

# Les Marqueurs Biologiques des Tumeurs

Dr F. Trolen  
Département de Biologie et de  
Pathologie Médicale  
Institut Gustave-Roussy  
Villejuif

Décembre 2009

## Généralités sur la maladie cancéreuse

- Le Cancer est une maladie multigénique



### Gènes

- structure
- synthèse
- régulation
- prolifération
- réparation
- différenciation
- apoptose

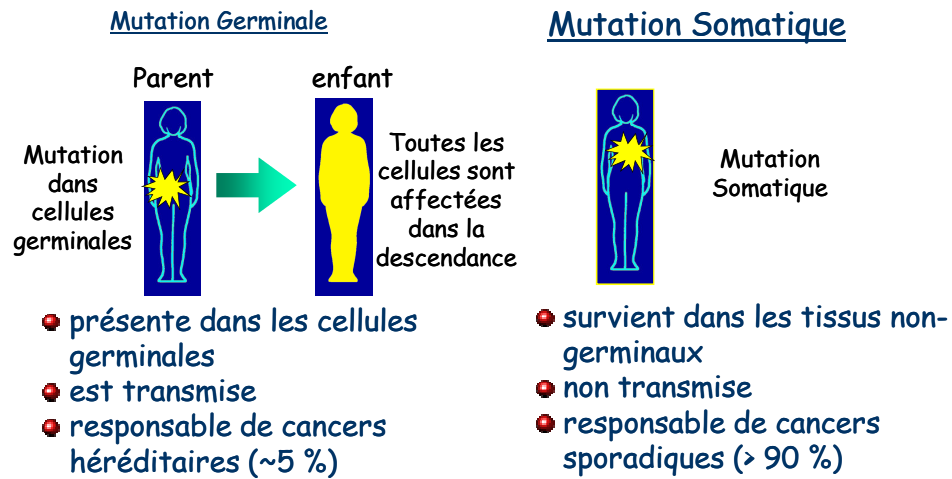
$10^{13}$  cellules  
 $10^{16}$  divisions  
 $10^{-6}$  mutation/gène/division  
 ↓  
 $10^{10}$  « risque » de  
 mutation/individu/vie



Maladie(s)  
 multiorgane(s)  
 multigénique(s)

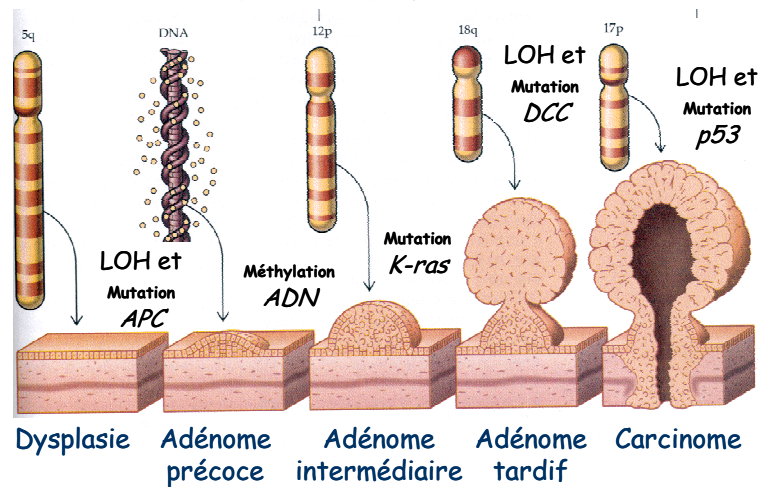
## Généralités sur la maladie cancéreuse

- Le Cancer est une maladie multigénique



## Généralités sur la maladie cancéreuse

- Les différentes étapes de la progression tumorale



Adapté de Fearon ER. *Cell* 61:759, 1990

## Généralités sur la maladie cancéreuse

- Place de la biologie médicale en oncologie

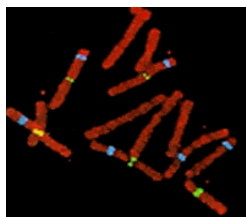
Prise en charge des situations pathologiques en rapport avec le processus néoplasique ou avec les effets secondaires des néoplasies



➔ Aide au dépistage, au diagnostic, au pronostic et/ou à la surveillance thérapeutique de la maladie cancéreuse

## Généralités sur les Marqueurs Biologiques

- Notion de marqueurs biologiques ou génétique de tumeur



*Liquides biologiques*  
(sang, urine, LCR, ...)

*Cellules circulantes*

*Tumeur solide*

Protéines



Immunoanalyse

Cytométrie de flux

Immunohistochimie

ADN



PCR

PCR

PCR  
cytogénétique

ARNm



RT-PCR

RT-PCR

## Généralités sur les Marqueurs Biologiques

### • Synthétisés par la tumeur

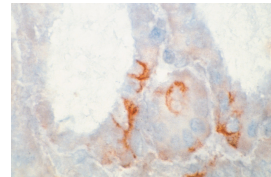
- ▢ Dans les liquides extra-cellulaires et les fluides biologiques
- ▢ Intra-cellulaires et analysés au sein des tissus tumoraux (marqueurs tissulaires) analysés au niveau protéique ou au niveau du gène.

### • Les marqueurs de la réponse de l'hôte à la tumeur

- ▢ Marqueurs de l'inflammation : Ferritine, Protéine C réactive
- ▢ Marqueurs de lyse ou de nécrose cellulaire : LDH
- ▢ Marqueurs d'atteinte hépatite : Gamma GT, PAL

## Marqueurs tissulaires protéiques et Immuno-histochimie

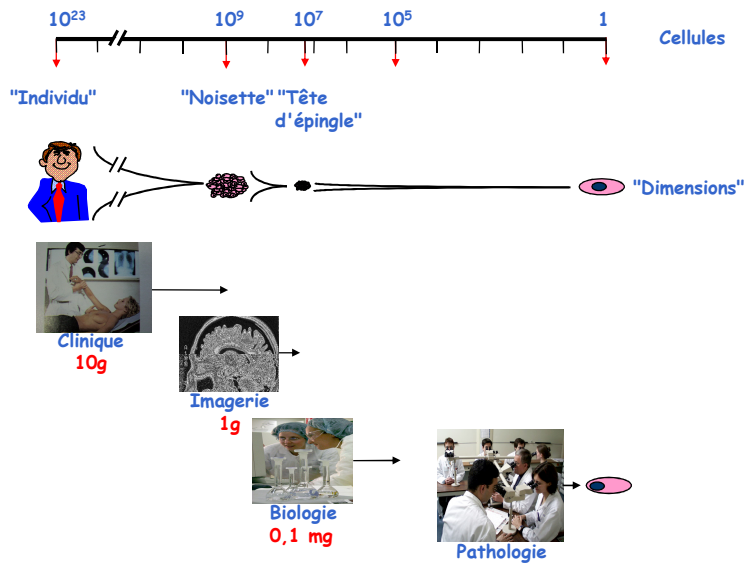
### ➔ Aide au diagnostic anatomo-pathologique



#### Marqueurs:

- Filaments intermédiaires (cytokératines, vimentine, desmine,...)
- Musculaires (actine, desmine, ...)
- Leucocytaires (CDs)
- Membrane basale
- Différenciation endothéliale
- Différenciation neuro-endocrine (NSE, CgA, synatophysine)
- Mucines (DF3, CA19.9, CA125, ...)
- Autres marqueurs (PSA, Tg, hCG, ACE, ...)

## Les capacités des différentes approches pour le diagnostic et le suivi de cancers



## Caractéristiques d'un dosage de marqueur biologique de cancer

		Cancer	
		Présent	Absent
Résultat du dosage	Supérieur aux valeurs usuelles	a	b
	Inférieur aux valeurs usuelles	c	d

a,b,c,d: nombre de patients

Sensibilité = Probabilité que le résultat du dosage de marqueur chez un malade cancéreux soit supérieur aux valeurs usuelles

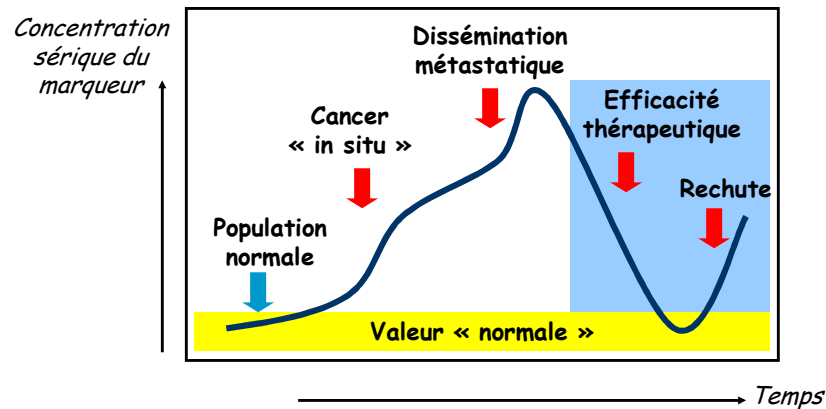
Spécificité = Probabilité que le résultat du dosage de marqueur chez un sujet sain soit compris dans les valeurs usuelles

Valeur prédictive positive = Probabilité que le sujet ait un cancer lorsque le résultat du dosage est supérieur aux valeurs usuelles

Valeur prédictive négative = Probabilité qu'un sujet n'ait pas cancer lorsque le résultat du dosage est compris dans les valeurs usuelles

## Généralités sur les Marqueurs Biologiques

- Caractéristiques idéales d'un marqueur biologique



## Généralités sur les Marqueurs Biologiques

- Définition et caractéristiques des marqueurs biologiques

- Protéines glycosylées ou non, détectables dans le sérum (ou dans le plasma ⚠) par immunoanalyse, lors de la présence d'un cancer et dont la concentration suit l'évolution de la maladie.

- Caractéristiques :

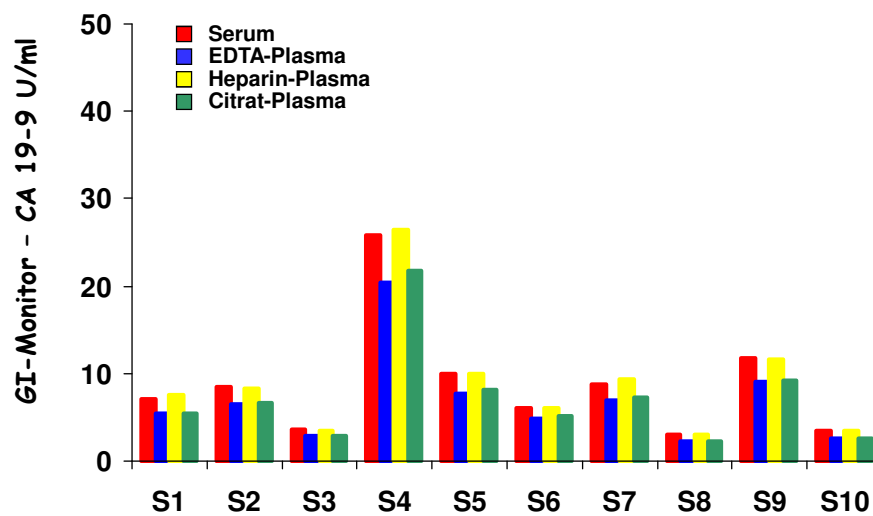
- ▢ pas de marqueur pour tous les cancers
  - ▢ marqueur non spécifique d'organe
  - ▢ expression non régulée (qualitatif vs quantitatif)
  - ▢ marqueur non spécifique de cancer
- ➔ contexte clinique et histologique

## Les questions analytiques

- La nature du prélèvement

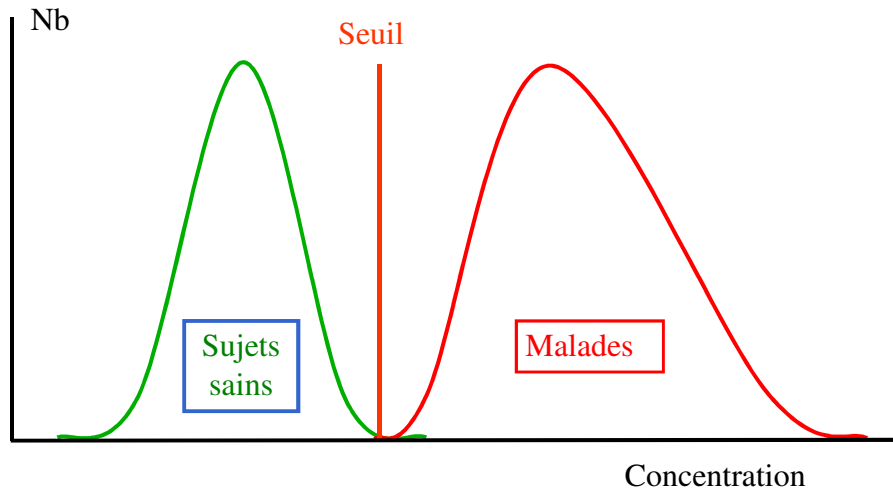


## Variabilité du résultat selon la nature du prélèvement



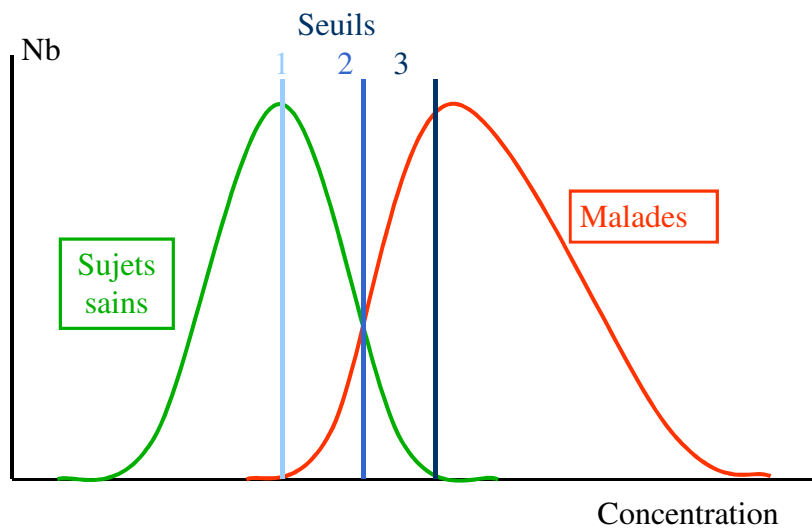
## Choix d'un seuil

Cas idéal : Marqueur Tumoral très discriminant;  
peu ou pas de « Faux Positifs » (FP) et de « Faux Négatifs » (FN)



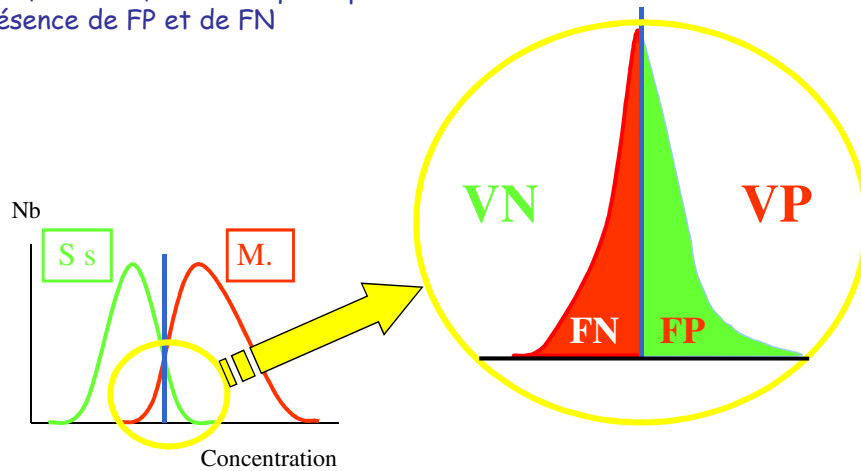
## Choix d'un seuil

Cas habituel, d'un marqueur peu discriminant: présence de FP et de FN



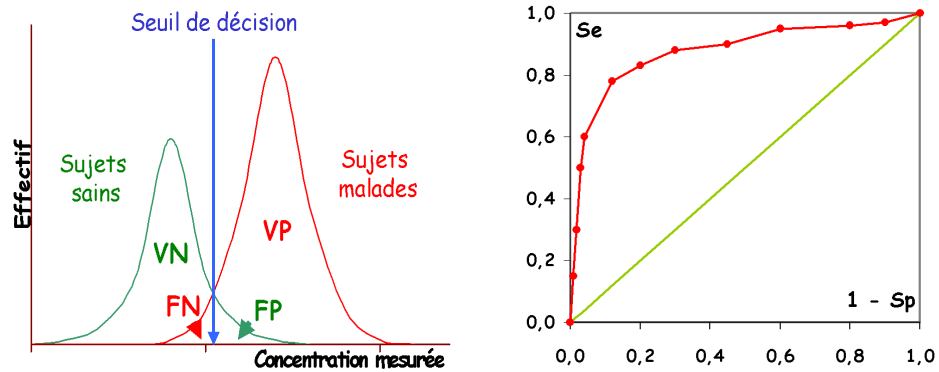


▣ Cas, habituel, d'un marqueur peu discriminant :  
présence de FP et de FN



- ▣ La courbe ROC s'obtient en faisant varier le seuil et en mesurant pour chaque valeur-seuil les % de VP et FP
- ▣ Elle donne l'illustration graphique des conséquences de la variation du seuil de décision pour un test et pour une population
- ▣ Elle constitue un indice de la valeur diagnostique du test

## Fixation des seuils par courbes ROC



Les courbes ROC montrent la relation entre la probabilité de déclarer atteint un individu réellement malade (sensibilité) et la probabilité de déclarer atteint un individu réellement indemne ( $1 - Sp$ ) pour toute la gamme des valeurs du seuil de décision.

## Marqueur biologique de tumeur : Bon usage

### ● Dépistage

- ▣ Identification d'une pathologie cancéreuse ou de lésions pré-cancéreuses chez un individu asymptomatique.
- ▣ Ne pose pas le diagnostic.
- ▣ Un résultat positif entraîne des examens diagnostiques pour la vérification.
- ▣ Ne concerne pratiquement aucun marqueur biologique de tumeur du fait du manque de spécificité

### ● Diagnostic

- ▣ Intérêt pour l'aide au diagnostic chez un individu symptomatique
- ▣ Quelques marqueurs avec un intérêt limité

- En cas de cancer :

- ▣ Bilan initial : Taux → valeur pronostique
- ▣ Traitement de 1ère intention : demi-vie → valeur pronostique
- ▣ Détection précoce des récurrences : → intérêt démontré
- ▣ Traitement des récurrences / métastases : → intérêt démontré

- Glycoprotéines membranaires:

- ▣ Mucines : CA125, CA15.3, CA19.9
- ▣ Antigènes oncofoetaux :
  - Molécules d'adhésion : ACE (antigène carcino-embryonnaire)
  - Transporteur : AFP ( $\alpha$ -foetoprotéine)

- Enzymes et dérivés

- ▣ PSA (antigène prostatique spécifique)
- ▣ NSE (énolase neurone spécifique)

- Hormones et dérivés

- ▣ hCG (hormone Chorionique Gonadotrope) et sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$
- ▣ CT (calcitonine)
- ▣ Tg (thyroglobuline)

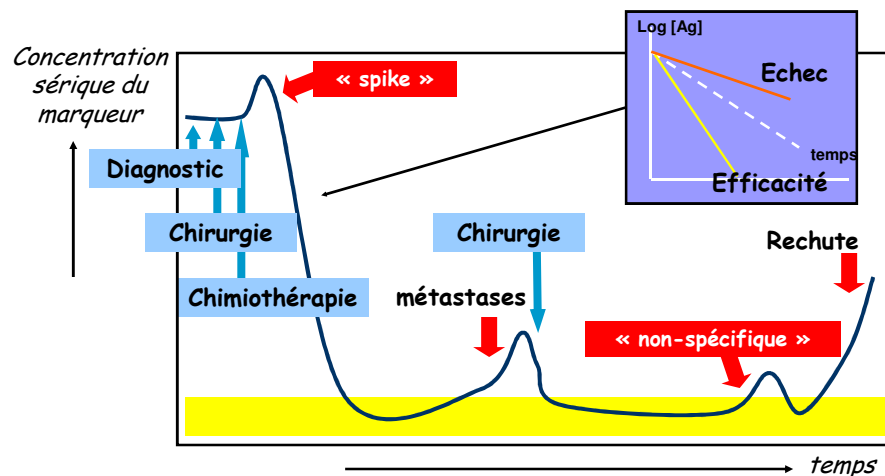
## Généralités sur les Marqueurs Biologiques

### Autres:

- ▣ Fragment de cytokératine : CYFRA 21-1
- ▣ Squamous cell carcinoma : SCC
- ▣ Immunoglobulines monoclonales
  - ▣ Immunoglobulines entières
  - ▣ Chaines légères

## Utilisation Clinique des Marqueurs Biologiques

- Profil de l'évolution sérique d'un marqueur biologique au cours du suivi thérapeutique




## Utilisation Clinique des Marqueurs Biologiques

- Intérêt dans dépistage, diagnostic et suivi
- Profil d'évolution d'un marqueur
- Utilisation clinique des principaux marqueurs
- Bonnes pratiques d'utilisation des marqueurs

## Marqueurs & Dépistage

- **Antigène Spécifique de la Prostate (PSA) et Cancer de la Prostate**

- ▣ Glycoprotéine (34 kDa)
- ▣ Famille des Kallicréines, enzyme
- ▣ Valeurs en fct. âge : 2,5 - 7 ng/mL 
- ▣ **Élévations** non spécifiques
  - prostatite
  - hypertrophie bénigne de la prostate (HBP)
- ▣ **Indication** : adénocarcinome de la prostate



PSA libre et complexés



## Marqueurs & Dépistage

- **Antigène Spécifique de la Prostate (PSA) et Cancer de la Prostate**
  - ▣ **Dépistage** : Dépistage orienté sur les hommes de plus de 50 ans. A ne prescrire qu'après avoir informé le patient des conséquences de la découverte d'un PSA élevé
  - ▣ **Diagnostic** : 4 - 10 ng/mL ? HBP vs AdK  
PSA libre/total : / lié (ACT) = AdK
  - ▣ **Pronostic** : Temps de doublement du PSA
  - ▣ **Surveillance** :
    - ↗ prostatectomie radicale : PSA normal < 3 semaines
    - ↗ radiothérapie : PSA / cancer résiduel, métastases
    - ↗ hormonothérapie : réponse clinique si PSA < 2,5 ng/mL

## Notions de cinétique des marqueurs biologiques

- **La valeur seuil d'un dosage c'est :**
  - ▣ Une interprétation à partir de la répartitions de valeurs observées dans une population de sujets sains
  - ▣ La sensibilité et la spécificité sont issues (courbe ROC) à partir des valeurs mesurées chez des sujets sains et sujets atteints
  - ▣ Elle ne tient pas compte de :
    - La variabilité individuelle (âge, corpulence,....)
    - La variabilité analytique
- **L'évaluation de la cinétique d'un marqueur biologique c'est :**
  - ▣ Une réponse graphique à des profils évolutifs
  - ▣ Chaque patient est son propre témoin
  - ▣ Doit se réaliser avec une même technique dans un même laboratoire,
  - ▣ Dans le contexte du dossier médical

- Les outils :

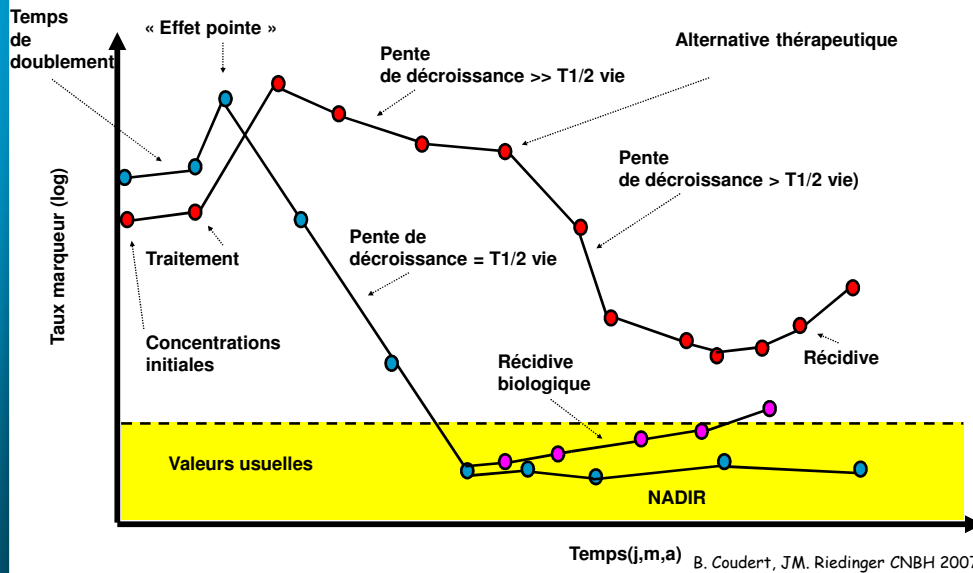
- La concentration initiale du marqueur biologique
- Le calcul de la pente entre deux prélèvements et le Nadir

Calcul	Formule	Commentaire
Temps de doublement (I,J)	$\frac{\log 2}{\text{pente}(I,J)}$	I : point de mesure initiale J : point de mesure finale Pente(I,J) : pente de la droite de régression
Temps de demi-vie	$\frac{\log 2}{\text{pente}(I,J)}$	Même formule que pour le temps de doublement. On parle de demi-vie lorsque la courbe décroît et de temps de doublement lorsqu'elle croît.
Nadir observé		Taux le plus bas jamais observé.
Droite de régression linéaire (I,J)	Droite $y = a x + b$ $a = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum (x^2) - (\sum x)^2}$ $b = \frac{\sum y \sum (x^2) - \sum x \sum xy}{n \sum (x^2) - (\sum x)^2}$	I : mesure initiale (x <sub>i</sub> ,y <sub>i</sub> ) J : mesure finale (x <sub>j</sub> ,y <sub>j</sub> ) x : temps associé à la mesure (à partir de la date de la première mesure) y : log du taux du marqueur

- Les objectifs :

- Dépistage à partir de population à risque
  - Môle → Choriocarcinome (hCG)
- Dépistage individuel organisé (?)
  - PSA et cancer de la prostate (Vélocité ou temps de doublement)
- Surveillance thérapeutique
  - Indicateurs biologiques d'efficacité
  - Traitement de la maladie résiduelle
  - Alternative thérapeutique si elle existe
  - Optimisation des lignes de traitements
- Traitement précoce des récidives

## Critères dynamiques observés



## Détection des Marqueurs Biologiques

## • Demi-vie des marqueurs biologiques

Marqueur	1/2 vie (j)
CT	20 mn
hCG	1-4
Tg	1 - 4
PSA	2 - 3
AFP	3 - 6
ACE	3 - 15
CA125	~ 5
CA15.3	8 - 10

⇨ Théorie : modèle compartimental unique.

Pratique : deux décroissances (rapide → lente)

⇨ 1/2 vie variable en fct. de :

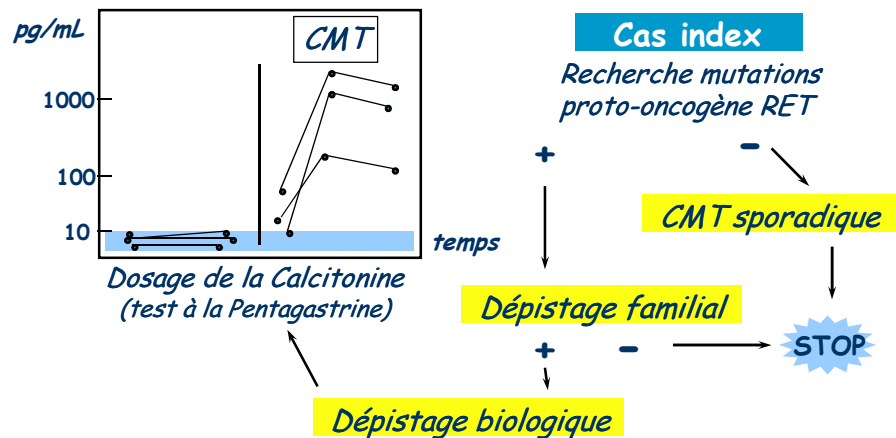
- ▣ la structure du marqueur
- ▣ l'état physiopathologique
- ▣ certains traitements



- **Calcitonine (CT) et Cancer Médullaire de la Thyroïde (CMT)**


- ▣ Hormone polypeptidique (< 5 kDa)
- ▣ **Valeur de référence** < 10 pg/mL
- ▣ **Élévations** non spécifiques : Néoplasies Endocrines Multip.
- ▣ **Diagnostic** : intérêt dans **population à risque** (familles CMT)
- ▣ **Surveillance** :
  - test à la Pentagastrine (Pg) → apparentés porteurs de la mutation RET.
  - élévation précoce lors des récives

- **Calcitonine (CT) et Cancer Médullaire de la Thyroïde (CMT)**



## Marqueurs & Dépistage

- $\alpha$ -foeto protéine (AFP) et Cancer du foie (hépatocarcinome)

- ▣ Glycoprotéine oncofoetale (69 kDa) 
- ▣ Famille Alb,
- ▣ Valeur de référence < 10 ng/mL
- ▣ Élévations non spécifiques
  - cirrhose
  - hépatites aiguës et chroniques
  - métastases hépatiques d'adénocarcinomes
- ▣ Indications : hépatocarcinome, T. Germinale

## Les questions analytiques

- Origine eutopique et/ou ectopique



## Concentration sérique d'AFP chez l'enfant

Age	AFP (ng / ml)
Nouveau-né prématuré	134 000 ± 41 000
Nouveau-né à terme	48 500 ± 35 000
Nouveau-né 2 semaines	33 000 ± 32 000
2 semaines - 1 mois	9 450 ± 12 600
1 mois	2 600 ± 3 000
2 mois	300 ± 270
3 mois	88 ± 87
4 mois	74 ± 56
5 mois	46 ± 19
6 mois	12 ± 10
7 mois	10 ± 7
8 mois	9 ± 5

D'après Wu, J. et al. 1994

## Marqueurs & Diagnostic

### L'hormone Chorionique Gonadotrope : hCG

- Hormone glycoprotéique de 36,7 kDa
- Appartient à la famille des hormones glycoprotéiques
  - ▣ hLH, hFSH, hTSH et hCG
- Production par les cellules trophoblastiques du placenta lors de la grossesse (et par des cellules normales non trophoblastiques)
- Association non covalente de 2 sous-unités :
  - ◆ hCG alpha (commune aux quatre hormones glycoprotéiques)
  - ◆ hCG beta (spécifique, 22,2 kDa)

## L'alpha hCG

### ● La sous-unité alpha

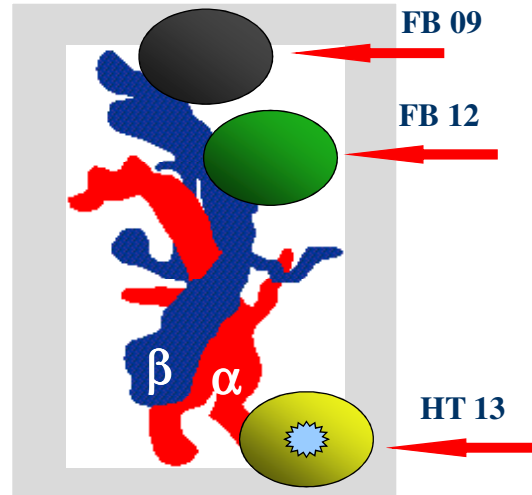
- Gène unique (chromosome 6)
- Commune aux quatre hormones glycoprotéiques
- Masse moléculaire : 14,5 kDa

## La bêta hCG

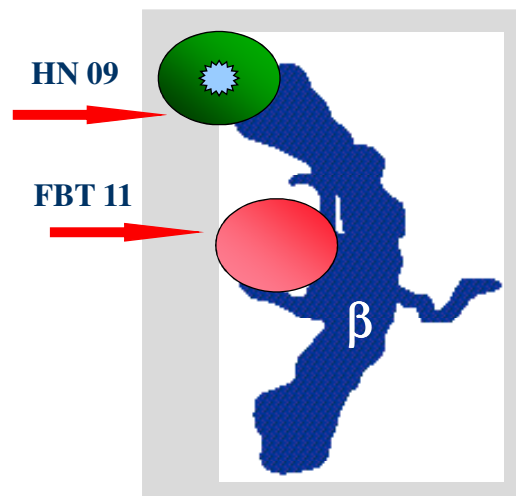
### ● La sous-unité bêta

- ☒ Spécifique à chaque hormone glycoprotéique
- ☒ hCG $\beta$  : 4 gènes différents (chromosome 19) qui codent pour des sous-unités légèrement différentes (ac. aminé 117)
  - l'hCG $\beta$  de type I - Ala
    - cellules normales non trophoblastiques (sein, colon, prostate, thyroïde, vessie, utérus,...)
  - l'hCG $\beta$  de type II – Asp
    - cellules trophoblastiques
    - cellules malignes non trophoblastiques (sein, vessie, prostate, thyroïde, poumon,...)

## Principe du dosage spécifique de l'hormone chorionique gonadotrope - hCG



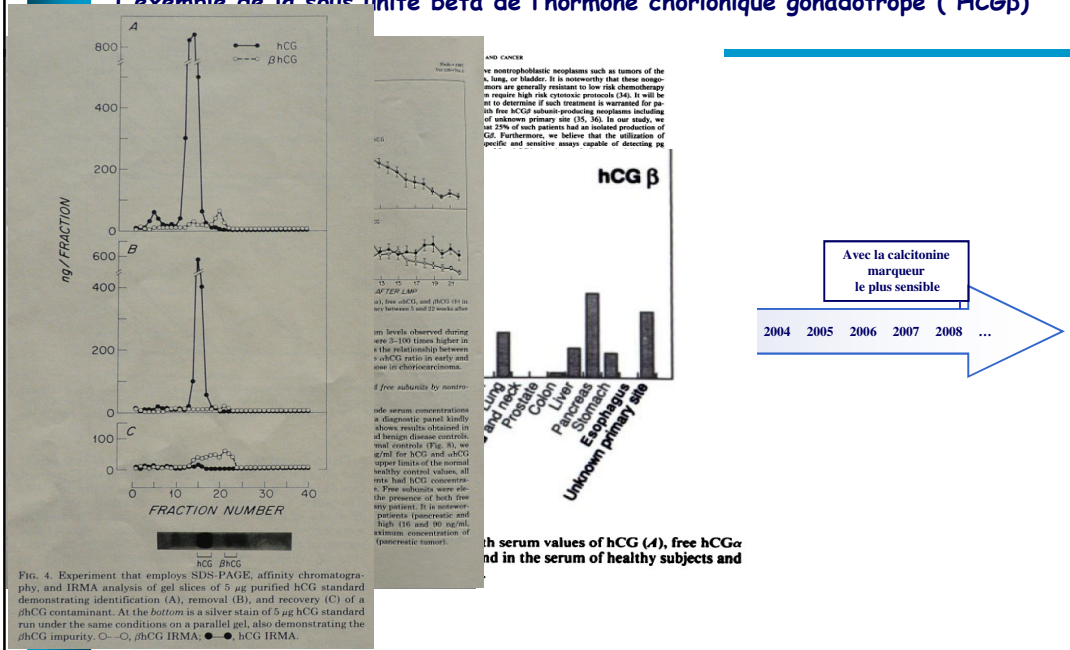
## Principe du dosage spécifique de la sous-unité bêta libre de l'hCG



- hormone Chorionique Gonadotrope (hCG) et Cancers
  - ▣ Valeur de référence < 10 mUI/mL ??
  - ▣ Indications : tumeurs trophoblastiques (testicule, placenta), tumeur germinale de l'ovaire
  - ▣ Élévation : grossesse uniquement
    - ↑ hCG marqueur spécifique de cancer ?
  - ▣ Diagnostic :
    - intérêt majeur : Cancer du Testicule (TGNS)
    - tumeurs placentaires (môle, choriocarcinome)

- hormone Chorionique Gonadotrope (hCG) et Cancers
  - ▣ Surveillance :
    - Testis**
      - ↗ en pré-op : valeur / type histologique (TGS / TGNS)
      - ↗ en post-op : évaluation de la réponse au traitement
      - ↗ détection précoce des récives
    - Placenta**
      - ↗ en pré-op : valeur / type histologique (chorio / site)
      - ↗ en post-op : évaluation de la réponse au traitement
      - ↗ détection précoce des récives
    - AdénoK**
      - ↗ hCG $\beta$  libre : valeur pronostique ?
      - (vessie, pancréas, poumon, ...)

De la recherche fondamentale aux applications cliniques:  
L'exemple de la sous-unité bêta de l'hormone chorionique gonadotrope ( HCG $\beta$ )




Marqueurs & Suivi Thérapeutique

• Antigène CarcinoEmbryonnaire (ACE) et Cancer Colo-Rectal.

- ▢ Dépistage : aucun intérêt
- ▢ Diagnostic : sensibilité > 70%, spécificité médiocre < 50%
- ▢ Surveillance :
  - en pré-op : référence pour le suivi (corrélation entre taux initial et survenue des récurrences)
  - en post-op : taux normal si résection complète
  - évaluation de la réponse au traitement
  - détection précoce des récurrences (> 3 mois)

- **CA 19.9 et Cancer du Pancréas**

- ▣ Glycoprotéine de type mucine (CA50, CA72.4, CA 195)
- ▣ Physiologiquement à la surface de nombreux épithélium (colon, estomac, endomètre, glandes salivaires,...)
- ▣ Déterminant antigénique répétitif (groupe sanguin Lewis<sup>a</sup>) 
- ▣ **Valeur de référence** < 37 U/mL
- ▣ **Élévations** non spécifiques
  - pathologies digestives (pancréatite, cholecystite) et pulmonaires bénignes
  - carcinomes (colo-rectal, estomac, ovaire : T. mucineuse, ...)
- ▣ **Indication** : cancer du pancréas.

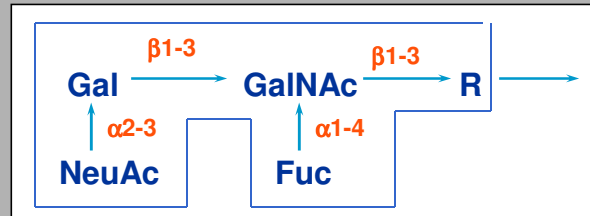
- La variabilité inter-individu





## Structure du CA 19-9 :

☐ Oligosaccharide (lacto-N-fucopentaose II sialylé) correspondant à la structure des substances de groupe Lewis.



☐ Les individus Lewis (a-b-) (7% des sujets) ne peuvent exprimer cet antigène (faux négatif).

## Marqueurs &amp; Suivi Thérapeutique

- CA 19.9 et Cancer du Pancréas

☐ **Dépistage** : aucun intérêt

☐ **Diagnostic initial** : non (peu spécifique ; digestif)

☐ **Surveillance** :

☐ bonne corrélation entre le taux initial et le pronostic


☐ évaluation de la réponse au traitement

☐ détection précoce des récives (?)

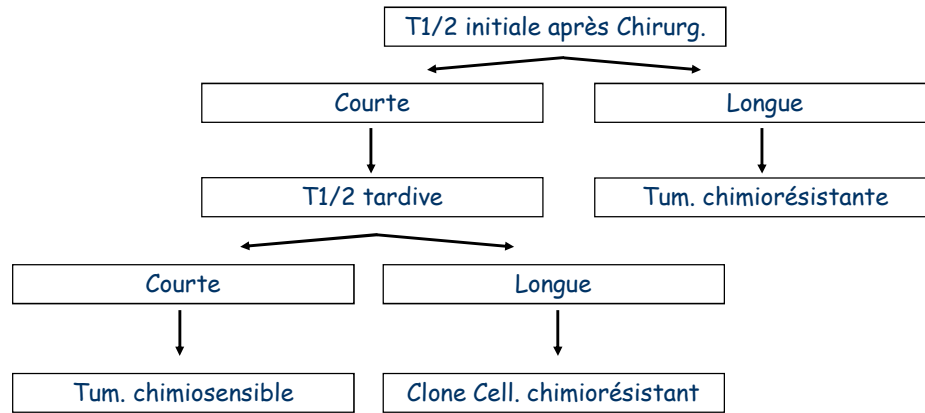
- **CA 125 et Cancer de l'Ovaire**

- ▣ Glycoprotéine de PM élevé (> 10<sup>6</sup> Daltons), « mucine like »
- ▣ Rôle physiologique : protéine de différenciation de l'épithélium cœlomique, catabolisme hépatique
- ▣ Défini par l'anticorps monoclonal : OC125 (Bast, 1981).
- ▣ **Valeur de référence** < 35 U/mL
- ▣ **Élévations non spécifiques**
  - ♀ grossesse (lait maternel), menstruation
  - ♀ pathologies des séreuses (ascite, péritonite, ...)
  - ♀ pathologies gynécologiques bénignes
  - ♀ cancers non ovariens (pancréas, poumon, ...)
- ▣ **Indication** : cancer **épithélial** de l'ovaire.

- **CA 125 et Cancer de l'Ovaire**

- ▣ **Dépistage** : intérêt non prouvé 
- ▣ **Diagnostic initial** : excellente sensibilité (75-80%) ; valeur > 200 U/mL
- ▣ **Surveillance** :
  - en post-op : bonne corrélation entre le taux et le reliquat tumoral. Valeur pronostique (1/2 vie < 20j)
  - laparotomie expl.: CA125 ↗ = reliquat tumoral mais CA125 normal ≠ absence de reliquat.
  - détection précoce des récidives (> 4 mois)

## Analyse cinétique de décroissance du CA 125



B. Coudert, JM. Riedinger CNBH 2007

*Clinical Chemistry* 48:8  
1147-1150 (2002)

Cancer Diagnostics:  
Overview

## Cancer Biomarkers:

KENNETH P.H. PRITZKER

*Clinical Chemistry* 48:8  
1147-1150 (2002)

Cancer Diagnostics:  
Overview

## Cancer Biomarkers: Easier Said Than Done

KENNETH P.H. PRITZKER

Biomarkers may be useful, both for assessing early and established neoplasia more precisely and for contributing data toward development of novel practical concepts regarding cancer biology.  
© 2002 American Association for Clinical Chemistry

Cancer biomarkers are firmly embedded clinically as essential diagnostic modalities to assess cancer. Human chorionic gonadotropin and  $\alpha$ -fetoprotein for germ cell tumors, monoclonal serum and urine electrophoretic peaks for myeloma, and prostate-specific antigen for prostate cancer represent only a few of the successful cancer biomarkers now used clinically.

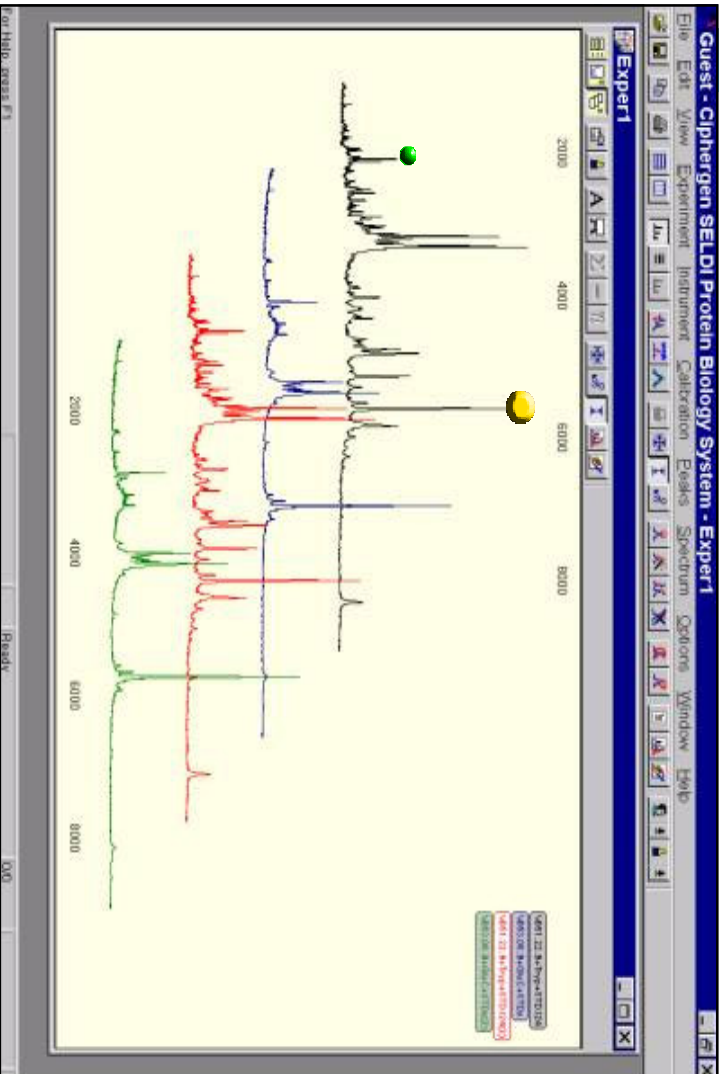
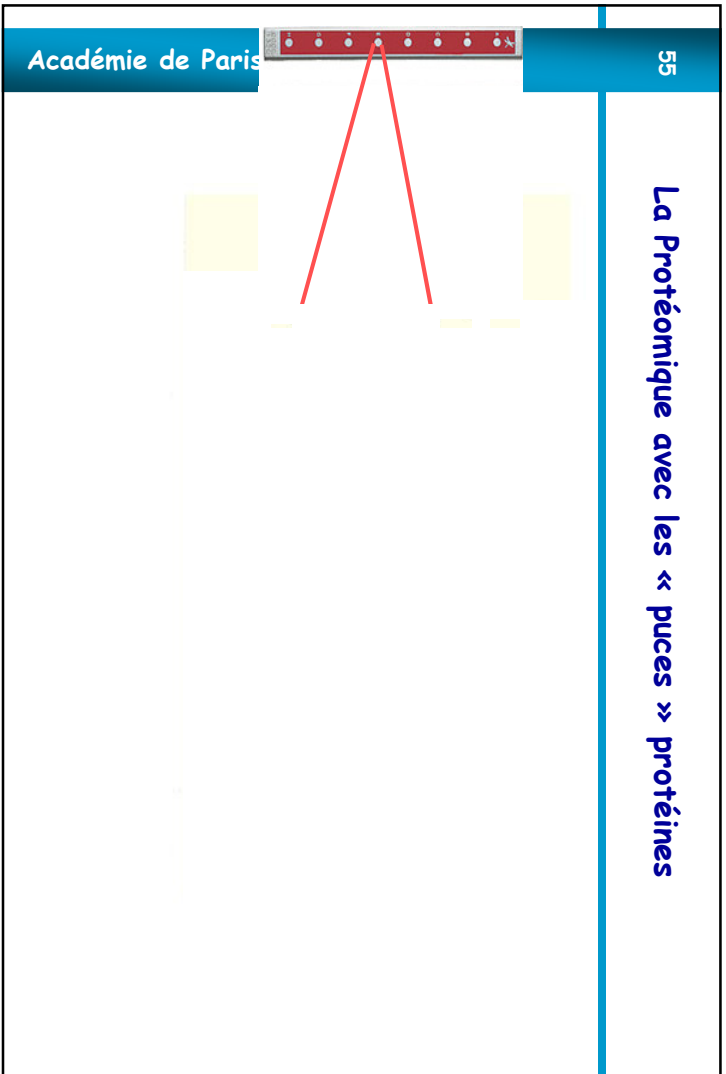
The explosion of research activity in cancer biomarkers over the past decade can be ascribed to the convergence of

currently available, that study describes patterns that discriminate tumor from non-tumor patients, independent of insight as to what aspect of disease the patterns represent. Given the peptide concentrations studied, it is possible that the patterns represent acute-phase reactants or other systemic features associated with disease generally, but not ovarian tumors specifically. It also remains to be determined whether these patterns can detect tumors in asymptomatic patients who are at risk for ovarian cancer. Exciting as these findings appear, there are many steps required for validation of this and other "high tech on spec" approaches to cancer biomarker technology.

Regulatory trends world-wide toward standard objective means to compare the therapeutic efficacy of new agents have generated the need not only to measure the efficacy of biomarkers, but have also created needs to have similar markers for early detection, disease natural history, and disease activity (7, 8). The requirement for biomarkers extends beyond cancer to many other disease states, particularly those diseases that progress over relatively long time periods (9, 10).

Social and market forces have questioned the cost and

Departments of Laboratory Medicine and Pathobiology and Surgery, University of Toronto, and Department of Pathology and Laboratory Medicine, Mount Sinai Hospital, Toronto, Ontario, M5G 1X5 Canada. Fax 416-586-8589; e-mail kpritzker@mbhs.utoronto.ca.  
Received February 21, 2002; accepted April 26, 2002.



## Reactivity of a Monoclonal Antibody with Human Ovarian Carcinoma

ROBERT C. BASI, JR., MARYELLEN FEENEY, HERBERT LAZARUS, LEE M. NADLER, ROBERT D. COLVIN, and ROBERT C. KNAPP, *Sidney Farber Cancer Institute, Brigham and Women's Hospital, Massachusetts General Hospital, and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115*

**ABSTRACT** A murine monoclonal antibody (OC125) has been developed that reacts with each of six epithelial ovarian carcinoma cell lines and with cryopreserved tumor tissue from 12 of 20 ovarian cancer patients. By contrast, the antibody does not bind to a variety of nonmalignant tissues, including adult and fetal ovary. OC125 reacts with only 1 of 14 cell lines derived from human neoplasms and has failed to react with cryostat sections from 12 nonovarian carcinomas.

### INTRODUCTION

Ovarian carcinoma cells exhibit distinct cell surface antigens that distinguish them from cells of normal adult tissues including ovary (1-7). Tumor-associated antigens (TAA)<sup>1</sup> have provided promising targets for immunodetection and immunotherapy of ovarian cancer in clinical studies and in animal models (8-11). Circulating TAA have been found in the blood of some ovarian cancer patients at a time when their tumors were still potentially curable by surgery alone (12). More advanced disease can respond dramatically to cytoreductive surgery and chemotherapy, but even following a complete clinical response the tumor generally recurs within 2-5 yr (13, 14). In this setting, immunotherapy might eliminate the relatively small number of tumor cells that remain after more conventional treatment. Clinical trials to date have used active immunotherapy with immunostimulants and tumor cell vaccines (15-19). Work in animal systems suggests, however, that ovarian carcinoma may be one of the tumors that will respond to treatment with antisera directed against TAA (8, 9, 11).

Received for publication 15 January 1981 and in revised form 3 June 1981.

<sup>1</sup>Abbreviations used in this paper: CEA, carcinoembryonic antigen; sIg<sup>+</sup>, surface immunoglobulin-positive; sIg<sup>-</sup>, surface immunoglobulin-negative; TAA, tumor-associated antigens.

In the past, heteroantisera against human TAA have usually required extensive absorption to remove activity against nonmalignant tissues. Absorbed antisera are often of low titer and specificity has varied between different preparations. With the development of somatic cell hybridization techniques, large quantities of high titered monoclonal antibody can now be produced that does not require absorption (20). Moreover, each hybridoma produces a chemically homogeneous immunoglobulin that permits the selection of antibodies of a particular functional subclass as well as of a unique specificity. During our earlier studies, conventional rabbit heteroantisera were prepared against human and murine ovarian carcinomas (7-9, 21). In our report a murine monoclonal IgG1 immunoglobulin has been developed with specificity for human ovarian carcinoma.

### METHODS

**Human Tissues.** Ascites fluid from patients with ovarian carcinoma was obtained at the time of therapeutic paracentesis; ovarian tumor tissue was obtained at surgery, and portions of nonmalignant tissue were obtained after surgical resection or at autopsy performed within 6-12 h of death, using protocols approved by the appropriate Human Protection Committee. Tumor cells were separated from leukocytes and erythrocytes in ascites fluid using discontinuous gradients of Ficoll-Hypaque or bovine serum albumin (21). Solid ovarian tumor and benign ovarian tissue were minced into 1-mm<sup>3</sup> fragments and dissociated enzymatically by incubating for periods of 1-24 h in 0.1% collagenase III (Worthington Biochemical Corp., Freehold, N. J.) in Hank's balanced salt solution (HBSS), pH 7.0. Ascites tumor cells and dissociated ovarian tissues were washed twice in Eagle's minimum essential medium (MEM, Grand Island Biological Co., Grand Island, N. Y.) and supplemented with 5% fetal bovine serum. Washed, dissociated cells were then cryopreserved in medium that contained 10% FBS and 10% dimethylsulfoxide and stored in liquid nitrogen.

For preparation of cryostat sections, small blocks of malignant or nonmalignant tissue were immersed in Tissu-Tek embedding medium (Lab-Tek Div., Miles Laboratories, Inc., Naperville, Ill.) and frozen with dichlorodifluoromethane

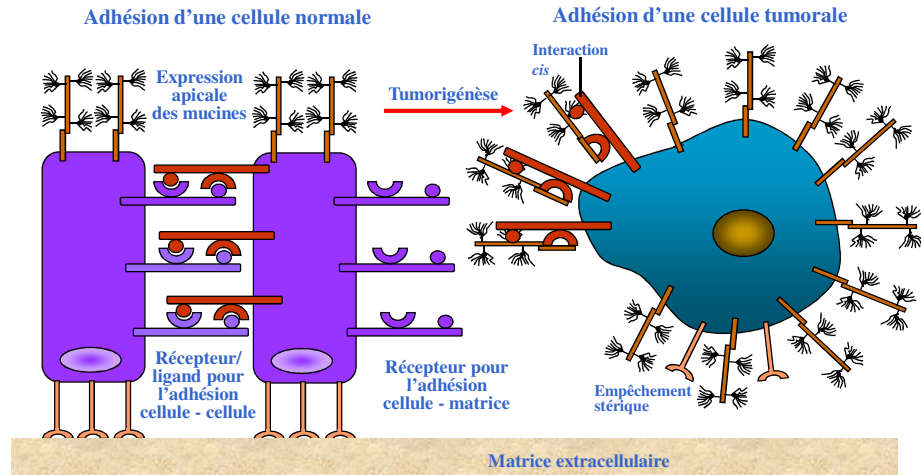
J. Clin. Invest. © The American Society for Clinical Investigation, Inc. • 0021-9738/81/11133107 \$1.00  
Volume 68 November 1981 1331-1337

1331

### • CA 15.3 et Cancer du Sein

- Glycoprotéine de PM élevé (> 4 10<sup>5</sup> Daltons)
- Epitope du produit du gène MUC1 (ch : 1q21-24).
- Décrit par Kufe et coll. (1984) et Hilkens et coll. (1985)
- Glycoprotéine de type mucine épithéliale et de masse moléculaire élevée (> 200KDa) dénommée PEM (Polymorphic Epithelial Mucin)
- Rôles au niveau de :
  - Adhésion cellulaire,
  - Immunosuppresseur
  - Réduction de la réaction inflammatoire

## Perte d'adhésion des cellules par les mucines associées à la membrane



D'après Nat. Rev. Cancer, 2004

## Marqueurs &amp; Suivi Thérapeutique

- CA 15.3 et Cancer du Sein

- ▣ Valeur de référence <: inférieures à 25 - 30 U/mL

- ▣ Élévations non spécifiques

- ⚡ augmentation du taux sérique dans 8 % des cas pathologies des séreuses (ascite, péritonite, ...)

- ⚡ pathologies bénignes mammaires, hépatiques, ovariennes (2 à 4 fois la normale)

- ⚡ cancers non mammaires (ovaire, poumon, foie, ...)

- Ovaire (64%)

- Poumon (35%)

- Tractus digestif (20 à 35%)


- ▣ Indication : cancer du sein métastatique.

## Le CA 15.3 et le dépistage

- ▣ Sa faible sensibilité, voisine de 15% tous stades confondus, implique l'absence de détection de 85% des cancers, en particulier les cancers de petits stades
- ▣ Le CA 15.3 ne doit pas être utilisé, même comme test complémentaire dans les campagnes de dépistage.

## Le CA 15.3 et le diagnostic

- ▣ Augmentation du CA 15-3 corrélée au stade de la maladie
  - Stade I : 9 %
  - Stade II : 19 %
  - Stade III : 28 %
  - Stade IV : 75 %
- ▣ Faible sensibilité dans le K du sein non métastatique (< 30 %)
- ▣ Aide au diagnostic : **Non**, sauf peut-être pour les métastases dont on souhaite déterminer l'origine :
  - Adénocarcinome de primitif inconnu
  - Patientes avec plusieurs cancers

- **Thyroglobuline (Tg) et Cancer de la Thyroïde**
  - ▣ Glycoprotéine de PM élevé ( $> 6 \cdot 10^5$  Daltons).
  - ▣ Isoformes en fonction de l'origine de sécrétion
  - ▣ **Valeur de référence euthyroïdien** :  $< 25$  ng/mL
  - ▣ Valeurs de surveillance CDT :  $< 0.9$  ng/ml 
  - ▣ **Indication** : cancer différencié de la thyroïde
  - ▣ **Diagnostic** : aide au diagnostic
  - ▣ **Surveillance** :
    - intérêt essentiel pour le suivi (sevrage ou rTSH)  
Détection des anticorps anti-Tg (faux négatif)
    - élévation précoce lors des récurrences

- **Cancer différencié de la thyroïde**
  - ▣ Thyroïdectomie
  - ▣ Traitement de substitution
- **Surveillance de la récurrence**
  - ▣ Surveillance de la Tg
    - Taux validé :  $< 0.9$  ng/ml
  - ▣ Sevrage
  - ▣ TSH recombinante



- Bonnes pratiques d'utilisation des marqueurs biologiques

- ↳ Toujours contrôler un résultat anormal (antériorité)
- ↳ Marqueur anormal  $\neq$  présence de tumeur (spécificité)
- ↳ Marqueur normal  $\neq$  absence de tumeur (sensibilité)

||  *Contexte clinique (diagnostic ou suivi)*

- ↳ Dosage avec la même technique (comparabilité)
- ↳ Pas de dosages simultanés de plusieurs marqueurs (exception : métastases sans primitif connu)

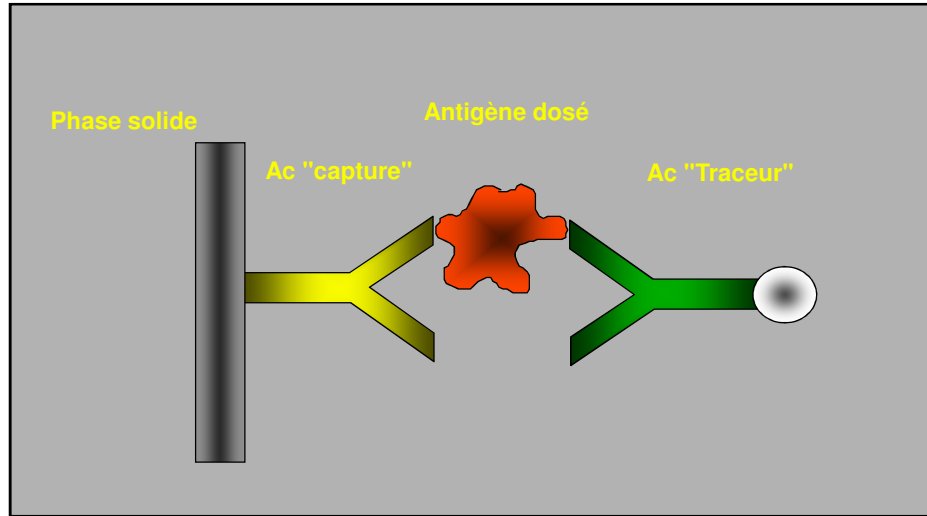
- Les interactions techniques



67

## Principe du dosage "Sandwich"

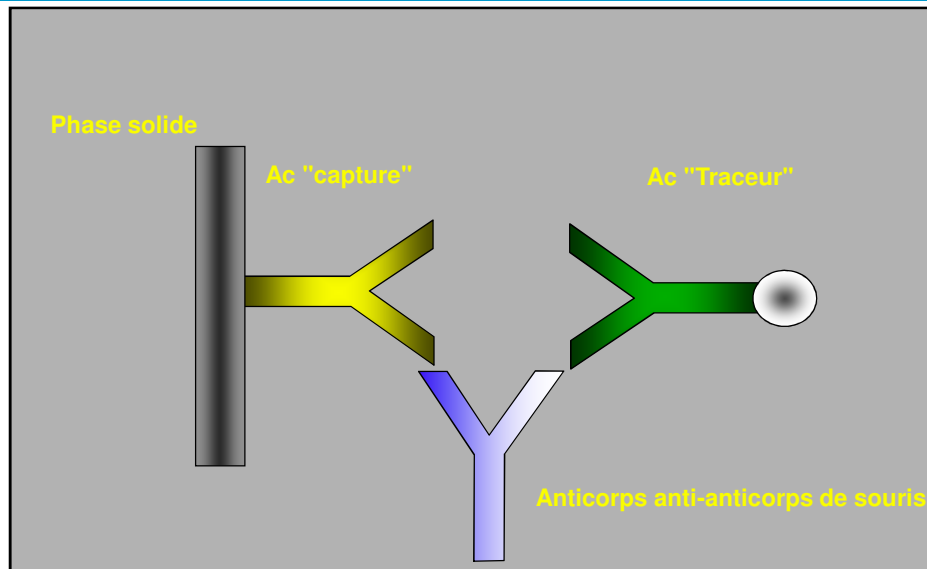
Académie de Paris - 4 Décembre



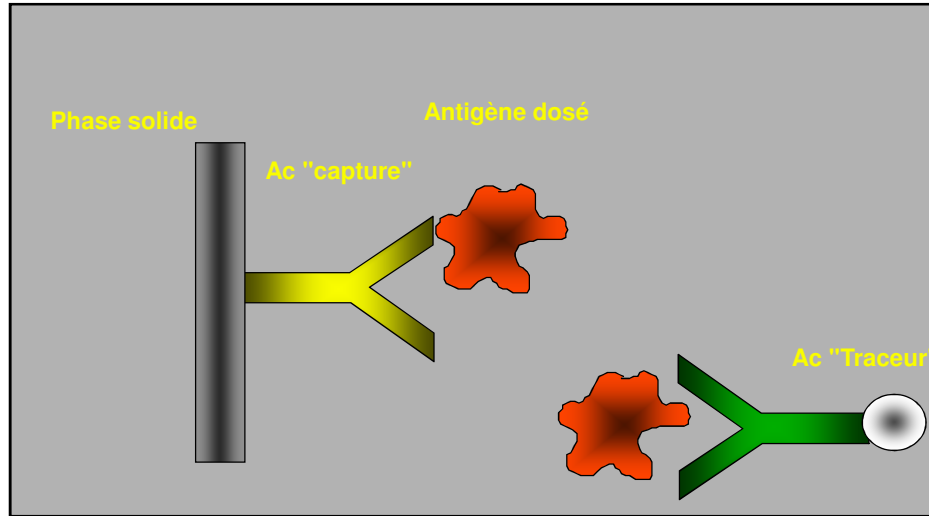
68

## Réaction « Faux-positif »

Académie de Paris - 4 Décembre



## Réaction « Faux-négatif »



## Utilisation Clinique des Marqueurs Biologiques

Institut Gustave-Roussy

Demande d'Examen : Marqueurs Biologiques\*

Etiquette d'identification

Prescripteur : .....  
Signature : .....

Date du Prélèvement : .....  
Examen(s) à effectuer le : .....

(\*) Cocher une case blanche ou grise

= Diagnostic et / ou surveillance  
 = Surveillance

(\*\*) Nature du prélèvement

● Serum (Bouchon rouge)  
● Urine de 24 H (Recueil sur acide)

	Colon Rectum	Estomac Pancréas	Foie	Sein	Ovaire	Utérus	Placenta	Testicule	Vessie	Prostate	Thyroïde (cellules C)	Thyroïde (différencielles)	Testicules (gonadotrophine)	Poumon (autres)	Phéochromocytome	Neuroblastome	Sans primitif connu
ACE																	
CA 19-9																	
AFP																	
CA 15-3																	
CA 125																	
hCG																	
hCGβ																	
PSA																	
Calcitonine																	
Thyroglobuline																	
NSE																	
Catécho-HVA/MA																	
Métanéphrines																	
SCC																	
Autre ***																	

(\*\*\*) Demandes de marqueurs dans d'autres localisations ou demandes d'autres marqueurs.

35 90 35 020 R

### ● L'association de différentes approches

- ▢ Marqueurs et TEP
- ▢ Nouveaux marqueurs avec les précurseurs



**Utilisation de la TEP-FDG dans les cancers du sein, de l'ovaire et de l'utérus  
Bulletin de synthèse de veille 2005**

## Rappel des conclusions initiales

La TEP-FDG semble être une technique non invasive performante pour le diagnostic de malignité des tumeurs mammaires supracentimétriques mais le risque de faux négatifs pour les tumeurs infracentimétriques est de l'ordre de 12 %.

Si la détection de la maladie microscopique reste actuellement impossible, la TEP-FDG apparaît comme l'une des rares techniques non invasives, capable de faire le bilan d'extension locorégionale et métastatique lors du bilan initial d'un cancer du sein. La TEP-FDG semble montrer des performances inférieures à la technique du ganglion sentinelle pour détecter la maladie microscopique ganglionnaire.

L'apport de la TEP-FDG s'appuyant sur une technique de haute spécificité semble plus intéressant dans les tumeurs invasives (T x N1 et T ≥ 2) pour améliorer le bilan de l'extension ganglionnaire et métastatique initial, guider le choix des thérapeutiques adjuvantes (radiothérapie des aires sus-claviculaires ou mammaires internes et/ou chimiothérapie) ou éviter une mastectomie inutile.

L'examen TEP-FDG semble globalement plus performant et au minimum complémentaire de l'imagerie conventionnelle pour la localisation précoce des sites de récurrences ou des métastases notamment en cas de suspicion de maladie occulte, voire même avant l'élévation des marqueurs. Les deux écueils principaux de cette technique sont la maladie microscopique notamment pulmonaire et les métastases osseuses ostéoblastiques. L'intérêt est qu'elle permet une exploration du corps entier.

L'impact de cette détection précoce sur le devenir à long terme des patientes reste à évaluer.

**L'association de la TEP-FDG et des marqueurs tumoraux semble permettre une détection précoce de la maladie occulte.**

**Methods:** Twenty-nine patients (mean age=61 years), initially treated for ovarian carcinoma (FIGO stage I  $n=2$ , stage II  $n=3$ , stage III  $n=21$  and stage IV  $n=3$ ), presenting with increased CA-125 (mean=160 IU/ml, range 33–1930), underwent subsequently a CT and a PET-CT scans. The recurrence was acknowledged by the referring physicians for all patients. The impact of PET-CT on patient's management was evaluated by comparing the therapeutic decision mentioned respectively on the pre and post PET-CT questionnaires filled in by the oncologists.

**Results:** The CT scan was positive in 22/29 patients (76%) and negative in 7/29 patients (24%). The PET-CT scan was positive in 27/29 patients (93%) and negative in 2/29 (7%) patients. Five out of the seven patients with a negative CT scan had a positive PET-CT scan. In comparison to CT scan alone, the PET-CT scan modified the disease distribution for 16 patients (55%,  $p<0.001$ ) in the following ways: more advanced disease ( $n=11$ ), more limited disease ( $n=4$ ), and different localizations ( $n=1$ ). The assessment of pre and post PET-CT questionnaires showed a statistically significant change in the decision making for 10 patients (34%,  $p<0.0001$ ).

**Conclusion:** This questionnaire-based study showed that PET-CT imaging allows a better restaging than CT and induces a change in clinical management in over one third of patients with suspected ovarian carcinoma recurrence on increased CA-125.

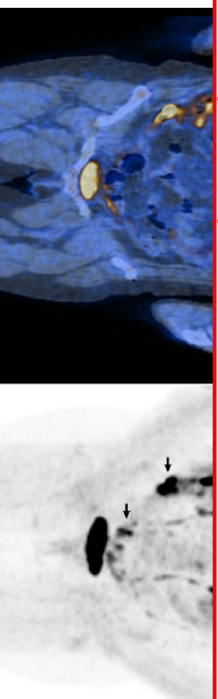


Fig. 1. 54-year-old patient treated 2 years ago for an ovarian carcinoma stage III FIGO by total abdominal hysterectomy and bilateral salpingoophorectomy, presenting with an increased CA-125 level (46 IU/ml) and a negative CT scan. MIP (Maximum Intensity Projection, B) and PET-CT fused images (A) showed multiple increased FDG uptake foci in the peritoneal cavity. **The therapeutic plan was changed from a "wait and see" attitude to chemotherapy.**

## Des incertitudes dans le diagnostic biologique

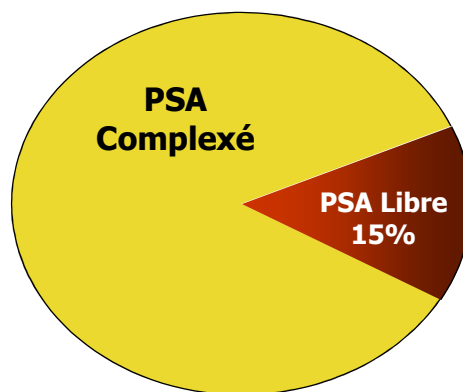
- L'élévation du PSA ne discrimine pas l'HBP du cancer.
- Le % de PSA Libre améliore la distinction entre HBP et cancer dans la zone de 4 à 10 ng/ml

⇒ Les enjeux pour une amélioration

- ▣ Détecter précocement et spécifiquement le cancer vs HBP;
- ▣ Définir l'agressivité de la pathologie cancéreuse
- ▣ Diminuer le nombre des biopsies inutiles.

**Recherche de nouveaux marqueurs biologiques ?  
Les isoformes de PSA ?**

## Le PSA libre - définition

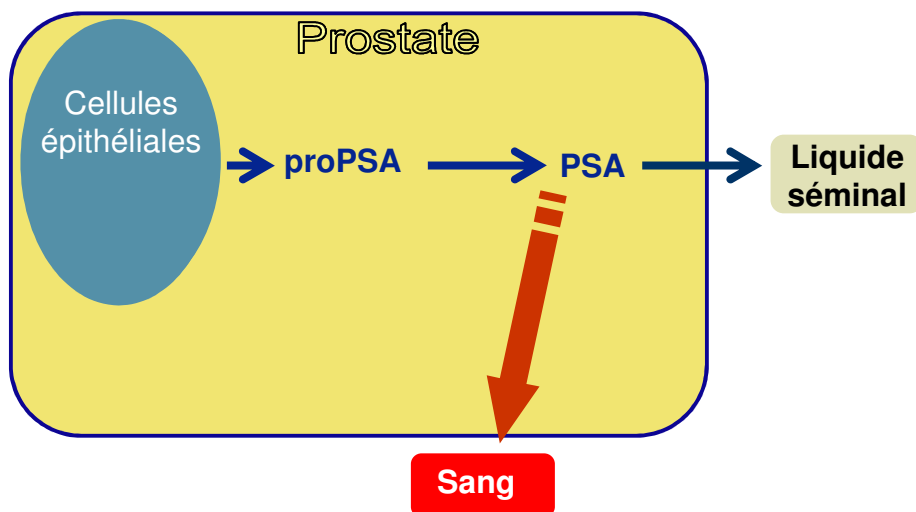


- ▣ Enzyme inactive
- ▣ Ne se complexe pas avec l'ACT
- ▣ % faible en cas de cancer
- ▣ % élevé en cas d' HBP

## Les "pistes" de recherche

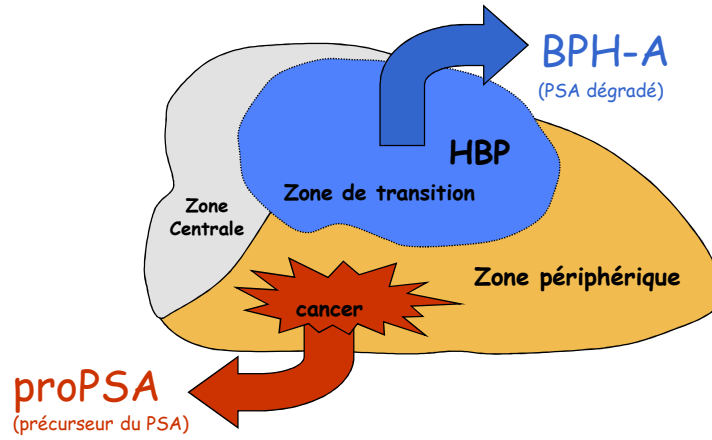
- Quelles sont les formes circulantes de PSA Libre ?
- Existe-t-il une adéquation entre les formes de PSA Libre et les pathologies prostatiques ?
- Les formes circulantes de PSA Libre peuvent-elles aider au diagnostic différentiel ?

## Les formes de PSA Libre et l'état pathologique

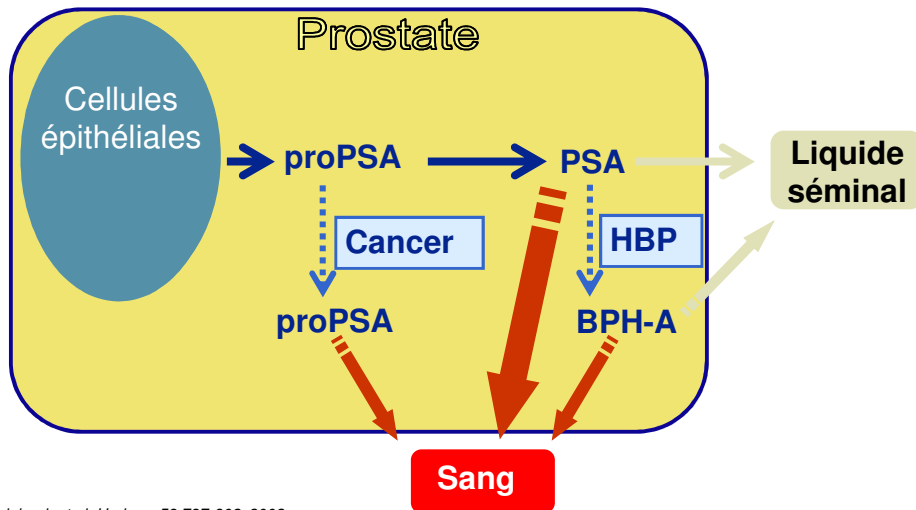


Mikolajczyk et al, Urology, 59,797-802, 2002

Les formes de PSA Libre et l'état pathologique



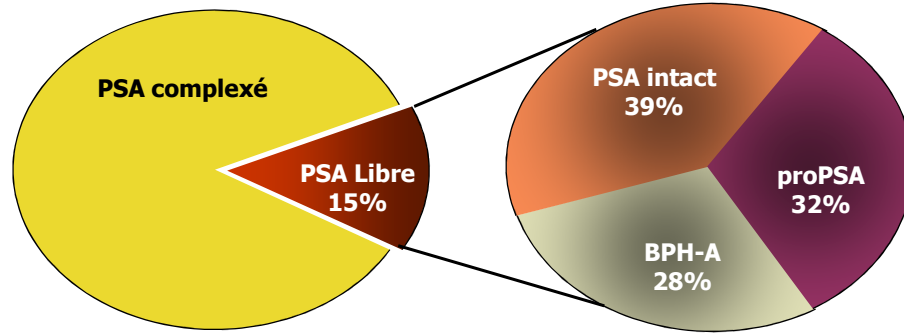
Les formes de PSA Libre et l'état pathologique



Mikolajczyk et al, Urology, 59,797-802, 2002



## Multiples formes de PSA Libre



*Mikolajczyk et al; AACC Poster 2005*