 regulates p53-dependent gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 3;95(5):2302-6.
71. Parkin DM, Laara E, Muir CS. Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancers in 1980. *Int J Cancer*. 1988 Feb 15;41(2):184-97.
72. Phelan CM, Lancaster JM, Tonin P, Gumbs C, Cochran C, Carter R, Ghadirian P, Perret C, Moslehi R, Dion F, Faucher MC, Dole K, Karimi S, Foulkes W, Lounis H, Warner E, Goss P, Anderson D, Larsson C, Narod SA, Futreal PA. Mutation analysis of the BRCA2 gene in 49 site-specific breast cancer families. *Nat Genet*. 1996;13:120-122.
73. Pippard EC, Hall AJ, Barker DJ, Bridges BA. Cancer in homozygotes and heterozygotes of ataxia-telangiectasia and xeroderma pigmentosum in Britain. *Cancer Res*. 1988 May 15;48(10):2929-32.
74. Ponder BA. Inherited predisposition to cancer. *Trends Genet*. 1990 Jul;6(7):213-8.
75. Roa BB, Boyd AA, Volcik K, Richards CS. Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA1 and BRCA2. *Nat Genet*. 1996;14: 185-187.
76. Saurin AJ, Borden KL, Boddy MN, Freemont PS. Does this have a familiar RING? *Trends Biochem Sci*. 1996 Jun;21(6):208-14.
77. Scully R, Chen J, Ochs RL, Keegan K, Hoekstra M, Feunteun J, Livingston DM. Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. *Cell*. 1997 Aug 8;90(3):425-35.
78. Scully R, Chen JJ, Plug A, Xiao Y, Weaver D, Feunteun J, Ashley T, Livingston DM. Association of BRCA1 with RAD51 in mitotic and meiotic cells. *Cell*. 1997;88:265-75.
79. Scully R, Anderson SF, Chao DM, Wei W, Ye L, Young RA, Livingston DM, Parvin JD. BRCA1 is a component of the RNA polymerase II holoenzyme. *Proc. Nat. Acad. Sci*. 1997;94: 5605-5610.
80. Seitz S, Rohde K, Bender E, Nothnagel A, Kolble K, Schlag PM, Scherneck S. Strong indication for a breast cancer susceptibility gene on chromosome 8p12-p22: linkage analysis in German breast cancer families. *Oncogene*. 1997 Feb 13;14(6):741-3.
81. Shattuck-Eidens D, McClure M, Simard J, Labrie F, Narod S, Couch F, Hoskins K, Weber B, Castilla L, Erdos M, et al. A collaborative survey of 80 mutations in the BRCA1 breast and ovarian cancer susceptibility gene. Implications for presymptomatic testing and screening. *JAMA*. 1995 Feb 15;273(7):535-41.
82. Sheffield VC, Cox DR, Lerman LS, Myers RM. Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Jan;86(1):232-6.

83. Sobol H, Mazoyer S, Smith SA, Lyonnet D, Bignon YJ, Narod SA, Ardoin A, Biron P, Bobin JY, Bremond A, et al. Familial ovarian carcinoma: pedigree studies and preliminary results from linkage analysis. *Bull Cancer (Paris)*. 1993 Feb;80(2):121-34.
84. Sobol H, Mazoyer S, Narod SA, Smith SA, Black DM, Kerbrat P, Jamot B, Solomon E, Ponder BAJ, Guerin D. Genetic heterogeneity of early-onset familial breast cancer. *Hum. Genet.* 1992;89: 381-383.
85. Somasundaram K, Zhang H, Zeng YX, Houvras Y, Peng Y, Zhang H, Wu GS, Licht JD, Weber BL, El-Deiry WS. Arrest of the cell cycle by the tumour-suppressor BRCA1 requires the CDK-inhibitor p21WAF1/Cip1. *Nature*. 1997;389:187-90
86. Stanbridge EJ, Flandermeyer RR, Daniels DW, Nelson-Rees WA. Specific chromosome loss associated with the expression of tumorigenicity in human cell hybrids. *Somatic Cell Genet.* 1981 Nov;7(6):699-712.
87. Steichen-Gersdorf E, Gallion HH, Ford D, Girodet C, Easton DF, DiCioccio RA, Evans G, Ponder MA, Pye C, Mazoyer S, et al. Familial site-specific ovarian cancer is linked to BRCA1 on 17q12-21. *Am J Hum Genet.* 1994 Nov;55(5):870-5.
88. Stratton MR, Ford D, Neuhausen S, Seal S, Wooster R, Friedman LS, King MC, Egilsson V, Devilee P, McManus R, et al. Familial male breast cancer is not linked to the BRCA1 locus on chromosome 17q. *Nat Genet.* 1994;7:103-7
89. Struwing JP, Hartge P, Wacholder S, Baker SM, Berlin M, McAdams M, Timmerman MM, Brody LC, Tucker MA. The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *New Eng. J. Med.* 1997;336: 1401-1408.
90. Tavtigian SV, Simard J, Rommens J, Couch F, Shattuck-Eidens D, Neuhausen S, Merajver S, Thorlacius S, Offit K, Stoppa-Lyonnet D, Belanger C, Bell R, Berry S, Bogden R, Chen Q, Davis T, Dumont M, Frye C, Hattier T, Jammulapati S, Janecki T, Jiang P, Kehrer R, Leblanc JF, Goldgar DE, et al. The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked. *Nat Genet.* 1996;12:10-4
91. Taylor AM. Ataxia telangiectasia genes and predisposition to leukaemia, lymphoma and breast cancer. *Br J Cancer.* 1992 Jul;66(1):5-9.
92. Thoresen SO. [Li-Fraumeni syndrome and the p53 gene]. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 1992 Mar 10;112(7):887-9.
93. Thorlacius S, Olafsdottir G, Tryggvadottir L, Neuhausen S, Jonasson JG, Tavtigian SV, Tulinius H, Ogmundsdottir HM, Eyfjord JE. A single BRCA2 mutation in male and female breast cancer families from Iceland with varied cancer phenotypes. *Nat Genet.* 1996;13:117-9
94. Thurfjell EL, Lernevall KA, Taube AA. Benefit of independent double reading in a population-based mammography screening program. *Radiology.* 1994 Apr;191(1):241-4.
95. Tonin P, Ghadirian P, Phelan C, Lenoir GM, Lynch HT, Letendre F, Belanger D, Monte M, Narod SA. A large multisite cancer family is linked to BRCA2. *J Med Genet.* 1995 Dec;32(12):982-4.
96. Varley JM, Swallow JE, Brammar WJ, Whittaker JL, Walker RA. Alterations to either c-erbB-2(neu) or c-myc proto-oncogenes in breast carcinomas correlate with poor short-term prognosis. *Oncogene.* 1987;1(4):423-30.
97. Vasen HF. Screening in breast cancer families: is it useful? *Ann Med.* 1994 Jun;26(3):185-90.
98. Verpy E, Biasotto M, Brai M, Misiano G, Meo T, Tosi M. , Protein Exhaustive mutation scanning by fluorescence-assisted mismatch analysis discloses new genotype-phenotype correlations in angiodema. *Am J Hum Genet.* 1996 Aug;59(2):308-19.

99. Verpy E, Biasotto M, Meo T, Tosi M. Efficient detection of point mutations on color-coded strands of target DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Mar 1;91(5):1873-7.
100. Wagner T, Stoppa-Lyonnet D, Fleischmann E, Muhr D, Pages S, Sandberg T, Caux V, Moeslinger R, Langbauer G, Borg A, Oefner P. Denaturing high-performance liquid chromatography detects reliably BRCA1 and BRCA2 mutations. *Genomics*. 1999 Dec 15;62(3):369-76.
101. Wald NJ, Murphy P, Major P, Parkes C, Townsend J, Frost C. UKCCCR multicentre randomised controlled trial of one and two view mammography in breast cancer screening. *BMJ*. 1995 Nov 4;311(7014):1189-93.
102. Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Science*. 1991 Nov 22;254(5035):1138-46.
103. White MB, Carvalho M, Derse D, O'Brien SJ, Dean M. Detecting single base substitutions as heteroduplex polymorphisms. *Genomics*. 1992 Feb;12(2):301-6.
104. Whittemore AS, Gong G, Itnyre J. Prevalence and contribution of BRCA1 mutations in breast cancer and ovarian cancer: results from three U.S. population-based case-control studies of ovarian cancer. *Am J Hum Genet*. 1997;60:496-504
105. Wilson CA, Payton MN, Elliott GS, Buaas FW, Cajulis EE, Grosshans D, Ramos L, Reese DM, Slamon DJ, Calzone FJ. Protein, Nucleotide Differential subcellular localization, expression and biological toxicity of BRCA1 and the splice variant BRCA1-delta11b. *Oncogene*. 1997 Jan 9;14(1):1-16.
106. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*. 1995;378:789-92
107. Wooster R, Mangion J, Eeles R, Smith S, Dowsett M, Averill D, Barrett-Lee P, Easton DF, Ponder BA, Stratton MR. Genome A germline mutation in the androgen receptor gene in two brothers with breast cancer and Reifenstein syndrome. *Nat Genet*. 1992 Oct;2(2):132-4.
108. Wu LC, Wang ZW, Tsan JT, Spillman MA, Phung A, Xu XL, Yang MC, Hwang LY, Bowcock AM, Baer R. Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. *Nat Genet*. 1996;14:430-40.
109. Zhang H, Somasundaram K, Peng Y, Tian H, Zhang H, Bi D, Weber BL, El-Deiry WS. BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity. *Oncogene*. 1998 Apr 2;16(13):1713-21.



VU

NANCY, le 11 AVRIL 2000

Le Président de Thèse

Professeur Ph. JONVEAUX

NANCY, le 16 MAI 2000

Le Doyen de la Faculté de Médecine

Par délégation

Professeur H. VESPIGNANI

AUTORISE À SOUTENIR ET À IMPRIMER LA THÈSE

NANCY, le 22 MAI 2000

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY I

Professeur C. BURLET

RESUME DE LA THESE :

Le risque cumulé sur la vie d'une femme d'un pays occidental de développer un cancer du sein est de 8 à 10%. Ce cancer est ainsi le plus fréquent de la femme et pose donc un problème de santé publique. 5 à 10% des cancers du sein sont liés à une mutation constitutionnelle d'un gène majeur de prédisposition et représentent les formes héréditaires. Si une femme est porteuse d'un gène de prédisposition muté, ce risque de développer un cancer passe à plus de 80% d'où l'importance de repérer ces femmes à très haut risque pour une prise en charge multidisciplinaire adaptée.

BRCA1 (BREast CANcer 1) et BRCA2 (BREast CANcer 2) sont les deux gènes le plus souvent retrouvés mutés dans ces formes héréditaires (80% des formes familiales de cancers du sein et de l'ovaire). La diversité de mutations observées et la grande taille de ces deux gènes rendent laborieuse la recherche de la mutation germinale. Afin d'identifier la présence éventuelle d'une mutation germinale au sein d'un de ces deux gènes de prédisposition, nous avons choisi une approche en deux temps. La première étape consiste en un test de pré-criblage par technique de CSGE (*Conformation Sensitive Gel Electrophoresis*). Une migration électrophorétique anormale des hétéroduplex permet la mise en évidence de fragments variants. La mutation germinale est identifiée dans un second temps par séquençage de ce fragment.

Nous avons recherché le présence d'une mutation de BRCA1 pour 46 cas index de 46 familles. 14 mutations délétères donnant naissance à une protéine non fonctionnelle ont été identifiées. Pour ces 14 familles, la recherche peut être ensuite étendue aux apparentés à risque par simple séquençage du fragment portant la mutation. Les femmes dont le risque génétique a été identifié au niveau individuel par cette analyse font l'objet d'une prise en charge adaptée. Les femmes ne portant pas le risque génétique lié à BRCA1 et BRCA2 sont toutefois surveillées de la même manière qu'une femme de la population générale.

TITRE EN ANGLAIS :

**HEREDITARY BREAST AND OVARIAN CANCER.
NANCY EXPERIENCE: DNA-BASED TESTING FOR BRCA1 CANCER-
PREDISPOSING MUTATIONS.**

THESE : MEDECINE SPECIALISEE - ANNEE 2000

MOTS CLEFS :

Cancer du sein et de l'ovaire ; gènes de prédisposition ; mutations germinales ; BRCA1 ; BRCA2 ; hétéroduplex ; CSGE ; séquençage.

Faculté de Médecine de Nancy

9, avenue de la Forêt de Haye

54505 - VANDOEUVRE LES NANCY Cedex.