

Année 2021

N°: MM0482021

MEMOIRE DE MASTER

MASTER DE « **Biotechnologie médicale** »

OPTION: « **Biomédicale** »

Intitulé

Etude moléculaire et bio-informatique des mutations germinales des gènes *BRCA1* et *BRCA2* chez des patientes atteintes du cancer du sein héréditaire

Soutenu par :

Ilham ZARGUAN

Devant le jury composé de :

Pr. OUADGHIRI Mouna

Pr. BENNIS Sanae

Pr. BOUGUENOUCHE Laila

Pr. AANNIZ Tarik

Faculté de Médecine et de Pharmacie, Rabat

Faculté de Médecine et de Pharmacie, CHU Fès

Faculté de Médecine et de Pharmacie, CHU Fès

Faculté de Médecine et de Pharmacie, Rabat

Présidente du jury

Encadrante

Examinatrice

Examineur



Avant-propos

Ce travail a été réalisé dans le cadre du projet de fin d'études pour l'obtention du diplôme de Master en ***Biotechnologie médicale*** sous la direction de Mme BENNIS SANAË Professeur de l'Enseignement Supérieur à la Faculté de Médecine de Fès et Membre du Laboratoire d'anatomopathologie et de pathologie tumorale au CHU Hassan II de Fès et Mme BOUGUENOUCHE LAILA, Professeur à la faculté de Médecine de Fès et Médecin à l'unité de génétique médicale et oncogénétique.

Résumé

Le cancer du sein est connu partout comme le cancer le plus fréquent chez les femmes. Nous nous sommes focalisés dans cette étude sur les gènes *BRCA1* et *BRCA2* qui sont les deux gènes de susceptibilité les plus considérées et ils expliquent une proportion importante des cancers du sein héréditaires. L'identification des mutations fondatrices du *BRCA* est cruciale pour mettre en place des tests génétiques abordables et rentables. En Afrique du Nord, plusieurs mutations de *BRCA1/2* ont été identifiées et de nombreuses variantes de séquence ont été rapportées, cependant ces derniers ne conduisent pas systématiquement à une prédisposition au cancer. Sur ce projet, nous avons combiné entre les deux approches '*wet and dry lab*'; L'approche '*Wet lab*' pour laboratoire humide, ou laboratoire expérimental, sur laquelle nous avons séquencé les régions hotspots des gènes *BRCA1* (exons 2 et 10) et *BRCA2* (exons 10 et 11) chez 21 patientes, et l'approche '*dry lab*' ou laboratoire à sec, référente aux techniques bio-informatiques qui nous a permis d'analyser et exploiter les résultats obtenus afin de conclure l'impact structurel et fonctionnel de ces variants sur les deux gènes et son implication sur les mécanismes cellulaires. Pour *BRCA1* les mutations les plus fréquentes dans notre population ont été : la substitution 2614 du C>T et 2612 A>T avec un pourcentage de **82%**, une substitution 2081 G>A (fréquence de 13,40%) dont la signification pathologique est incertaine sur *ClinVar* et *BRCA exchange* et l'ensemble de ces polymorphismes sont positionnés au niveau du domaine *BRCT* (*BRCA1* C-Terminus), nous avons pu également prédire les modèles de la structure 3D de la protéine *BRCA1* en utilisant *I-TASSER*. Or, pour *BRCA2* les mutations les plus fréquentes dans notre population avaient un pourcentage de **87%** (3807T>C et 3396A>G). Les 4 variants non significatifs retrouvés au niveau de ce gène avaient une fréquence de **43%** pour la substitution T>C 7841, et 21% pour 3199A>G, 9340A>G, 3167A>G, avec la même fréquence pour l'allèle bénin (2971A>G). Les variants détectés sont positionnés dans les extrémités des domaines du gène *BRCA2*, avec une structure de type '*coil*'. *SWISS-MODEL* à son tour, a permis de prédire la structure tridimensionnelle de la protéine *BRCA2* où nous avons remarqué que la substitution de 5 acides aminés (N372H, S384F, G637L, C1151T, A1114C) dans les exons 10 et 11 a altéré le repliement de la protéine *BRCA2*. Finalement nous avons conclu que l'adoption de l'usage d'un séquenceur de nouvelle génération (NGS) est nécessaire afin d'évaluer correctement le statut mutationnel dans le cancer du sein et détecter les mutations des gènes dans plusieurs exons simultanément ainsi que leurs impacts sur les protéines traduites.

Abstract

Breast cancer is known worldwide as the most common cancer in women. In this study, we focused on the *BRCA1* and *BRCA2* genes which are the two most widely considered susceptibility genes and they explain a significant proportion of hereditary breast cancers. The identification of *BRCA* founder mutations is crucial for affordable and cost-effective genetic testing. In North Africa, several *BRCA1/2* mutations have been identified. Thus, many *BRCA* sequence variants have been reported, not all variants lead to cancer predisposition. In this study, we combined two approaches; The 'wet lab' approach, or experimental laboratory, on which we sequenced the hotspot regions of the *BRCA1* (exons 2,10) and *BRCA2* (exons10,11) genes in 21 patients, and the 'dry lab' approach, referring to bioinformatics techniques that allowed us to analyze and exploit the results obtained in order to conclude the structural and functional impact of these variants on the two genes and its application in the cellular mechanisms. For *BRCA1* the most frequent mutations in our population were: the substitution 2614 C>T and 2612 A>T with a percentage of 82%, a substitution 2081 G>A (with a frequency of 13.40%) whose pathological significance is uncertain on *ClinVar* and *BRCA exchange* and all these polymorphisms are positioned at the level of the *BRCT* domain (BRCA1 C-Terminus), we were also able to predict the patterns of the 3D structure of the BRCA1 protein using I-TASSER. For *BRCA2*, the most frequent mutations in our population had a percentage of 87% (3807T>C and 3396A>G). The 4 non-significant variants found in this gene had a frequency of 43% for the 7841 T>C substitution, and 21% for 3199A>G, 9340A>G, 3167A>G, with the same frequency for the benign allele (2971A>G), the detected variants are positioned in the extremities of the *BRCA2* gene domains, all of which have a coil-like structure. Finally, using *SWISS-MODEL*, we concluded that the substitution of 5 amino acids (N372H, S384F, G637L, C1151T, A1114C) in exons 10 and 11 altered the folding of the BRCA2 protein. Finally, we concluded that the adoption of the use of a new generation sequencer is necessary to properly assess the mutational status in breast cancer and to detect gene mutations in several exons simultaneously as well as their impact on the translated proteins.

ملخص

يُعرف سرطان الثدي في جميع أنحاء العالم بأنه أكثر أنواع السرطانات شيوعًا بين النساء. في هذه الدراسة، ركزنا على جينات *BRCA1* و *BRCA2* و هما أكثر الجينات قابلية للإصابة بالاعتبار على نطاق واسع وهما يفسران نسبة كبيرة من سرطانات الثدي الوراثية. يعد تحديد الطفرات المؤسس في سرطان الثدي *BRCA* أمرًا بالغ الأهمية لإجراء اختبارات جينية فعالة و ميسورة من حيث التكلفة. في شمال إفريقيا، تم تحديد العديد من طفرات *BRCA1 / 2* وتم الإبلاغ عن العديد من المتغيرات التسلسلية، ولكنها لا تؤدي بشكل منهجي إلى الاستعداد للإصابة بالسرطان.

في هذا المشروع، قمنا بدمج نهج المختبر الرطب والجاف؛ نهج 'المعمل الرطب\ wet lab' ، أو المختبر التجريبي، والذي قمنا فيه بتسلسل مناطق النقاط الهامة لجينات *BRCA1* (2 exons و 10) و *BRCA2* (10 exons و 11) عند 21 مريضًا، و'نهج المختبر الجاف\ dry lab'، الذي يشير إلى تقنيات المعلوماتيات الحيوية التي سمحت لنا بتحليل واستغلال النتائج التي تم الحصول عليها من أجل استنتاج التأثير الهيكلي والوظيفي لهذه المتغيرات على الجينين وتأثيره على الآليات الخلوية. بالنسبة لـ *BRCA1* ، كانت الطفرات الأكثر شيوعًا في مجتمعنا هي: الاستبدال 2614 لـ T < C و 2612 T < A بنسبة 82 % ، استبدال 2081 A < G (تردد 13.40 %) التي تكون أهميتها المرضية غير مؤكدة في ClinVar وتبادل *BRCA* وجميع هذه الأشكال المتعددة يتم وضعها على مستوى مجال BRCT (BRCA1 C-Terminus) ، وتمكننا أيضًا من التنبؤ بنماذج الهيكل ثلاثي الأبعاد لبروتين *BRCA1* باستخدام I-TASSER. ومع ذلك ، بالنسبة لـ *BRCA2* ، فإن الطفرات الأكثر شيوعًا في مجتمعنا كانت بنسبة 87 % (C < T3807 و G < A3396). المتغيرات الأربعة غير الهامة الموجودة في هذا الجين لها تردد 43% للاستبدال C < T 7841 ، و 21% لـ G < A3199 ، G < A9340 ، G < A3167 ، مع نفس التردد للأليل الحميد (G < A 2971). المتغيرات المكتشفة متموضعة في نهايات نطاقات الجين *BRCA2* ، ببنية من النوع "الملفوف\coil".

تنبأ SWISS-MODEL أيضًا بالبنية ثلاثية الأبعاد لبروتين *BRCA2* حيث لاحظنا أن استبدال خمس أحماض أمينية (N372H ، S384F ، G637L ، C1151T ، A1114C) في 10 exons و 11 يغير قابلية طي بروتين *BRCA2*. أخيرًا ، استنتجنا أن اعتماد استخدام مُسلسل الجيل الجديد (NGS) ضروري لتقييم الحالة الطفرية في سرطان الثدي بشكل صحيح واكتشاف طفرات الجينات في عدة أجزاء في وقت واحد بالإضافة إلى تأثيرها على البروتينات المترجمة.

Table des matières

Liste des figures.....	8
Liste des tableaux.....	9
Liste des abréviations.....	10
Dédicace	11
Remerciements.....	12
Revue bibliographique	13
I. LE CANCER.....	14
Généralités sur le cancer	14
II. LE CANCER DU SEIN	16
1. ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DU SEIN NORMAL.....	16
2. LÉSIONS ET MALADIES BÉNIGNES DU SEIN.....	17

3. LE CANCER DU SEIN	18
3.1. ÉPIDÉMIOLOGIE DESCRIPTIVE DU CANCER DU SEIN.....	19
a. Dans le monde.....	19
b. En Afrique du Nord.....	20
3.2. FACTEURS DE RISQUE.....	21
3.2.1. Facteurs liés aux hormones.....	21
3.2.2. Autres facteurs de risques.....	23
3.3. CANCERS SPORADIQUES ET HEREDITAIRE.....	24
3.4. DIAGNOSTIC HISTOLOGIQUE ET CLASSIFICATION	25
HISTOMOLECULAIRE DU CANCER.....	
3.4.1. Classification histologique des cancers du sein.....	25
3.4.2. Classification moléculaire	27
III. LE CANCER DU SEIN HEREDITAIRE.....	28
1. MODE DE TRANSMISSION.....	28
2. Les cancers du sein associés à une mutation de <i>BRCA1</i>	29
2.1. Le gène <i>BRCA1</i>	29
2.2. La protéine <i>BRCA1</i> : fonctions biologiques.....	30
2.3. La protéine <i>BRCA1</i> : Structure secondaire et interactions:	31
2.4. Mutation de <i>BRCA1</i>	32
3. Les cancers du sein associés à une mutation de <i>BRCA2</i>	33
3.1. Le gène <i>BRCA2</i>	33
3.2. La protéine <i>BRCA2</i> : Rôle, structure secondaire et interactions.....	33
3.3. Mutation de <i>BRCA2</i>	34
4. Syndrome de Cowden.....	35
4.1. Le gène <i>PTEN</i>	35
4.2. Mutation de <i>PTEN</i>	35
5. Syndrome de Li-Fraumeni.....	35
5.1. Le gène <i>TP53</i>	35
5.2. Mutation de <i>TP53</i>	36
IV. Rôle de la biologie moléculaire dans le pronostic et la prise en charge du cancer de sein.....	36
Matériel et méthodes	39
I. Extraction de l'ADN génomique.....	41
II. Dosage : Méthode de quantification et qualification de l'ADN.....	42
1. Dosage par spectrophotométrie : NanoDrop®.....	42
2. Dosage par fluorimétrie : Qubit.....	43
III. PCR : Technique d'amplification en chaîne par polymérase.....	43
1. DreamTaq Green PCR Master Mix.....	46
2. Invitrogen™ Platinum™ Taq DNA Polymerase.....	46
IV. Electrophorèse sur gel d'agarose : Analyse de l'ADN amplifié	48
V. Séquençage par Sanger : Applied Biosystems (3500 Series Genetic Analyzer).....	49
VI. Analyse bio-informatique des séquences.....	53
1. Alignement.....	53
2. Recherche de la mutation dans la littérature.....	53
3. Traduction et alignement de la protéine.....	53
4. Modélisation de la structure 2D de la protéine.....	54
5. Modélisation de la structure 3D de la protéine	54
Résultats et discussion.....	55
1. Epidémiologie descriptive des patientes étudiées.....	56
2. Séquençage des produits PCR purifiés des deux gènes <i>BRCA1</i> et <i>BRCA2</i>	57

3. La structure 2D des protéines BRCA1 et BRCA2.....	62
4. La structure 3D de la protéine BRCA1.....	68
5. La structure 3D de la protéine BRCA2	70
Conclusion et perspectives	73
Liste des références	75
Annexe1.....	81
Annexe2.....	81

Liste des figures

Figure 1:	Nombre de (A) nouveaux cas et (B) décès estimé dans le monde en 2020 chez les deux sexes, tous âges.	15
Figure 2:	Anatomie du sein humain normal.	16
Figure 3:	Le spectre d'invasion du cancer du sein.	18
Figure 4:	Pourcentage de tous les nouveaux cas (1) et les cas de décès (2) par cancer estimés en 2020 chez les femmes.	19
Figure 5:	Les caractéristiques des cancers sporadiques et héréditaire.	24
Figure 6:	Pourcentage des cancers sporadiques par rapport aux cancers héréditaires.	24
Figure 7:	Représentation schématique d'un carcinome canalaire in situ	25
Figure 8:	Représentation schématique d'un cancer canalaire (A) et lobulaire (B) infiltrant.	26
Figure 9:	Proportion des gènes de prédisposition au cancer du sein héréditaire.	29
Figure 10 :	Localisation du gène <i>BRCA1</i> sur le chromosome.	29
Figure 11:	Caractéristiques des protéines BRCA1 humaines.	32
Figure 12:	Localisation du gène <i>BRCA2</i> sur le chromosome.	33
Figure 13:	Caractéristiques des protéines BRCA2 humaines.	33
Figure 14:	Localisation du gène <i>PTEN</i> sur le chromosome.	35
Figure 15:	Localisation du gène <i>TP53</i> sur le chromosome	36
Figure 16:	Protocole traditionnel d'extraction de l'ADN génomique à partir de sang à l'aide du kit PureLink™.	42
Figure 17:	Protocole du dosage d'ADN sur Qubit Fluorometer.	43
Figure 18:	Dispositif de migration pour l'électrophorèse de l'ADN.	48
Figure 19:	Les étapes du séquençage par Sanger.	49
Figure 20:	Le processus automatisé du séquençage de l'ADN par Sanger.	50
Figure 21:	Mécanisme de la fluorescence par la technique du transfert d'énergie par résonance.	51
Figure 22:	Age des patientes au diagnostic	56
Figure 23:	Fréquences alléliques des variants BRCA1	60
Figure 24:	Fréquences alléliques des variants BRCA2	61
Figure 25:	Éléments de structure secondaire prédits par résidu de l'exon 10 du gène <i>BRCA1</i> chez la patiente 16.	63
Figure 26:	Diaphragme de domaine du gène <i>BRCA1</i> (Modélisation de la structure secondaire par PDBsum).	64
Figure 27:	Annotation de la séquence protéique des exons 10 et 11 du gène <i>BRCA2</i> chez la patiente 9 par PSIPRED	65
Figure 28:	La structure 2D de la protéine BRCA2 (ID PBD : A1N0).	66
Figure 29:	Modèle de la structure 3D du domaine BRCT de BRCA1 en liaison avec Acétyl-CoA carboxylase 1 par DISCOVERY STUDIO	68
Figure 30:	Les résultats de prédiction de la structure 3D de BRCA1 par Robetta.	69
Figure 31:	Qualification des modèles Robetta pas SAVES.	69
Figure 32:	Les résultats de prédiction de la structure 3D de BRCA1 par ALPHAFOLD2.	69
Figure 33:	Les modèles prédits de la structure 3D de BRCA1 par I-TASSER.	70
Figure 34:	La structure 3D de la protéine sauvage (En gauche), et la structure en violet est le model 3D prédit à partir des données de la patiente 9.	71
Figure 35:	Comparaison Structure-Structure par swiss-model.	72

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Incidences ajustées apparaissant sur les registres d’Afrique du Nord (2008).	20
Tableau 2 :	Facteurs de risque modifiant le risque de développer un cancer du sein	23
Tableau 3 :	Les critères du grade et leurs notes attribuées.	27
Tableau 4 :	Caractéristiques moléculaires des différents sous-types de cancer du sein	28
Tableau 5:	Données cliniques des patientes recrutées pour cette étude.	40
Tableau 6 :	Amorces utilisées pour la mise en évidence des mutations des gènes <i>BRCA1</i> et <i>BRCA2</i> .	44
Tableau 7:	Composition du milieu réactionnel pour la détection des mutations.	46
Tableau 8:	Composition du milieu réactionnel pour la détection des mutations.	47
Tableau 9 :	Condition d’amplification du gène pour les différentes amorces	48
Tableau 10 :	Spectre d’émission des dichloroRhodamines spécifiques de chaque type de ddNTP.	51
Tableau 11 :	Composition du mix de PCR de séquence	52
Tableau 12:	Programmation de la PCR de séquence.	52
Tableau 13 :	Résultats du séquençage.	57
Tableau 14:	Les variants trouvés dans le gène <i>BRCA1</i> .	60
Tableau 15 :	Les variants trouvés dans le gène <i>BRCA2</i> .	61
Tableau 16:	Les propriétés chimiques des acides aminés originales et substituées chez la patiente16 (<i>BRCA1</i>).	67
Tableau 17 :	Les propriétés chimiques des acides aminés originales et substituées chez la patiente9 (<i>BRCA2</i>)	67

LISTE DES ABREVIATIONS

Aa	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
A.N.	Acide nucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARN_m	ARN messenger
BET	Bromure d'Ethidium
BRCA	breast cancer gène
BRC / BRCT	BRCA1 C-terminal
CIRC	Centre international de recherche sur le cancer
dNTP	Deoxynucleotide
EDTA	Éthylène Diamine Tétra-Acétique
ER	Récepteurs aux œstrogènes
Kb	Kilo base
NCI	National Cancer Institute
NGS	Next generation sequencing
OMS	l'Organisation Mondiale de Santé
P	Patient
Pb	paire de base
PCR	Polymerase Chain Reaction
PR	Récepteurs aux progestérones
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
RAD50	RADIation sensitive 50
RAD51	RADIation sensitive 51
RH	Recombinaison Homologue
SCC	Société canadienne du cancer
Ta	température d'hybridation
TBE	Tris borate EDTA
Tm	Température de demi-dénaturation
TP53	Tumor protein p53
UV	UltraViolet



Dédicace

A mes parents et mes beaux-parents

Aucune dédicace ne pourrait exprimer la profondeur des sentiments que j'éprouve pour vous. Vos sacrifices, vos prières, vos soutiens aussi bien moral que matériel, vos encouragements et vos aides précieux ne cessent de m'impressionner. Que dieu tout puissant vous protège et vous procure santé et longue vie.

A mon cher mari

A celui que j'aime beaucoup, l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, et qui m'a soutenue tout au long de ce projet.

Vous aviez toujours cru en moi, et c'est dans votre présence que j'ai puisé la volonté de continuer. Je vous adore.

A mes très chers amis et étudiants Master Biotechnologie médicale ...

Pour les merveilleux moments passés ensemble,

notre travail et nos sorties.

Je vous aime énormément.

A toute ma famille

A tous mes enseignants

A tous ceux qui m'aiment

A tous ceux que j'aime

A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin

Je vous dédie cet humble travail.



Remerciement

Premièrement nous remercions Dieu source de toute connaissance...

J' exprime ma profonde gratitude à **Monsieur le Doyen** de la Faculté de médecine et de pharmacie de Rabat et je serais vaniteuse si je me devais énumérer en quelques lignes les qualités humaines et professionnelles de tous les enseignants responsables de la formation du master **Biotechnologie médical**, ainsi que les membres du laboratoire **MedBiotech** sous la direction de **Mr. le PROFESSEUR AZEDDINE IBRAHIMI** pour avoir assuré le suivi de la formation. Trouvez dans ce travail ma gratitude pour tout votre savoir-faire qui m'a guidée dans mon travail.

*A*u terme de ce travail, il m'est particulièrement agréable d'exprimer ma reconnaissance, mon respect et mes vifs remerciements à **Mme. LE PROFESSEUR BENNIS Sanae**, pour son encadrement pédagogique très consistant ainsi que pour l'intérêt avec lequel elle a suivi la progression de mon travail, pour ses conseils efficaces, ses judicieuses directives. Ce travail est le fruit de sa rigueur scientifique, ses orientations et son talent pédagogique. Je ne s'aurais exprimé ma reconnaissance, certes, car votre bonté est indescriptible.

*M*a gratitude s'adresse également à **Mme. LE PROFESSEUR BOUGUENOUCHE LAILA** pour m'avoir donnée l'opportunité de passer ce stage dans les meilleures conditions de professionnalisme, matérielles et morales, et pour ses directives à chaque fois qu'elle était sollicitée. J'ai eu le grand plaisir de bénéficier de votre grande compétence scientifique.

J' adresse mes plus vifs remerciements à **Mme LE PROFESSEUR OUADGHIRI Mouna** et **Mr. Le PROFESSEUR AANNIZ Tarik**. Que vous acceptiez de siéger parmi cet honorable jury est pour moi un grand honneur. Je vous remercie pour la haute qualité de votre enseignement, votre disponibilité et votre dévouement.



Etude bibliographique

I. LE CANCER

GÉNÉRALITÉS SUR LE CANCER

Le cancer constitue dans le monde un fléau global et un problème majeur de santé publique du fait de son fort taux de mortalité et surtout du coût exorbitant et des pertes économiques colossales engendrées en termes de décès prématurés et d'années de vie perdues. Les données mondiales publiées par le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) estiment à 18,1 millions les nouveaux cas et 9,6 millions les décès par cancer en 2018. Environ un décès sur 6 dans le monde est dû au cancer. Parmi ces décès, 70% surviennent dans les pays à revenu faible ou intermédiaire. Le CIRC estime le taux de mortalité par cancer au Maroc à 86,9 par 100 000. [2] (Plus de détails sur la figure 1)

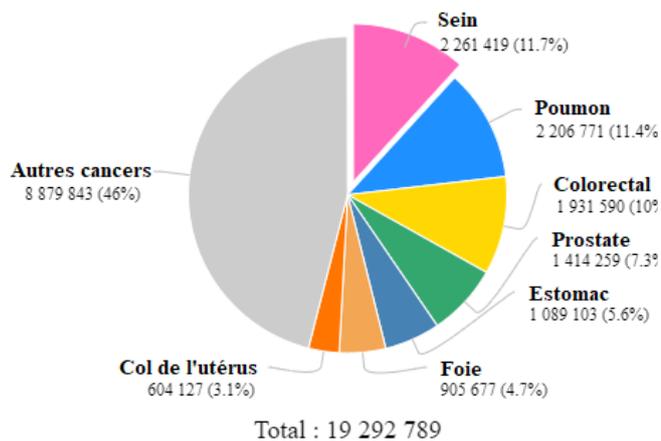
Selon le PLAN NATIONAL DU CANCER DE PRÉVENTION ET DE CONTRÔLE au Maroc, le nombre estimé de nouveaux cas de cancer par année avoisine les 50 000 nouveaux cas ; malgré les importants efforts consentis ces dernières années, la mortalité reste importante, les tumeurs seraient la 2ème cause de décès au Maroc avec 13.4% des décès, après les maladies de l'appareil cardiovasculaire. Un homme sur cinq et une femme sur six dans le monde développeront un cancer au cours de leur vie, et un homme sur huit et une femme sur 11 vont mourir de cette maladie.

Dans plusieurs cas, les causes exactes du cancer sont inconnues, mais il reste clair qu'il s'agit de l'action conjuguée de facteurs environnementaux et génétiques qui agissent ensemble pour l'initiation (modification initiale de l'ADN) ou la promotion (prolifération des cellules initiées) du cancer. Les changements de l'ADN peuvent suivre soit un modèle génétique (changement de la séquence même de l'ADN) ou un modèle épigénétique (modification de l'expression d'un gène sans que la séquence d'ADN soit affectée), bien que ces deux modèles ne soient pas mutuellement exclusifs [3] [4].

Tous les cancers sont des maladies génétiques (une maladie du patrimoine génétique au niveau cellulaire, mais il est rarement d'origine héréditaire). En effet, au niveau cellulaire, ils résultent de l'accumulation de mutations et de dérèglements de l'expression de certains gènes impliqués dans des processus essentiels à la carcinogenèse: contrôle de la prolifération et de la différenciation, acquisition de l'immortalité cellulaire et d'un potentiel métastatique, propriété d'invasion du tissu de voisinage et d'échappement à la réaction immunitaire. Ces gènes altérés peuvent être schématiquement regroupés en trois grandes catégories :

- des gènes de suppression tumorale: ils se comportent comme des inhibiteurs du cycle cellulaire; leurs mutations occasionnant habituellement une atteinte bi-allélique aboutissent à une perte de fonction ;
- des proto-oncogènes: leur expression est régulée durant le cycle cellulaire sur lequel ils ont une action stimulatrice; en présence d'une mutation dans ces gènes, ils peuvent être activés en oncogènes, échappant alors aux systèmes de régulation et stimulant la division cellulaire (gain de fonction);
- et des gènes assurant le maintien de l'intégrité du génome: ils permettent de réparer les altérations génétiques induites par les agents mutagènes environnementaux ou apparaissant lors de la réplication de l'ADN. [5]

(A)



(B)

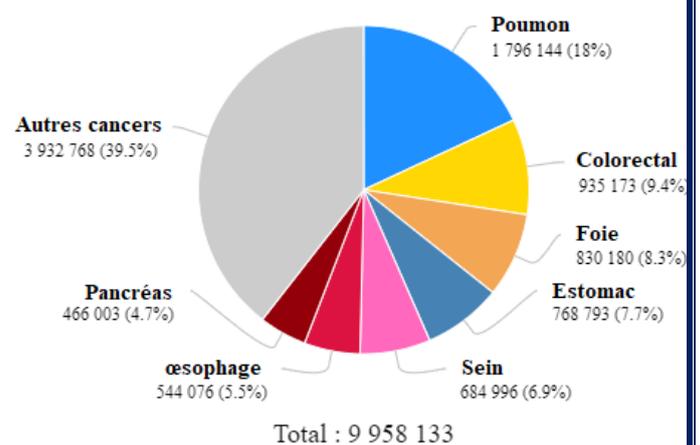


Figure 1 : Nombre de (A) nouveaux cas et (B) décès estimé dans le monde en 2020 chez les deux sexes, tous âges. (Globacan 2020)

Le cancer du sein est le cancer le plus répandu dans le monde (La plus grande incidence mondiale), en terme de mortalité il se trouve dans la 5eme position chez les deux sexes. Cependant il est la première cause de mortalité par cancer chez les femmes. Environ 685 000 femmes sont mortes du cancer du sein en 2020.

II. LE CANCER DU SEIN

1. ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DU SEIN NORMAL

Le sein a pour fonction primaire la synthèse, la sécrétion et l'éjection du lait. Le sein est composé de la glande mammaire proprement dite, de tissu conjonctif, de tissu adipeux, de vaisseaux sanguins et lymphatiques, de nerfs et des ligaments suspenseurs du sein (Figure2)

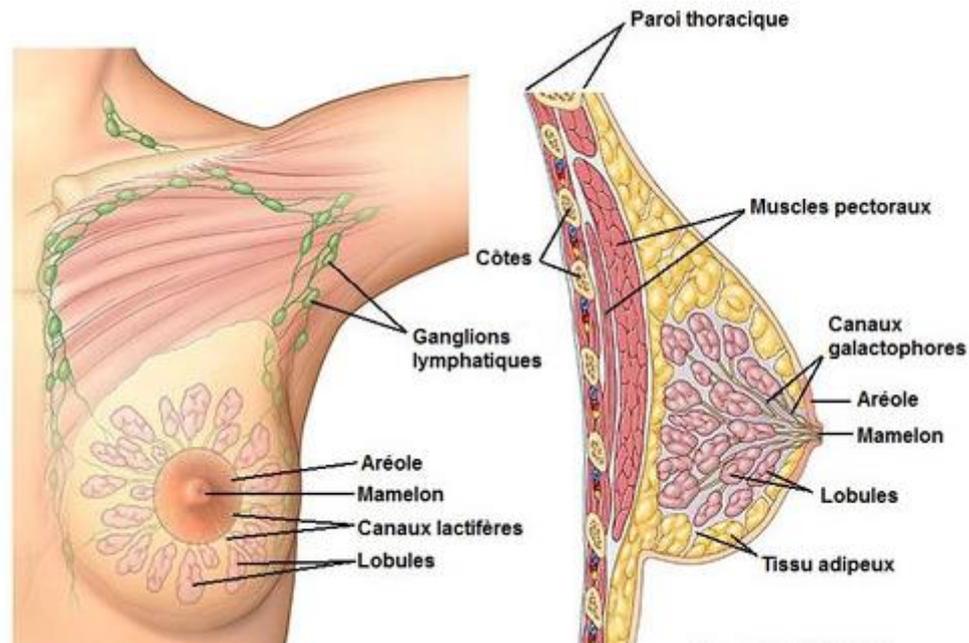


Figure 2 : Anatomie du sein humain normal. [6]

L'intérieur de chaque glande mammaire se compose de 15 à 20 lobes disposés en cercles et séparés par du tissu adipeux et des bandes de tissu conjonctif appelées ligaments suspenseurs du sein qui servent de soutien à ce dernier. Chaque lobe se subdivise en compartiment plus petits, appelés lobules, c'est là que se trouvent les alvéoles de la glande mammaire, qui abritent les glandes sécrétrices du lait. Le lait sécrété passe des alvéoles de la glande mammaire à une série de tubules qui s'ouvrent dans le mamelon [7].

La glande mammaire (qui existe aussi bien chez l'homme que chez la femme) est rudimentaire à la naissance. C'est à la puberté que s'effectue une grande part de son développement. L'action de la testostérone en inhibe le développement chez l'homme, alors que chez la femme, l'action des hormones ovariennes (estrogènes et progestérone) le stimule. On observe alors une accumulation de tissus adipeux et fibreux, qui occupe 80% ou plus du volume du sein chez une femme adulte n'allaitant pas. Au cours des cycles menstruels subséquents, on observe une phase de prolifération légèrement accrue lors de la phase lutéale du cycle, avec une augmentation du volume du sein qui peut atteindre jusqu'à 15% [8].

C'est au moment de la première grossesse menée à terme que la différenciation la plus poussée se produit. À ce moment, les changements hormonaux associés à la grossesse produisent une croissance et une prolifération intenses, et induisent la formation des acini sécrétoires (produits par un branchement plus poussé des canaux et leur différenciation), une augmentation de la quantité de tissu adipeux et une augmentation du flux sanguin. Au moment du sevrage, la glande mammaire involue (arrêt de l'activité sécrétoire et revient à un état moins différencié qui implique majoritairement les acini retrouvés au bout des canaux) jusqu'à la grossesse suivante. Le dernier changement important de la glande mammaire survient après la ménopause. À ce moment, il y a arrêt de la production des hormones ovariennes, ce qui provoque une involution de la glande mammaire. Après une période d'allaitement, cette involution touche à la fois les lobules et les canaux. Ces structures régressent et sont progressivement remplacées par du collagène et du tissu adipeux. Chez la femme âgée, il ne reste plus que quelques acinis et canaux dispersés à travers le tissu adipeux [7].

Il existe plusieurs lésions et maladies du sein, bénignes ou malignes. La majorité de ces lésions sont retrouvées au niveau de l'unité fonctionnelle de base du sein, l'unité terminale ducto-lobulaire (Figure2). Il existe un nombre relativement grand de lésions bénignes du sein, dont certaines d'entre elles sont asymptomatiques et relativement courantes dans la population [9].

2. LÉSIONS ET MALADIES BÉNIGNES DU SEIN

La tumeur bénigne qui se développe le plus souvent dans le sein est le **fibroadénome**, les autres affections bénignes du sein sont : **les kystes**, les **changements fibrokystiques**, **l'hyperplasie**, **l'écoulement du mamelon**.

La plupart des masses du sein ne sont pas synonymes de cancer, mais seul l'examen anatomopathologique réalisé après une biopsie qui confirme ou infirme la présence d'un cancer [10].

Dans la majorité des cas, les tumeurs bénignes ont des contours bien délimités, leur croissance est lente par conséquent la tumeur reste localisée dans le tissu ou l'organe dans lequel elle est apparue. Les tumeurs bénignes n'infiltrant jamais les tissus avoisinants et ne métastasent dans d'autres organes du corps [11].

La maladie bénigne du sein est un facteur de risque important pour un cancer du sein ultérieur [12]. Il englobe un spectre d'entités histologiques, généralement subdivisé en :

- lésions non prolifératives,
- lésions prolifératives sans atypie et

- hyperplasies atypiques (Figure3), avec un risque accru de cancer du sein associé à des lésions prolifératives ou atypiques [13], [14] lorsqu'il y a absence d'un suivi médical.

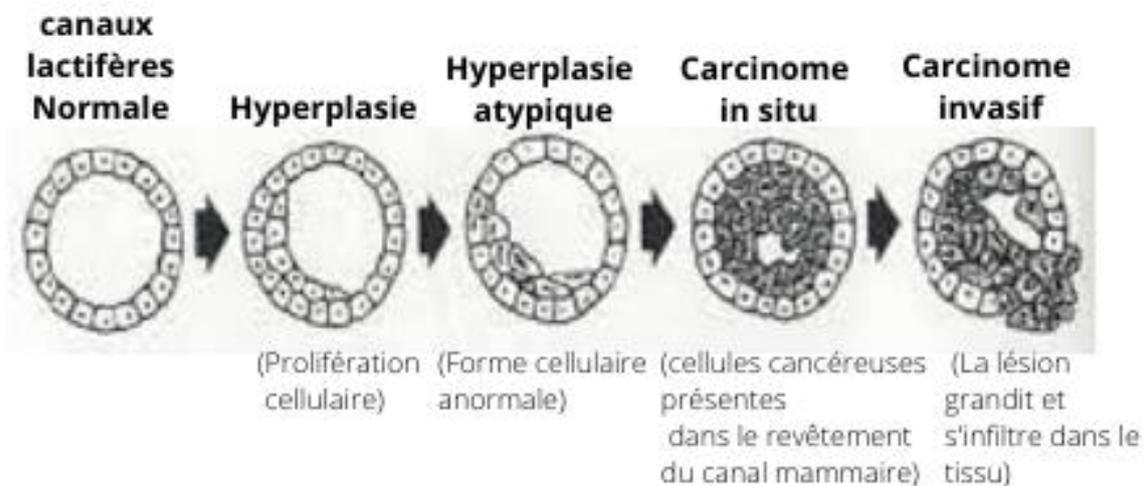


Figure 3 : Le spectre d'invasion du cancer du sein (Schéma explicatif).

Le cancer du sein ne se développe pas du jour au lendemain. Progressivement, les cellules deviennent plus anormales ou atypiques. Finalement, les cellules sont reconnues comme suffisamment anormales pour être appelées cellules cancéreuses. Elles se trouvent initialement à l'intérieur des canaux lactifères (cancer in situ), puis deviennent un cancer du sein invasif [15].

Le test de dépistage basé sur la mammographie et l'échographie permet de détecter toute lésion qu'elle soit bénigne ou maligne et, par conséquent, il est impératif d'avoir des estimations précises des facteurs de risque pour toutes les femmes à tout âge [9].

3. LE CANCER DU SEIN

La première description écrite du cancer du sein se trouve sur un ancien papyrus égyptien. À cette époque, le traitement était considéré comme futile et la femme était laissée sans aucune assistance médicale. Les Grecs anciens pensaient que le cancer du sein était causé par un excès de bile noire. On pensait que le flux menstruel soulageait naturellement les femmes de cet excès, ce qui expliquait pourquoi le cancer du sein était plus fréquent après la ménopause [17]. Aujourd'hui, plusieurs chercheurs [18] [19] ont montré que le cancer est toujours causé par des dommages à l'ADN d'une cellule. L'initiation du processus mutagène qui peut aboutir à diverses erreurs génétiques nécessite la division cellulaire. Un facteur qui augmente la prolifération cellulaire augmentera également le risque de cancer. Les hormones féminines, l'œstrogène et la progestérone, semblent avoir un impact sur le taux de division des cellules du sein [20] [21], ce qui explique les taux élevés de cancer du sein chez les femmes (99 % des cancers du sein surviennent chez les femmes).

3.1. ÉPIDÉMIOLOGIE DESCRIPTIVE DU CANCER DU SEIN

a. Dans le monde

Le cancer du sein est le premier type de cancer le plus fréquent et la première cause de décès chez les femmes ayant reçu un diagnostic de cancer. Selon l’OMS en 2020, 2,3 millions de femmes ont été diagnostiquées avec un cancer du sein et 685 000 décès dans le monde.

À la fin de 2020, 7,8 millions de femmes en vie avaient reçu un diagnostic de cancer du sein au cours des 5 dernières années, ce qui en fait le cancer le plus répandu au monde. Il y a plus d’années de vie perdues ajustées sur l’incapacité par les femmes à cause du cancer du sein dans le monde que pour tout autre type de cancer. Le cancer du sein survient dans tous les pays du monde chez les femmes à tout âge après la puberté, mais avec des taux croissants plus tard dans la vie.

Les carcinomes invasifs mammaires sont les cancers les plus fréquents chez la femme et représentent 25% (Figure4) de tous les cancers dans le monde et 27% dans les pays développés [9]. Comme pour la plupart des tumeurs épithéliales leur incidence augmente rapidement avec l’âge. Les populations qui présentent un risque élevé se trouvent en Australie, en Europe et en Amérique du Nord. Dans les pays moins développés, comme l’Afrique Sub-Saharienne, le sud et l’est de l’Asie incluant le Japon, le risque de carcinome mammaire est faible. Il a été constaté une augmentation de l’incidence de ces carcinomes chez les migrants de pays où le risque est faible vers des pays où le risque est élevé. La mortalité par cancer du sein a peu changé entre les années 1930 et les années 1970. Les améliorations de la survie ont commencé dans les années 1980 dans les pays dotés de programmes de détection précoce combinés à différents modes de traitement pour éradiquer les maladies invasives.

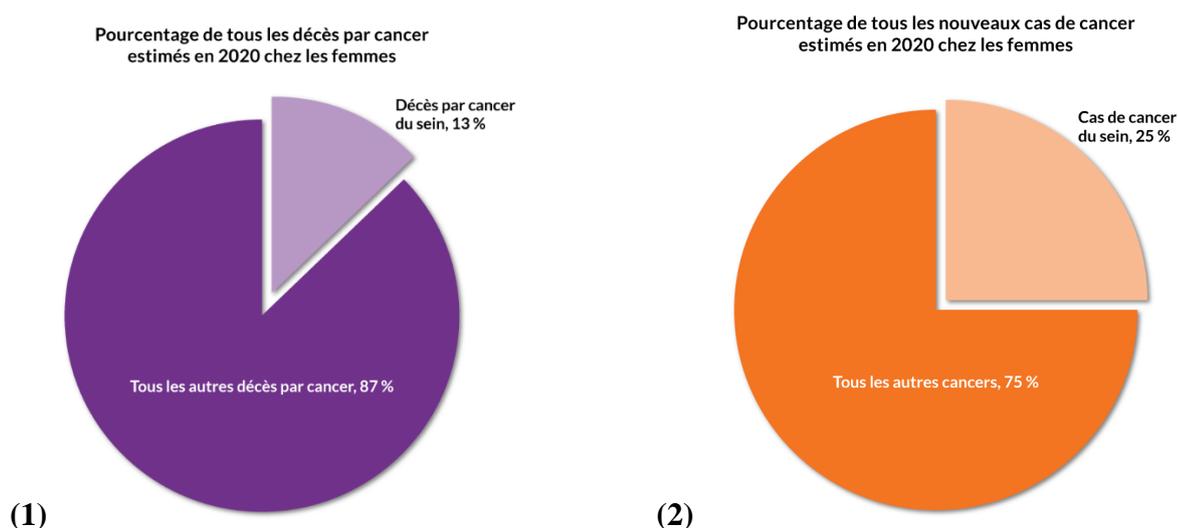


Figure 4 : Pourcentage de tous les nouveaux cas (1) et les cas de décès (2) par cancer estimés en 2020 chez les femmes. (OMS)

b. En Afrique du Nord

En Afrique du nord et au moyen orient, le cancer du sein est également le premier cancer de la femme. Il représente 14-42 % de tous les cancers féminins avec une augmentation exponentielle [22].

L'épidémiologie des cancers du sein en Afrique du Nord (Tableau1) se diffère d'un pays à un autre. Les données des registres au MAROC, ALGERIE, et TUNISIE précisent chez la femme, le cancer du sein occupe la première place en termes d'incidence de nouveaux cas dans les principaux registres Marocains (Casablanca, Rabat), Algériens (Alger, Oran, et Sétif), et Tunisiens (Sousse et Sfax).

Tableau 1 : Incidences ajustées apparaissant sur les registres d'Afrique du Nord (2008). [23]

Pays	MAROC		ALGERIE		TUNISIE		LYBIE	EGYPTE	EUROPE	
	Rabat	Casablanca	Alger	Sétif	Tunis	Sfax	Sousse	Benghazi	Gharbiah	-
Registres										
Incidence	35,8	35,0	60,5	18,8	29,6	29,8	28,0	23,3	42,5	71,0

* incidence (standardisée/âge/105 h)

Chez les Marocains, en 2018, la localisation la plus fréquente, en considérant les deux sexes, était le cancer du sein qui occupait le premier rang et qui représentait 19,2%, suivi par le cancer du poumon 12,3% et le cancer colorectal 7,8% [24]. Chez les femmes, les cancers du sein, du col utérin et de l'ovaire constituent plus de la moitié des cas (53%) [25].

Au Maroc, comme dans de nombreux autres pays à revenu intermédiaire, le cancer du sein est un problème majeur et l'organisation mondiale de la santé le considère comme une priorité de santé publique, car le diagnostic est souvent tardif et la prise en charge est difficile et coûteuse [26]. Plusieurs registres ont déjà été établis, dont le registre de la ville de Rabat (RECRAB), le registre des cancers de la région du Grand Casablanca et très prochainement, le registre des cancers de Marrakech, et permettent de donner une idée sur l'incidence des cancers dans ces différentes régions. Par contre, au niveau de la région de Fès, il n'existe actuellement aucune base de données régionale fiable permettant d'apprécier la fréquence et la répartition des cancers diagnostiqués au niveau de cette région et à partir de laquelle une lutte anticancéreuse pourrait être mise en place.

Selon les données de l'enquête Stepwise réalisée par le Ministère de la Santé en 2017 :

- 11,7% des Marocains âgés de 18 ans et plus fument du tabac ;
- 21,1% des Marocains ont un niveau d'activité physique insuffisant ;
- 53% des Marocains sont en surpoids et 20% sont obèses ;

- 39,9 % des personnes âgées de 18 à 69 ans ont au moins deux facteurs de risques ;
- 1,7% consomment de l'alcool. (Selon le PLAN NATIONAL DU CANCER DE PRÉVENTION ET DE CONTRÔLE)

Environ un tiers des décès par cancer est dû à ces 5 derniers principaux facteurs de risque.

3.2. FACTEURS DE RISQUE

L'origine des cancers du sein est multifactorielle, mais est plus particulièrement associée aux facteurs relatifs à la reproduction et aux hormones stéroïdes sexuelles ainsi que l'âge. Mais, actuellement, une prédisposition génétique est une des étiologies les plus fondées. Ainsi on distingue [27] :

3.2.1. Facteurs liés aux hormones

La maladie est plus fréquente chez les femmes qui ont eu leurs menstruations tôt, une ménopause tardive, qui sont restées nullipares ou qui ont eu peu d'enfants et à un âge tardif. L'infertilité et l'absence de lactation apparaissent aussi comme des facteurs de risques [28] [29].

a. Les hormones endogènes

Les hormones stéroïdes sexuelles (androgènes, œstrogènes, progestérone) jouent un rôle important dans le développement des carcinomes mammaires. L'incidence de ces carcinomes augmente plus avant la ménopause (8% par an) qu'après (2% par an) où le taux d'hormones est plus faible. Ce taux est plus faible après la ménopause car la production ovarienne d'œstrogènes et de progestérone va cesser et la production d'androgènes va diminuer [30]. Cependant, chez les femmes ménopausées, il persiste quand même une production d'hormones stéroïdes périphériques (par exemple par le tissu adipeux ou la surrénale) qui se traduit par des taux d'hormones plus ou moins important chez ces femmes. C'est ainsi qu'il a été constaté qu'après la ménopause plus la concentration sanguine des œstrogènes et des androgènes est importante plus le risque de développer des carcinomes mammaires augmente.

b. Les hormones exogènes

- Les contraceptifs oraux

Pendant longtemps les contraceptifs ont été soupçonnés d'augmenter le risque de carcinome mammaire car ils contiennent des œstrogènes et de la progestine (hormone synthétique ressemblant à la progestérone) à des concentrations plus élevées que celles d'un cycle ovulatoire. L'International Agency for Research on Cancer (IARC), a classé les contraceptifs oraux comme des carcinogènes de type I.

- Traitement de substitution hormonale chez la femme ménopausée

Les femmes en cours d'utilisation de traitement substitutif ont un risque accru de survenue de carcinome mammaire et de mortalité par ce cancer et cet effet est augmenté chez les femmes qui prennent une association d'œstrogènes et de progestérone [31].

3.2.2. Autres facteurs de risques

Le cancer du sein est une maladie complexe influencée par l'effet de plusieurs facteurs génétiques et environnementaux ; le sexe, le mode de vie ainsi que tous les autres facteurs de risque du carcinome mammaire sont regroupés dans le tableau suivant (Tableau2) :

Tableau 2 : Facteurs de risque modifiant le risque de développer un cancer du sein [32].

Facteur de risque	Groupe		Commentaires
	Risque accru	Risque faible	
Sexe	Femmes	Hommes	Le cancer du sein chez l'homme est rare. Moins de 1 % de tous les cancers du sein affectent les hommes. [33]
Age			L'incidence augmente avec l'âge. La probabilité de développer un cancer du sein invasif au cours des 10 années subséquentes passe de 1,5% à 40 ans à environ 3% à 50 ans et à plus de 4% à 70 ans. [34]
Indice de masse corporelle			Un indice de masse corporelle élevé est associé à une diminution du risque de cancer du sein chez les femmes pré-ménopausées, mais à une augmentation du risque chez les femmes post-ménopausées [35].
Taille à l'âge adulte	>1,75m	<1,6m	Le risque semble augmenter avec la taille. Cette association semble plus forte chez les femmes ménopausées. [35]
Activité physique	-	+	La tendance indique une réduction de 6%/heure d'activité physique soutenue par semaine. L'effet de l'activité physique semble plus important chez les femmes post-ménopausées [36].
Consommation d'alcool	>10g par jour	0g par jour	Le risque de cancer du sein augmente de 7-9% pour chaque augmentation de 10g d'alcool consommé par jour [37] [38].
Histoire familiale	+	-	Le risque augmente avec le nombre de parents au premier degré atteints. Par exemple, pour une femme de 20 ans en santé, la probabilité qu'elle développe la maladie augmente en fonction du nombre de parents avec un cancer du sein et varie en fonction de l'âge auquel ces cancers sont diagnostiqués [37].
Histoire personnelle de cancer du sein	+	-	Le risque d'une femme ayant déjà eu par le passé un diagnostic de cancer du sein est 2-6 fois plus élevé que le risque de la population générale [39].
Mutation d'un des gènes de susceptibilité	+	-	Des mutations des gènes de susceptibilité au cancer du sein sont associées à un risque accru de développer la maladie [40]
Nombre de grossesses à terme	Nullipare	Multipare	Le risque de cancer du sein diminue avec le nombre de grossesses à terme. En absence d'allaitement, chaque grossesse à terme diminue le risque relatif de cancer du sein de 7%. [41]
Age à la première grossesse	>30 ans	<20 ans	Une première grossesse à terme à un jeune âge est associée à une diminution du risque de cancer du sein. Le risque semble diminuer de 3% pour chaque année plus jeune la femme est lorsqu'elle a sa première grossesse à terme. [41]
Allaitement	-	+	Le risque relatif de cancer du sein décroît de 4,3% pour chaque période de 12 mois d'allaitement. Cette diminution du risque s'ajoute à la diminution associée à chaque grossesse à terme. [41]
Age à la ménopause	>55 ans	<45 ans	Plus une femme a une ménopause tardive, plus son risque de cancer du sein est augmenté. Pour tous les 5 ans de différence dans l'âge à la ménopause, le risque de cancer du sein change d'environ 17%. [42]
Age à la ménarche	<12 ans	>15 ans	Plus la ménarche survient tôt, plus le risque de cancer du sein semble élevé. Ce facteur serait associé à la durée d'exposition aux estrogènes chez la femme. [42]

3.3.CANCERS SPORADIQUES ET HEREDITAIRE

Les altérations génétiques sporadiques sont essentiellement acquises au cours de l'existence et progressivement sélectionnées dans certains clones cellulaires jusqu'à l'acquisition suffisante de caractéristiques tumorales malignes. Le temps nécessaire à l'accumulation de ces mutations se traduit cliniquement par le fait que le principal facteur de risque des cancers demeure l'avancée en âge. Ces mutations, aussi dites **somatiques** ou **acquises**, se retrouvent uniquement dans les cellules de la tumeur et ne peuvent pas être transmises à la descendance. Pour parler d'une forme héréditaire de cancer, il faut que l'une des mutations soit présente au niveau de la lignée germinale et donc déjà présente à la naissance: ce sont les mutations **constitutionnelles** ou **germinales**. [5]

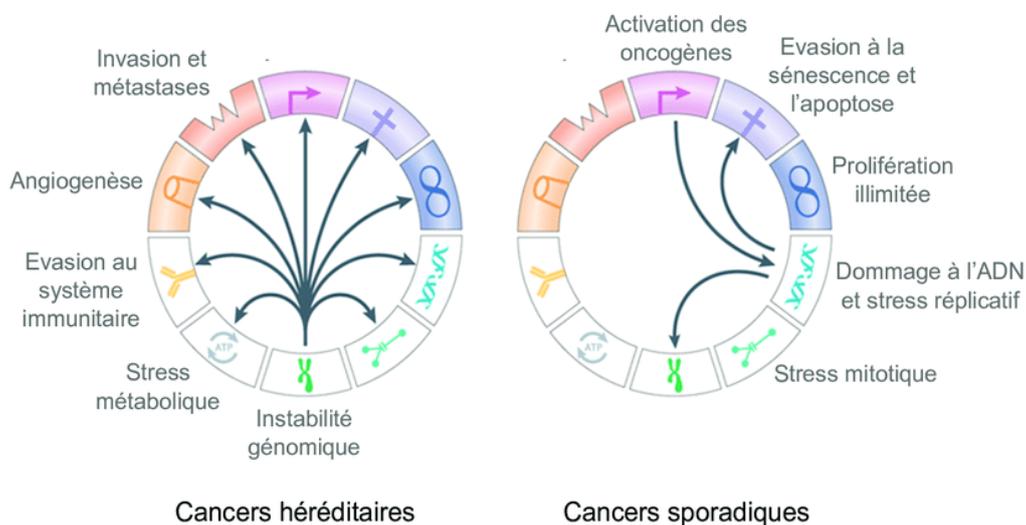


Figure 5 : Les caractéristiques des cancers sporadiques et héréditaire (Figure adaptée de Negrini 2010).

Le cancer est donc une maladie du patrimoine génétique au niveau cellulaire, mais il est rarement d'origine héréditaire. Le fait d'avoir des antécédents familiaux est un facteur de risque important de la maladie. Les femmes ayant des antécédents malades chez un parent au premier degré sont environ deux fois plus susceptibles de développer un cancer que les femmes sans antécédents familiaux. [43]

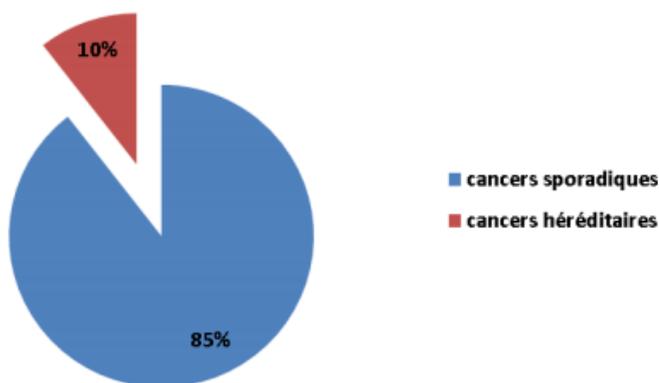


Figure 6: Pourcentage des cancers sporadiques par rapport aux cancers héréditaires.

De 5 à 10% des cancers du sein surviennent dans un contexte fortement évocateur d'une transmission héréditaire d'une mutation d'un gène de prédisposition au développement d'un cancer.

3.4. DIAGNOSTIC HISTOLOGIQUE ET CLASSIFICATION HISTOMOLECULAIRE DU CANCER

3.4.1. Classification histologique des cancers du sein

Le sein est constitué de différents tissus : épithélial, conjonctif, immunitaire et vasculaire (Figure1) qui peuvent donner tous les types des cancers. On peut donc observer des cancers d'origine épithéliale, mésenchymateuse, ou encore lymphomateuse. Les plus fréquents sont de loin les cancers épithéliaux, les carcinomes, que l'on nomme couramment « cancers du sein ». Parmi les nombreux types de cancers épithéliaux, les deux types, les plus fréquents sont les carcinomes canaux invasifs et les carcinomes lobulaires invasifs. Ces cancers peuvent être précédés de lésions précurseurs tels que les carcinomes canaux ou lobulaires in situ. Il existe également des lésions proliférantes telles que les hyperplasies typiques ou atypiques (Figure3) évoluant selon une histoire impactée par des facteurs environnementaux, endogènes ou exogènes. [31]

A. LES CARCINOMES IN SITU

Les carcinomes in situ se définissent comme une prolifération de cellules malignes se développant dans la lumière des canaux et des lobules sans franchir la membrane basale et sans envahir le tissu conjonctif. Ils ne comportent théoriquement pas de risque d'envahissement ganglionnaire. Les carcinomes canaux in situ sont les plus fréquents (15 à 20% des cancers du sein). Ils se forment au niveau des canaux galactophores et ne sont pas invasifs (Figure7). Ils sont principalement traités par chirurgie. Lorsqu'elles sont examinées au microscope, les cellules anormales du carcinome canalaire in situ ne se trouvent qu'à l'intérieur des glandes et des canaux.

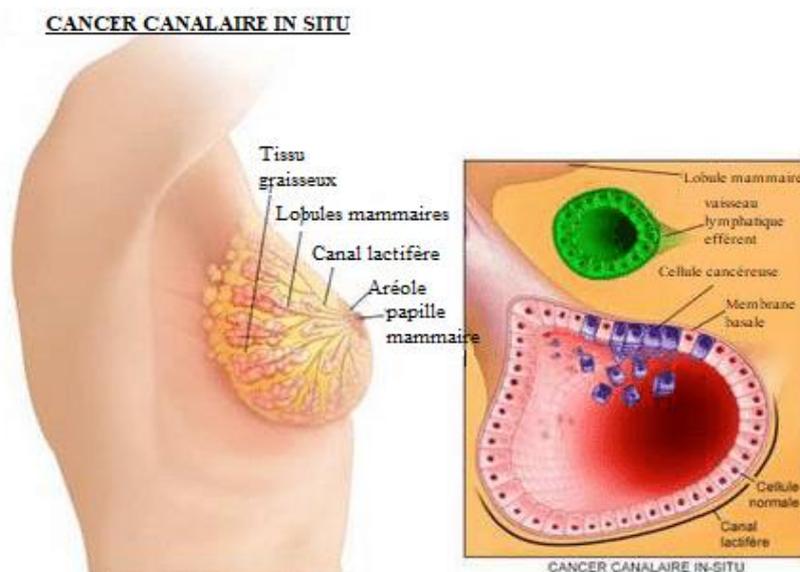


Figure 7 : Représentation schématique d'un carcinome canalaire in situ (Tiré de NATOMIMAGES)

B. LES CARCINOMES INVASIFS

Pour devenir un carcinome canalaire invasif, les cellules cancéreuses doivent sortir des glandes et des canaux et entrer dans le stroma. La présence des cellules cancéreuses des glandes et des canaux dans le stroma est ce qu'on appelle invasion qui peut être divisée en deux classes ;

Le carcinome canalaire invasif représente **75%** des tumeurs mammaires invasives. Ces cancers sont d'aspect très varié. Les cellules carcinomateuses forment des cordons, des îlots, des travées ou présentent une différenciation glandulaire. Les noyaux peuvent être petits, réguliers et uniformes, ou très pléomorphiques avec de nombreux et gros nucléoles. L'activité mitotique peut être minime ou aller jusqu'à 80%. Le tissu conjonctif ainsi que les cellules inflammatoires sont d'abondance variable.

Le carcinome invasif lobulaire représente environ **15%** des tumeurs mammaires invasives. Il s'agit d'une prolifération de petites cellules peu cohésives, dispersées dans un tissu conjonctif dense ou rangées en cordons linéaires infiltrants. Les noyaux sont ronds entourés d'une fine couronne cytoplasmique alors que les mitoses sont peu fréquentes [44].

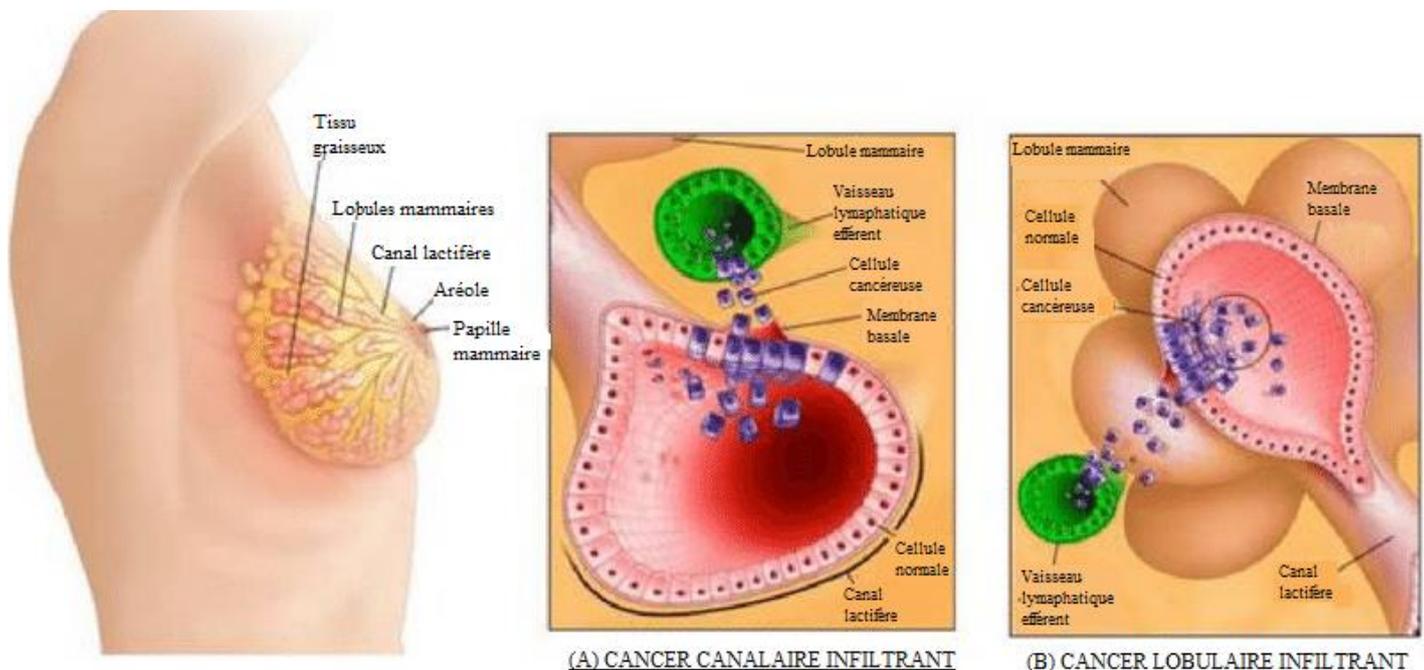


Figure 8: Représentation schématique d'un cancer canalaire (A) et lobulaire (B) infiltrant.

Les carcinomes invasifs sont ainsi classifiés selon le grade SBR qui se base sur trois critères :

- la formation de glandes,
- le compte mitotique. [45]
- le pléomorphisme nucléaire,

Chacun de ces 3 critères est évalué et une note allant de 1 à 3 lui est attribuée. L'évaluation de la présence de glandes est établie sur l'ensemble de la tumeur analysée alors que l'évaluation du pléomorphisme nucléaire prend en compte la zone où les noyaux sont les plus irréguliers avec les nucléoles les plus proéminents. Pour le compte mitotique, c'est la zone où se trouve la plus forte prolifération qui est prise en compte. [46]

Tableau 3 : Les critères du grade et leurs notes attribuées.

Critère	Architecture	Noyau	Activité mitotique
Note 1	La tumeur contient beaucoup de structures bien formées.	Les noyaux de la tumeur sont petits et uniformes.	Les cellules de la tumeur se divisent lentement = faible nombre de mitoses.
Note 3	La tumeur contient peu ou pas du tout de structures bien formées.	Les noyaux de la tumeur sont gros et leur taille et leur forme varient.	Les cellules de la tumeur se divisent rapidement = important nombre de mitoses.

Le grade est déterminé par l'addition des trois facteurs les uns avec les autres, ainsi :

- **Le grade I**, avec un score allant de 3 à 5, correspond à des carcinomes bien différenciés.
- **Le grade II**, avec un score de 6 à 7, correspond aux carcinomes moyennement différenciés.
- **Le grade III**, avec un score de 8 ou 9, correspond à des carcinomes peu différenciés. [47]

3.4.2. Classification moléculaire

Depuis la fin des années 1990, l'essor et la miniaturisation des techniques de séquençage à haut débit ont permis d'ajouter une caractérisation moléculaire aux données histologiques et cliniques classiques qui permet la classification des différents types de cancers du sein. Les premières études génomiques des cancers du sein ont permis de mettre en évidence à l'échelle moléculaire, l'hétérogénéité de ce cancer, fortement suspectée jusqu'ici. Ainsi il a été établi cinq sous-types majeurs de cancer du sein, sur la base de l'expression transcriptionnelle de plusieurs centaines de gènes: **luminal A**, **luminal B**, **basal**, **positif pour HER2** et **le type normal** [48] . Les caractéristiques moléculaires de ces sous-types sont exposées dans la table - .

Les sous-types luminal A et basal sont les plus fréquents. Le sous type luminal A correspond à des cancers de bas grade et donc de pronostic favorable. Ces cancers expriment des récepteurs hormonaux de type récepteurs aux œstrogènes ER, et sont principalement traités par hormonothérapie. Le sous-type basal a un pronostic plus défavorable pour la survie globale. Les

cellules cancéreuses appartenant à ce sous-type n'expriment pas de récepteurs hormonaux et il n'existe pas de chimiothérapies adaptées les ciblant.

Parmi les sous-types basals on distingue **les tumeurs triples négatives, ER-/PR-/HER2-**. Ces tumeurs n'expriment ni les récepteurs aux œstrogènes (ER), ni le récepteur à la progestérone (PR) ni le récepteur au facteur de croissance épidermique humain (HER2). Cette catégorie de cancer représente moins de 15% des cancers du sein, mais a un pronostic particulièrement mauvais et répond très mal aux traitements disponibles.

C'est la raison pour laquelle de nombreux essais thérapeutiques sont mis en place pour ces cancers. **Le sous-type HER2** représente 15 à 20% des cancers du sein et est caractérisé par une forte expression du gène HER2. L'essor des biotechnologies a permis de mettre au point des thérapies ciblées pour ce sous-type de cancer reposant notamment sur l'administration d'anticorps ciblant la voie HER2.

Le sous-type luminal B est plus prolifératif et moins différencié que le A et, de ce fait, est de moins bon pronostic.

Enfin, **le sous-type normal**, comme son nom l'indique, ressemble à des cellules de tissu mammaire sain. Cependant, ce sous-type tend à disparaître puisqu'il s'agirait en fait de cellules malignes ayant migré dans du tissu sain.

Tableau 4 : Caractéristiques moléculaires des différents sous-types de cancer du sein [49].

Sous-type moléculaire	Signature moléculaire			Pronostic
	ER	PR	HER2	
Luminal A	+	+	-	Bon
Luminal B	+	+	+/-	Intermédiaire
HER2	-	-	+	Mauvais
Basal	-	-	-	Mauvais

ER = récepteur à l'œstrogène, PR = récepteur à la progestérone, HER2 = récepteur au facteur de croissance épidermique humain 2.

« + » signifie que le récepteur est exprimé, « - » qu'il ne l'est pas.

Cette classification moléculaire a permis de mettre en place une médecine plus personnalisée en adaptant le choix du traitement au profil génétique des tumeurs. [45]

III. LE CANCER DU SEIN HEREDITAIRE

1. MODE DE TRANSMISSION

Dès la fin des années 1980, les gènes responsables de ces formes héréditaires de cancer ont été progressivement localisés et identifiés grâce aux progrès de la génétique moléculaire. Il est estimé que 5 à 10 % des cancers de sein sont héréditaires, c'est-à-dire qu'ils résultent de prédispositions génétiques conférant un haut risque de développer certains cancers [50]. La prévalence de ces prédispositions est très faible dans la population générale et elles se transmettent pour la plupart selon un mode autosomique dominant [51]. Il est rapidement apparu que les gènes de haute pénétrance à transmission autosomique dominante ne permettaient pas à eux seuls d'expliquer l'intégralité des formes héréditaires. L'hypothèse d'autres modes de transmission, de modèles multigéniques ou impliquant des gènes de pénétrance plus modérée a alors été émise.

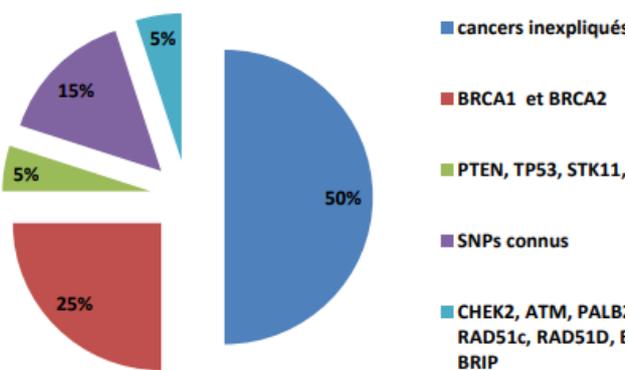


Figure 9 : Proportion des gènes de prédisposition au cancer du sein héréditaire.

20-25% des cancers héréditaires sont dus à des mutations des gènes *BRCA1* ou *BRCA2*, ces derniers ont été les premiers gènes identifiés en 1994 comme responsables d'une transmission héréditaire autosomique dominante du risque de développer un cancer du sein. D'autres gènes tels que *TP53*, *PTEN*, *STK11* et *CDHI* sont responsables d'environ 5% des cancers héréditaires du sein. D'autres gènes de prédisposition ont ensuite été découverts comme *ATM*, *PALB2*, *CHECK2*, avec une pénétrance plus modérée. la plupart de ces gènes sont impliqués dans les mécanismes de réparation de l'ADN indispensable au maintien de l'intégrité du génome. [52]

2. Les cancers du sein associés à une mutation de *BRCA1*

2.1. Le gène *BRCA1*

BRCA1 est un gène de 81,189 paires de bases, localisé sur le bras long du chromosome 17 en 17q21, il comporte 23 exons dont 22 sont codants.



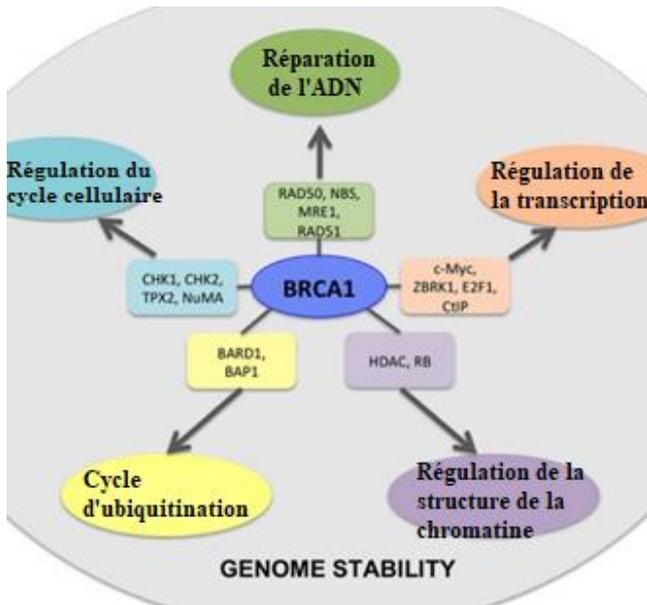
Figure 10 [53] : Localisation du gène *BRCA1* sur le chromosome.

BRCA1 et *BRCA2* sont exprimées de façon ubiquitaire chez l'humain, avec une expression qui corrèle de près avec les niveaux de prolifération cellulaire. L'expression est de plus variable au cours du cycle cellulaire, avec des niveaux maximums à la transition G1/S [54].

2.2. La protéine *BRCA1* : fonctions biologiques

Ce gène code pour une phosphoprotéine nucléaire de 190 kD (1863 acides aminés) qui joue un rôle dans :

- La suppression des tumeurs ; La protéine comporte un domaine RING (nommé d'après le gène modèle de cette classe, Really interesting new gene) de fixation aux autres protéines, situé en N-terminal formant ainsi un grand complexe protéique multi-sous-unités connu sous le nom de **complexe de surveillance du génome** associé à *BRCA1* (BASC). Ce produit génique s'associe à l'ARN polymérase II et, via le domaine C-terminal, interagit également avec les complexes d'histone désacétylase. [55]
- La régulation transcriptionnelle
- Les points de contrôle du cycle cellulaire,
- L'ubiquitylation [56]
- La réparation de l'ADN des cassures double brin par recombinaison homologue ; Les cellules déficientes en *BRCA1* ou *BRCA2* démontrent clairement une inefficacité à effectuer la réparation des bris de l'ADN, en particulier les lésions impliquant des BDBs (Bris double brins). Les fonctions cellulaires de *BRCA1* dans la réparation des BDBs semblent consister majoritairement dans un rôle de médiateur entre les protéines de détection des bris et les protéines impliquées dans la réparation proprement dite, ce qui assure l'activation des mécanismes adéquats [57] [58].
- Et donc le maintien de la stabilité génomique (figure)

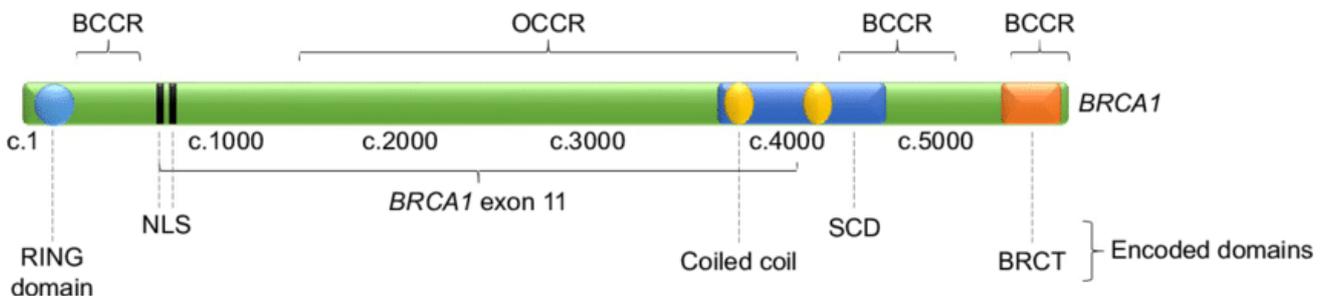


- Le complexe **BRCA1-abraxas** est associé au recrutement de *BRCA1* sur les sites de dommages à l'ADN.

- Le complexe **BRCA1-BRIP1**, qui contient également l'ADN topoisomérase 2-binding protein 1 (TOPBP1), est associé à la réparation de l'ADN lors de la réplication.
- Le complexe **BRCA1-CtIP** favorise l'activation de l'ataxie-télangiectasie et de Rad3 (ATR) et la recombinaison homologue (HR) en s'associant à la Complexe MRN (composé de MRE11, RAD50 et de la protéine 1 du syndrome de rupture de Nijmegen (NBS1)) et facilitant la résection des cassures double brin de l'ADN.

2.3. La protéine BRCA1 : Structure secondaire et interactions

BRCA1 contient un domaine **RING** N-terminal, des signaux de localisation nucléaire (**NLS**) et La région centrale de BRCA1 contient un site de phosphorylation CHK2 sur S988. L'extrémité carboxyle de BRCA1 contient : un domaine enroulé qui s'associe au partenaire et au localisateur de BRCA2 (PALB2) ; un domaine de cluster SQ/TQ (**SCD**) qui contient environ dix sites potentiels de phosphorylation de mutation ataxie-télangiectasie (ATM) et s'étend sur les résidus d'acides aminés 1280-1524 ; et un domaine **BRCT** qui lie les abraxas phosphorylés ATM, la protéine interagissant avec CtBP (CtIP) et la protéine C-terminale hélicase 1 interagissant avec BRCA1 (BRIP1).



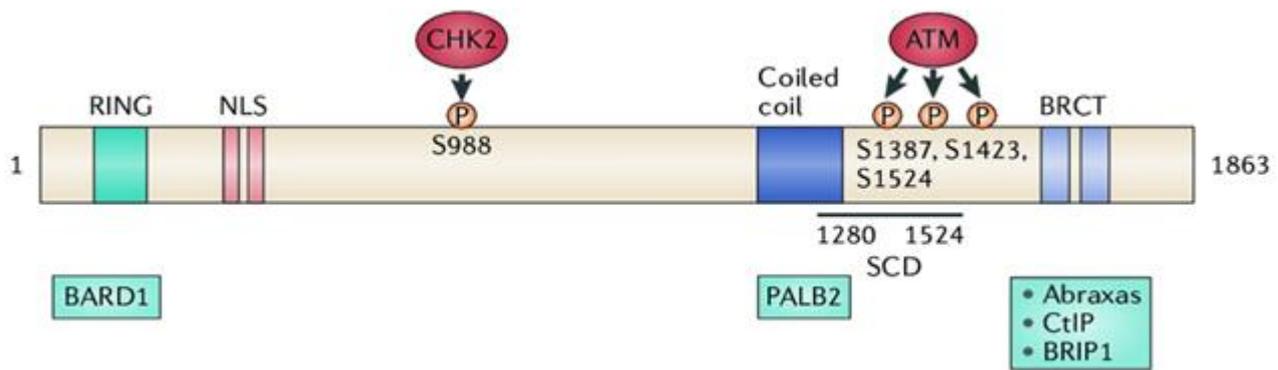


Figure 11 : Caractéristiques des protéines BRCA1 humaines. [59] [60]

Les protéines en interaction sont présentées ci-dessous des régions approximatives de liaison. [59]

La région centrale de BRCA1, qui contient le **SCD**, est phosphorylée par **ATM**. Cette phosphorylation est importante pour l'activation des points de contrôle G2/M et S en phase S médiée par *BRCA1*, car l'expression d'un mutant BRCA1 dépourvu de trois des sites de phosphorylation (S1387, S1423 et S1524) ne parvient pas à sauver l'activation défectueuse du point de contrôle et l'hypersensibilité aux rayonnements ionisants dans un lignée cellulaire déficiente en BRCA1. [60]

2.4. Mutation de BRCA1

Les mutations de ce gène sont responsables d'environ 40 % des cancers héréditaires du sein et de plus de 80 % des cancers héréditaires du sein et de l'ovaire [55]. Le risque de développer un cancer du sein chez les patientes mutées pour *BRCA1* varie en fonction de la position de la mutation sur le gène avec un risque est plus élevé si la mutation est en C-terminal. La plupart de ces mutations siègent soit dans le domaine RING, soit dans le domaine C-terminal (domaine BRCT) soit entre les exons 11 à 13 [52]. Ces mutations, en addition des autres facteurs de risques (Tableau3) dont certains sont en lien avec le mode de vie, des facteurs reproductifs et des polymorphismes constitutionnels, montrent une incidence des cancers du sein dans la population mutée *BRCA1* de 46% et celle des cancers de l'ovaire de 12%. Les patients porteurs de mutation de *BRCA1* ont un risque accru de développer d'autres cancers au niveau de la trompe. Il serait possible également que la mutation *BRCA1* augmente le risque de cancer de l'estomac, du colon, du pancréas, hépato-biliaire. Le risque de cancer du sein chez les hommes est très faible [61]. Moins de 1 % de tous les cancers du sein affecte les hommes. [62]

Les tumeurs *BRCA1* mutées sont presque dans 100% des cas associées à des mutations de TP53 [55]. Plus de 600 variations de séquence de *BRCA1* ont déjà été répertoriées. Ces mutations délétères ou non, intéressent le gène entier et sont de nature très variable. La moitié des mutations est constituée de délétions ou insertions et 50% sont des substitutions. Quand il s'agit de mutations pathogéniques, elles aboutissent dans leur grande majorité à une protéine tronquée.

3. Les cancers du sein associés à une mutation de *BRCA2*

3.1. Le gène *BRCA2*

BRCA2 est de 84,761 pb, il est localisé sur le bras long du chromosome 13 en 13q13.1, comporte 27 exons et code pour une protéine de 3418 acides aminés.



Figure 12 : [1] Localisation du gène *BRCA2* sur le chromosome.

3.2. La protéine *BRCA2* : Rôle, structure secondaire et interactions

BRCA1 et *BRCA2* sont tous deux impliqués dans le maintien de la stabilité du génome, en particulier la voie de recombinaison homologue pour la réparation de l'ADN double brin.

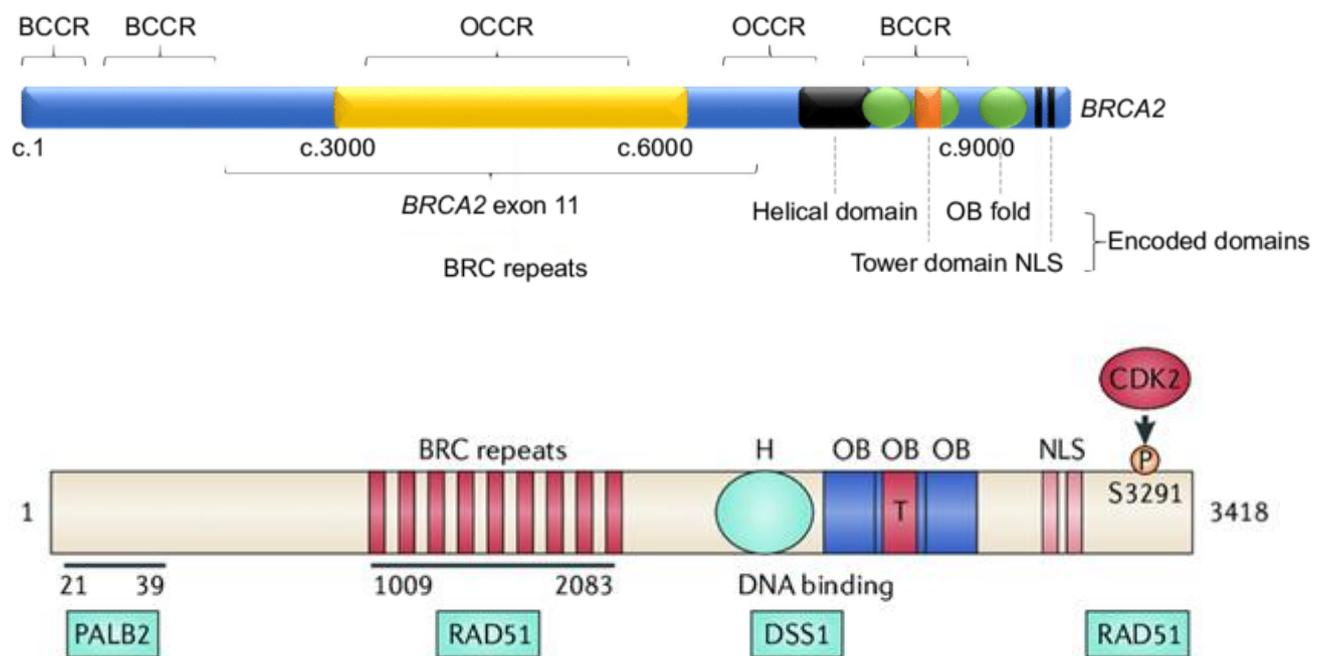


Figure 13 : Caractéristiques des protéines *BRCA2* humaines. [59] [60]

Certaines des protéines interagissant avec *BRCA2* sont indiquées en dessous du site d'interaction.

L'extrémité **N-terminale** de *BRCA2* se lie à *PALB2* aux acides aminés.

La protéine *BRCA2* contient huit répétitions d'un motif de 70aa (entre les résidus d'acides aminés 1009 et 2083) appelé motif **BRC**, Six de ces huit motifs interviennent dans la liaison à la recombinase *RAD51* qui fonctionne dans la réparation de l'ADN.

Le domaine de liaison à l'ADN BRCA2 contient un domaine hélicoïdal (**H**), trois plis de liaison au **domaine OB** (oligonucléotide/oligosaccharide-binding Domain) et un domaine tour (**T**), qui facilitent la liaison de BRCA2 à la fois à l'ADN simple brin et à l'ADN double brin.

L'extrémité C-terminale de BRCA2 contient un NLS et un site de phosphorylation de kinase dépendante de la cycline (CDK) à S3291 qui se lie également à *RAD51*. [60]

BRCA2 est considéré comme un gène suppresseur de tumeur, car les tumeurs avec des mutations *BRCA2* présentent généralement une perte d'hétérozygotie (LOH) de l'allèle de type sauvage. [63]

3.3.Mutation de *BRCA2*

La fréquence de mutations héréditaires de *BRCA2* est de l'ordre de 3,4% dans la population de patientes atteintes de cancer du sein avec une incidence, dans la population mutée *BRCA2*, de 52% [55]. Le plus grand exon des deux gènes (*BRCA1* et *BRCA2*) est l'exon 11, qui abrite les mutations les plus importantes et les plus fréquentes chez les patientes atteintes d'un cancer du sein. [63]

Les patients porteurs de mutation de *BRCA2* ont un risque accru de développer d'autres cancers au niveau de la trompe, de la prostate et du pancréas. Il serait possible également que la mutation *BRCA2* augmente le risque de cancer du col de l'utérus, l'estomac, et hépto-biliaire. Le risque de cancer du sein chez les hommes est démontré. La découverte d'un cancer du sein chez un homme doit faire rechercher une mutation de *BRCA2*. Le risque de développer un cancer chez les porteurs de mutation de *BRCA2* est également modulé par des facteurs liés au mode de vie, des facteurs reproductifs et des polymorphismes génétiques constitutionnels. [55]

Les tumeurs *BRCA2* mutées ont 50% de mutations de *TP53*. L'expression des gènes impliqués dans la prolifération, la transduction du signal, l'adhésion, et la production de matrice extracellulaire sont anormales. Elles présentent une surexpression de *BCL2*, *CK8/18*, *CCND1* et une forte expression de *HIF1a*, *EGFR*, *Cycline A* et *E*, *p63*, *p-cadhérine*, *cavéoline 1*, *laminine* et *vimentine* [64]

La mise en œuvre récente de plateformes de séquençage et multigéniques de nouvelle génération a élargi le spectre du syndrome héréditaire du cancer du sein, au-delà des gènes traditionnels *BRCA1* et *BRCA2*. Un grand nombre d'autres gènes ont été découverts, qui jouent également un rôle essentiel dans la réparation des ruptures d'ADN double brin par la voie de recombinaison homologue. On cite au titre d'exemple les deux gènes *PTEN* et *TP53* causant respectivement le syndrome de Cowden et le Syndrome de Li-Fraumeni. [65]

4. Syndrome de Cowden

Le syndrome de Cowden est un syndrome autosomique dominant de pénétrance variable dans le contexte d'une mutation héréditaire du gène *PTEN* (phosphatase and tensin homolog). La pénétrance de ce dernier est aussi liée à l'âge.

4.1. Le gène *PTEN*

PTEN contient un nombre de 108,306 pb, il est localisé en 10q23.3, composé de 10 exons. La protéine codée par ce gène est une phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate 3-phosphatase.

Il fonctionne comme un suppresseur de tumeur en régulant négativement la voie de signalisation AKT/PKB. [66]

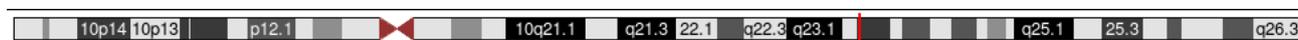


Figure 14 : Localisation du gène *PTEN* sur le chromosome. [67]

4.2. Mutation de *PTEN*

Le gène *PTEN* est muté dans un grand nombre de cancers à haute fréquence. Les patientes atteintes du syndrome Cowden marqué par des lésions cutanéomuqueuses, des désordres du spectre autistique, une macrocéphalie ainsi que des lésions bénignes comme des hamartomes, lipomes ou des fibromes peuvent développer des cancers du sein, de la thyroïde, de l'endomètre, et des lésions bénignes du sein (de type de maladie fibrokystiques, fibroadénomes et hamartomes). Les cancers du sein associés au syndrome de Cowden sont décrits comme de type apocrine, c'est-à-dire constitués d'une prolifération de cellules carcinomateuses aux cytoplasmes abondants, granuleux et éosinophiles aux limites cytoplasmiques bien visibles. Les noyaux sont volumineux, arrondis avec un nucléole central, avec une activité mitotique modérée ou haute et expriment les récepteurs aux androgènes. L'architecture est le plus souvent solide [68], [69].

5. Syndrome de Li-Fraumeni

Le syndrome de Li-Fraumeni est un Syndrome rare de prédisposition au cancer caractérisé par l'apparition précoce de plusieurs cancers primitifs tels que le cancer du sein entrant dans le contexte de la mutation héréditaire du gène *TP53* (tumor protein p53). [70]

5.1. Le gène *TP53*

TP53, un gène de 19,070 pb localisé sur le bras court du chromosome 17 (17p13.1) composé de 12 exons, code pour une protéine suppresseur de tumeur contenant des domaines d'activation transcriptionnelle de liaison à l'ADN et d'oligomérisation. La protéine codée répond à divers stress

cellulaires pour réguler l'expression des gènes cibles, induisant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence, l'apoptose, la réparation de l'ADN ou des modifications du métabolisme. [71] [72]



Figure 15 : Localisation du gène *TP53* sur le chromosome

5.2. Mutation de *TP53*

Des mutations dans le gène *TP53* sont associées à une variété de cancers humains, y compris des cancers héréditaires tels que le syndrome de Li-Fraumeni. L'âge médian au diagnostic est de 32 ans. Les cancers du sein de l'homme dans le syndrome de Li Fraumeni sont peu communs. Les tumeurs sont en majorité infiltrantes de type non spécifique mais peuvent aussi être in situ. La caractéristique majeure de ces tumeurs est d'être HER2 amplifiée dans 63% des cas, et dans 84% des cas les récepteurs aux œstrogènes sont exprimés. Les tumeurs sont HER2 amplifiées et récepteurs aux œstrogènes positifs dans 53% des cas (HER2-luminales B) [73] [5].

Les carcinomes in situ de type canalaire sont également de haut grade et HER2 amplifiés dans 73% des cas. Les tumeurs phyllodes malignes sont aussi souvent associées au Syndrome de Li Fraumeni. La prise en charge des patientes atteintes de cancer du sein dans ce contexte est particulière et adaptée au défaut de *TP53*. Elle inclut une contre-indication de la radiothérapie, la limitation des irradiations liées à l'imagerie, la surveillance radiologique se faisant par d'autres moyens que des mammographies. Le traitement chirurgical sera plus volontiers une mastectomie totale.

Certaines chimiothérapies cytotoxiques seront également évitées en raison du risque d'hémathotoxicité accrue en cas de syndrome de Li Fraumeni [65].

IV. Rôle de la biologie moléculaire dans le pronostic et la prise en charge du cancer de sein

L'analyse génomique est en plein essor. Des outils d'analyses moléculaires ont progressivement permis d'identifier dans un cadre clinique des mutations constitutionnelles dans de multiples gènes associés à un haut risque de cancer [74].

L'identification d'un individu portant une telle mutation permet de :

- Mettre en place des recommandations spécifiques de prise en charge en termes de surveillance et de prévention.
- Donner une valeur pronostique sur le risque de métastases à distance [75].
- Offrir aux membres de la famille un conseil génétique et de discuter une analyse génétique ciblée pour évaluer avec précision leur risque oncologique personnel ;

- **Pour les porteurs de la mutation familiale**, des mesures de surveillance et de prévention spécifiques sont discutées. Ces mesures sont habituellement basées par des recommandations internationales ou des avis d'experts et elles varient selon l'organe à risque, l'âge, le sexe, ou l'intensité du risque [5].
- **Les individus asymptomatiques** ne portant pas la prédisposition familiale pourront être rassurés : ils retrouvent alors le risque oncologique de la population générale et sont écartés des protocoles de surveillance contraignants de type « haut risque ». D'autres considérations importantes doivent également être prises en compte, telles l'attitude à l'égard des enfants, du dépistage prénatal ou préimplantatoire.

Bien que de nombreuses mutations germinales de *BRCA* (également appelées variantes de séquence) aient été rapportées à ce jour, toutes les variantes ne conduisent pas à une prédisposition au cancer. Par conséquent, l'interprétation de la signification clinique de la mutation détectée est un défi dans la pratique médicale. Pour déterminer si le variant de séquence détecté est pathogène ou non, l'American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG), en collaboration avec l'Association for Molecular Pathology et le College of American Pathologist, ont publié les directives universelles révisées pour l'interprétation des variants de séquence [76].

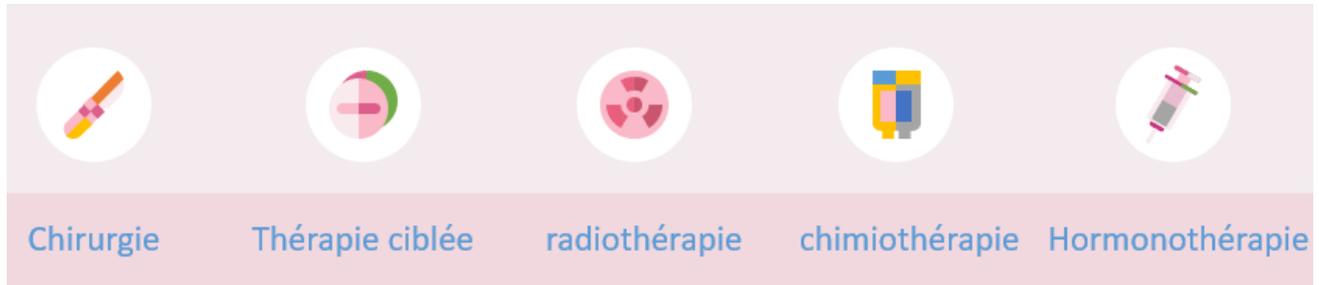
Sur la base des preuves de pathogénicité ou de bénignité, cette directive classe les variants de séquence en cinq catégories :

- pathogène,
- probablement pathogène,
- importance incertaine,
- probablement bénigne,
- bénigne.

Les principales bases de données et plates-formes contenant des informations sur les variantes *BRCA1* et *BRCA2* sont les suivantes : BRCA Exchange [77], ClinVar [78], la Human Gene Mutation Database (HGMD) [79], la Leiden Open Variation Database (LOVD) [80], le Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA (CIMBA) [81] et les preuves -Based Network for the Interpretation of Germline Mutant Allele (ENIGMA) [82].

En pratique, les variantes pathogènes et probablement pathogènes nécessitent une prise en charge médicale plus poussée, tandis que d'autres variantes ne nécessitent pas une telle intervention. Néanmoins, les variantes de signification incertaine, qui se retrouvent dans jusqu'à 20 % des tests génétiques *BRCA1 / BRCA2* [83], nécessitent un suivi pour surveiller la manifestation de la vraie nature des variantes ; par exemple, les programmes de reclassement de variantes.

Le traitement du cancer du sein nécessite une coordination étroite entre différentes disciplines médicales et paramédicales car il associe, en fonction des besoins, chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie, hormonothérapie et nouveaux traitements ciblés. Ces différents traitements peuvent être utilisés seuls ou, plus souvent, en association. [84]



La recherche et le développement des techniques de la biologie moléculaire nous permettent de prendre la voie de **la médecine personnalisée du cancer** qui est une priorité du XXI^e siècle. Le traitement est alors prescrit individuellement, en fonction de la signature génomique et des données biologiques de la tumeur ainsi que des caractéristiques du patient. L'idée est d'adapter au mieux les options thérapeutiques disponibles pour une plus grande efficacité, améliorant ainsi considérablement la qualité de vie tout en préservant les chances de guérison [85].



MATERIELS ET METHODES

C'est un travail prospectif réalisé sur une population de 21 patientes **atteintes du cancer de sein** et recrutées au service d'oncogénétique au Centre Hospitalo-Universitaire Hassan II de Fès (CHU) , chaque patiente présente une histoire **familiale ou personnelle** (Les données cliniques des patientes sont regroupées dans le tableau 5). Un prélèvement sanguin a été fait pour toutes les patientes à la recherche des mutations et des altérations génétiques responsables de ce fléau.

Tableau 5: Données cliniques des patientes recrutées pour cette étude.

<i>Patiente</i>	<i>Age</i>	<i>Antécédant familial</i>	<i>Type histologique</i>	<i>Triple négatif</i>	<i>Traitement</i>
1	40ans	Oui	Carcinome canalaire in situ	Non	Tumorectomie + radiothérapie
2	31ans	Oui	Carcinome canalaire infiltrant	Non	Patey + radiothérapie+ hormonothérapie
3	39 ans ménopausée depuis 3ans	Non	Carcinome canalaire infiltrant	Non	chimiothérapie
4	48ans	Non	Carcinome canalaire infiltrant	Oui	Chimiothérapie
5	45ans	Oui	Carcinome canalaire infiltrant	Oui	Patey
6	35ans	Oui	Carcinome canalaire in situ	Non	Tumorectomie + radiothérapie
7	37ans	Oui	Carcinome canalaire infiltrant	-	chimiothérapie
8	33ans	Non	Carcinome canalaire infiltrant	-	chimiothérapie + castration hormonale
9	36ans	Oui	Cancer du sein métastatique	Non	Chimiothérapie
10	32ans	Oui	Cancer du sein métastatique	Non	Chimiothérapie
11	49ans	Oui	Carcinome canalaire infiltrant	Non	Chimiothérapie
12	47ans	Non	Carcinome canalaire infiltrant	Oui	Chimiothérapie
13	-	-	-	-	-
14	31ans	Non	Carcinome canalaire infiltrant	Non	Chimiothérapie
15	37ans	Non	-	-	-
16	-	-	-	-	-
17	30ans	Non	Carcinome canalaire infiltrant	Non	Chimiothérapie
18	-	-	-	-	-
19	43ans	Non	Carcinome canalaire infiltrant	Oui	Patey + radiothérapie+ hormonothérapie
20	45ans	Oui	Carcinome canalaire infiltrant	Présent au niveau du sein droit. Gauche : HER2	Chimiothérapie

				scoré a 2	
21	75ans	Oui	Carcinome canalaire infiltrant	Oui	Chimiothérapie + chirurgie type sein et ovaire

La stratégie moléculaire adoptée repose sur l'extraction de l'ADN leucocytaire, un dosage par spectrophotométrie ou par fluorimétrie, l'amplification des fragments d'ADN par la technique PCR, et puis un séquençage des exons hotspots (Les exons ont été ciblés selon leurs **taille génomique importante** et donc leurs **susceptibilité de mutation**) exons 2 et 10 du gène *BRCA1* ainsi que les exons 10 et 11 du *BRCA2*, des analyses bio-informatiques avancées ont été établies afin d'exploiter les résultats moléculaires pour comprendre le rôle joué par chaque gène dans cette maladie.

I. Extraction de l'ADN génomique

L'isolement des acides désoxyribonucléiques à partir des cellules sanguines des patientes est la première étape de toute analyse moléculaire, Elle consiste en l'extraction de l'ADN génomique à partir des leucocytes en quantité suffisante et qualité satisfaisante pour accomplir les étapes qui suivent.

1. Principe

L'extraction de l'ADN génomique a été fait à l'aide du kit **PureLink™** de chez Invitrogen (référence : K1820-01, K1820-02),



son protocole est basé sur la liaison sélective de l'ADN à une membrane à base de silice en présence de sels chaotropes. Le lysat est préparé à partir du sang, les cellules sont digérées avec la protéinase K à 60°C en utilisant une formulation de tampon de digestion optimisée facilitant la dénaturation des protéines et renforçant l'activité de la protéinase K. Le lysat est mélangé à l'éthanol et au tampon de liaison génomique qui permet une forte liaison de l'ADN avec la colonne de rotation.

L'ADN se lie à la membrane à base de silice dans la colonne et les impuretés sont éliminées par lavage en profondeur avec des tampons de lavage. L'ADN génomique est ensuite élué dans du tampon d'éluion à faible teneur en sel.

2. Protocole

Dans un tube Eppendorf de 1,5ml, un volume de 200µl du sang a été mélangé avec 20µl de la protéinase k et 200µl de la solution de lyse, vortexé puis incubé pendant 10 min à 60°C. Par la suite, une série de lavages a été effectuée; à l'aide de 200µl de l'éthanol absolu dans un premier temps. Par la suite, le mélange est mis dans une colonne PureLink™ et centrifugé 1min à 8000 rpm, le filtrat qui se dépose dans le tube collecteur fourni par le kit doit être jeté à chaque fois. Un deuxième lavage se fait avec 400µl d'une solution tampon Wash Buffer1, le mélange est centrifugé 1min à 8000rpm et le culot est jeté. Le dernier lavage est réalisé avec 400µl de tampon Wash Buffer 2 et centrifugé 3min à 14000rpm.

Le résultat de lavage est mis dans un tube eppendorf de 1,5ml et 70µl de tampon d'éluion sont ajoutés. L'ensemble est incubé 1min à température ambiante. Une dernière centrifugation d'1min à 8000rpm est réalisée pour récupérer l'ADN génomique (fig.10)

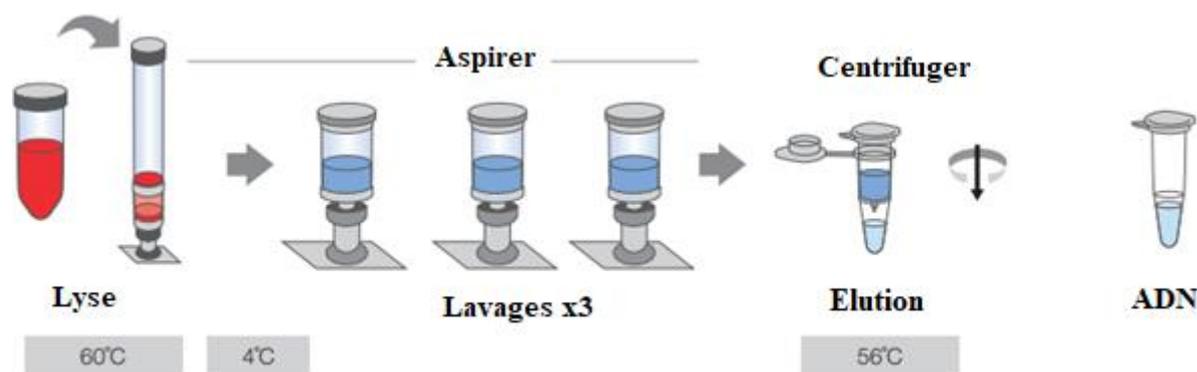


Figure 16: Protocole traditionnel d'extraction de l'ADN génomique à partir de sang à l'aide du kit PureLink™.

II. Dosage : Méthode de quantification et qualification de l'ADN

1. Dosage par spectrophotométrie : NanoDrop®

L'objectif de cette étape est de valider la qualité et la quantité de ces ADN après leur purification. Le NanoDrop® (un spectrophotomètre à micro-volume) qui mesure l'absorbance (ou densité optique) des acides nucléiques à 260 nm (absorbent dans l'ultraviolet) a été utilisé. Parallèlement on détermine leur pureté en mesurant l'absorbance à 280 nm.

Notre ADN est donc qualifié de pure si le ratio 260/280 est compris entre 1,8 – 2,0.

- Si ce rapport est >2 : Il y a contamination par les ARN,
- Si le rapport est $<1,8$: Il y a donc contamination par des protéines.

2. Dosage par fluorimétrie : Qubit

La fluorimétrie est une méthode de dosage utilisant la propriété de certaines molécules d'être fluorescente. On mesure donc la fluorescence qui est proportionnelle à la concentration.

Le Qubit quantifie l'ADN avec une précision, une sensibilité et une simplicité haute technologie.

Ce système utilise la technologie fluorimétrique spécialement conçue à l'aide de colorants (Molecular Probes) pour quantifier les biomolécules d'intérêt. Ces colorants fluorescents émettent des signaux uniquement lorsqu'ils sont liés à des molécules cibles spécifiques, même à de faibles concentrations.

La quantification de l'ADN par fluorimétrie est réalisée selon le protocole suivant

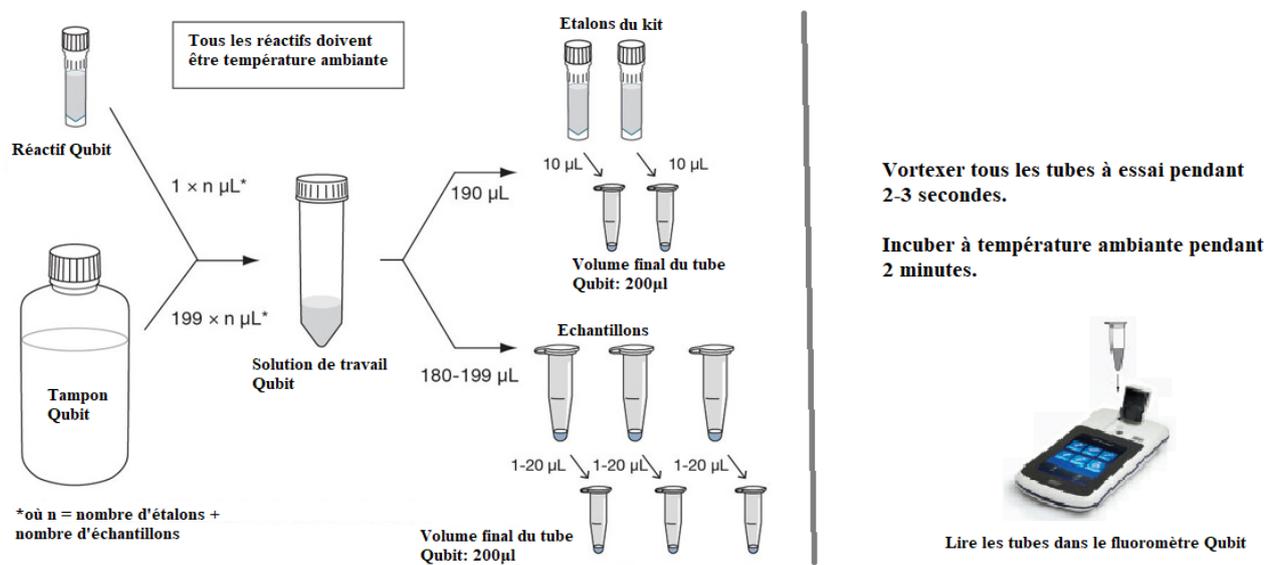


Figure 17: Protocole du dosage d'ADN sur Qubit Fluorometer.

III. PCR : Technique d'amplification en chaîne par polymérase

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique d'amplification enzymatique d'ADN in vitro. Elle permet d'obtenir une quantité suffisante et détectable d'une séquence d'ADN choisie (matrice) à partir d'un couple d'amorces spécifiques, délimitant la région à amplifier, et une ADN polymérase mimant ainsi le mécanisme de réplication de l'ADN in vivo.

Cette étude a consisté à amplifier et rechercher des mutations au niveau de deux exons du gène *BRCA1* :

- **BRCA1_2** : est d'une taille génomique de 54pb ; commençant de la position 726 vers la position 779 sur le gène. [86]
- **BRCA1_10** : qui est le plus grand exon du gène comprenant 3426pb à partir de la position 1435 jusqu'à 4860. [87]

et deux autres pour le gène *BRCA2* :

- **BRCA2_10**: la taille génomique de cet exon est de 1116pb (2272-3387) [88]
- **BRCA2_11** : 4932pb, (de 36265-41196). [89]

(Référence : UCSC Genome Browser on Human Dec. 2013 (GRCh38/hg38) Assembly)

- ✓ Pour le gène *BRCA1* : Un seul couple d'amorces a été choisi pour la détection et l'amplification de l'exon 2 et 12 couples pour l'exon 10.
- ✓ Pour le gène *BRCA2* : 3 couples d'amorces ont été utilisées pour encadrer et amplifier la totalité de l'exon 10, ainsi que 11 pour l'exon 11.

Afin de garantir la réussite de la PCR, chaque couple d'amorce a été modélisé pour permettre l'amplification de petits fragments d'ADN en optimisant au maximum la température de fusion (T_m) à 60°C. ($T_a = T_m - 5^\circ\text{C}$). les caractéristiques des couples d'amorces utilisées dans la PCR sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 6 : Amorces utilisées pour la mise en évidence des mutations des gènes *BRCA1* et *BRCA2*.

Nom de l'amorce	Séquence nucléotidique	T_m
BRCA1_2_F	5' GAA GTT GTC ATT TTA TAA ACC TTT 3'	52,5
BRCA1_2_R	5' TGT CTT TTC TTC CCT AGT ATG T 3'	66
BRCA1_10A_F	5' CCA CCT CCA AGG TGTAT 3'	56,7
BRCA1_10A_R	5' TGT TAT GTT GGC TCC TTG CT 3'	66
BRCA1_10B_F	5' CAC TAA AGA CAG AAT GAT TGT A 3'	52,8
BRCA1_10B_R	5' GAA GAA CCA GAA TAT TCA TCT A 3'	64
BRCA1_10C_F	5' TGA TGG GGA GTC TGA ATC AA 3'	55,3
BRCA1_10C_R	5' TCT GCT TTC TTG ATA AAA TCC T 3'	64
BRCA1_10D_F	5' AGC GTC CCC TCA CAA ATA AA 3'	55,3
BRCA1_10D_R	5' TCA AGC GCA TGA ATA TGC CT 3'	66
BRCA1_10E_F	5' GTA TAA GCA ATA TGG AAC TCG A 3'	54,7
BRCA1_10E_R	5' TTA AGT TCA CTG GTA TTT GAA CA 3'	65
BRCA1_10F_F	5' GAC AGC GAT ACT TTC CCA GA 3'	57,3
BRCA1_10F_R	5' TGG AAC AAC CAT GAA TTA GTC 3'	65
BRCA1_10G_F	5' GGA AGT TAG CAC TCT AGG GA 3'	57,3
BRCA1_10G_R	5' GCA GTG ATA TTA ACT GTC TGT A 3'	66
BRCA1_10H_F	5' TGG GTC CTT AAA GAA ACA AAG T 3'	54,7
BRCA1_10H_R	5' TCA GGT GAC ATT GAA TGT TCC 3'	67
BRCA1_10I_F	5' CCA CTT TTT CCC ATC AAG TCA 3'	55,9
BRCA1_10I_R	5' TCA GGA TGC TTA CAA TTA CTT C 3'	66
BRCA1_10J_F	5' CAA AAT TGA ATG CTA TGC TTA GA 3'	53,5
BRCA1_10J_R	5' TCG GTA ACC CTG AGC CAA AT 3'	68
BRCA1_10K_F	5' GCA AAA GCG TCC AGA AAG GA 3'	57,3
BRCA1_10K_R	5' TAT TTG CAG TCA AGT CTT CCA A 3'	66

BRCA1_10L_F	5' GTA ATA TTG GCA AAG GCA TCT 3'	54
BRCA1_10L_R	5' TGC TTT TGG GGA GCA CAT TTT A 3'	56,5
BRCA2_10A_F	5' CTA TGA GAA AGG TTG TGA G 3'	52,4
BRCA2_10A_R	5' AAG AAC TAG CAA GAC TAG G 3'	52,4
BRCA2_10B_F	5' AAC AGT TGT AGA TAC CTC TGA A 3'	54,7
BRCA2_10B_R	5' CAT TTC AGG GTA TCA AAA AGT C3'	54,7
BRCA2_10C_F	5' CAG CAT CTT GAA TCT CAT ACA G 3'	56,5
BRCA2_10C_R	5' CTT AGG CAT CAT CTG TAT ACA TG 3'	57,1
BRCA2_11A_F	5' AACTTAGTGAAAAATATTTAGTGA 3'	55,3
BRCA2_11A_R	5' ATGGAAAAGAATCAAGATGTAT 3'	66
BRCA2_11B_F	5' AGAACCAACTTTGTCCTTAA 3'	54,7
BRCA2_11B_R	5' TTCAACCAAAACACAAATCTAA 3'	65
BRCA2_11C_F	5' ATGGAAAAGAATCAAGATGTAT 3'	57,3
BRCA2_11C_R	5' CTCTCTGAACATAACATTAAG 3'	65
BRCA2_11D_F	5' GTGTAAAGCAGCATATAAAAAT 3'	57,3
BRCA2_11D_R	5' CAGGTAGACAGCAGCAAG 3'	66
BRCA2_11E_F	5' CCATAATTTAACACCTAGCCA 3'	54,7
BRCA2_11E_R	5' TGTCAGATTTAACTTTTTTTGG 3'	67
BRCA2_11F_F	5' AACGGACTTGCTATTTACTGA 3'	53,5
BRCA2_11F_R	5' GATGAAAAGAGCAAGGTACT 3'	68
BRCA2_11G_F	5' CAGCTAGCGGGAAAAAAGTTA 3'	57,3
BRCA2_11G_R	5' GACAAAAATCATCTCTCCGAA 3'	66
BRCA2_11H_F	5' GCCTTAGCTTTTTACACAA 3'	54
BRCA2_11H_R	5' CAACGAGAATAAATCAAAAA 3'	56,5
BRCA2_11I_F	5' CCATTAAATTGTCCATATCTA 3'	52,4
BRCA2_11I_R	5' TCTTCACTATTCACCTACGTC 3'	52,4
BRCA2_11J_F	5' GAAGATAGTACCAAGCAAGTC 3'	54,7
BRCA2_11J_R	5' GTATTAGGAACCAAAGTGTC A 3'	54,7
BRCA2_11K_F	5' GTCTTCACTATTCACCTACG 3'	53,5
BRCA2_11K_R	5' TTGTGTAGTCAGTTTGGGGG 3'	68

L'amplification a été réalisée à l'aide de deux kits différents :

1. DreamTaq Green PCR Master Mix

Le Mastermix DreamTaq Green PCR comprend :



- L'ADN Taq polymérase,
- les dNTP,
- le tampon (Buffer),
- MgCl₂
- la solution de charge (alourdisseur + marqueur de mobilité) pour le chargement direct du produit de PCR sur gel d'agarose.

Le mélange réactionnel est résumé dans le tableau suivant:

Tableau 7: Composition du milieu réactionnel pour la détection des mutations.

MELANGE POUR UN TUBE	
Mix PCR	Volume (µl)
Eau pure	12
Mastermix DreamTaq Green PCR	10
Amorce F	1
Amorce R	1
ADN	1

N.B. :

- Il ne faut pas ajouter l'ADN à l'intérieur de la salle PCR afin d'éviter toute contamination.
- En parallèle, un tube témoin négatif (Sans ADN) doit toujours être préparé pour témoigner le bon déroulement de la technique.

2. Invitrogen™ Platinum™ Taq DNA Polymerase

Tout comme l'ADN polymérase Taq, l'ADN polymérase Platinum Taq a une activité de transférase terminale dissociée de tout modèle qui ajoute la 3'-désoxyadénosine aux extrémités des produits et qui présente une activité exonucléase de 5' → 3' (mais pas d'activité exonucléase 3' → 5')

Chaque boîte contient :



- ADN polymérase Platinum *Taq* ;
- tampon PCR (sans chlorure de magnésium) ;
- chlorure de magnésium 50 mM
- les dNTPs.

Le mélange réactionnel est résumé dans le tableau suivant:

Tableau 8: Composition du milieu réactionnel pour la détection des mutations.

MELANGE POUR UN TUBE	
Mix PCR	Volume (µl)
Eau pure	15,4
Buffer	3
MgCl₂	2.4
dNTP	3
Platinum Taq	0.2
Amorce F	2
Amorce R	2
ADN	6

Le procédé d'amplification PCR nécessite la succession de nombreux cycles programmés dans un thermocycleur. Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes, effectuées à températures différentes, permettant ainsi de contrôler l'activité enzymatique:

- a) L'étape de dénaturation** (réalisée à environ 95°C) pour une dissociation complète des deux brins d'ADN. En effet, l'ADN perd sa structure caractéristique en double hélice car les liaisons hydrogènes reliant les bases de chaque brin d'ADN sont instables à cette température.
- b) L'étape d'hybridation** se fait à une température comprise entre 50°C et 60°C. Cette température est en fonction de la composition en dNTPs des amorces utilisées . Les amorces reconnaissent et se fixent spécifiquement au niveau de leurs séquences complémentaires (matrices) en reformant des liaisons hydrogène.

c) L'étape de polymérisation ou d'élongation se fait à environ 72°C, température de fonctionnement optimal de la Taq polymérase. Au cours de cette étape, les brins complémentaires à l'ADN matrice sont synthétisés à partir des extrémités 3'OH libre des amorces hybridées grâce aux dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel.

A la fin de cette étape, un nouveau cycle commence et les nouveaux fragments synthétisés servent à leur tour de matrice pour la synthèse de nouveaux fragments d'ADN. chacun des cycles connaît une phase de dénaturation, d'hybridation et d'élongation.

La réaction d'amplification PCR se déroule dans un Thermocycleur programmé de façon à réaliser 35 cycles ;

Dénaturation initiale	95°C	3min	} 35cycle
Dénaturation	95°C	30sec	
Hybridation	60°C	30sec	
Elongation	72°C	1min	
Elongation finale	72°C	9min	

Tableau 9: Condition d'amplification du gène pour les différentes amorces

Après les 35cycles, la réaction se termine par une phase d'élongation terminale. Cette réaction se déroule en 2 heures au maximum. Le produit PCR est par la suite récupéré et vérifié par électrophorèse.

IV. Electrophorèse sur gel d'agarose : Analyse de l'ADN amplifié

6µl du produit PCR a été déposé afin de réaliser une électrophorèse à 2% du gel d'agarose et la visualisation des bandes d'ADN a été fait par exposition à des rayons UV à l'aide d'un Transluminateur ; Après exposition aux rayonnements ultraviolets, le bromure d'éthidium devient fluorescent avec une couleur rouge orangé (20 fois plus intense lorsqu'il est lié à l'ADN).

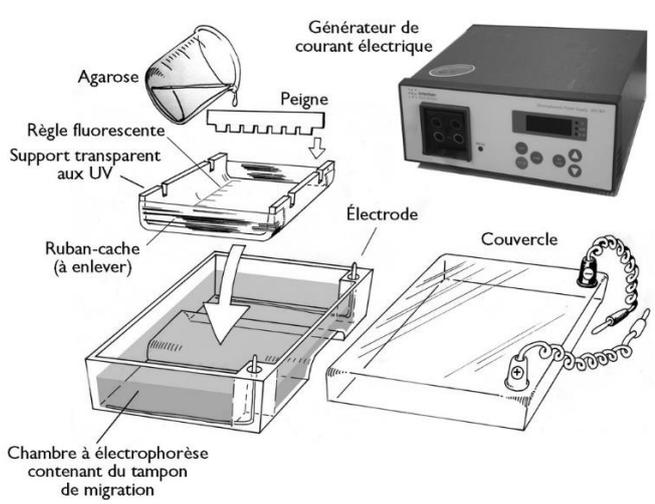


Figure 18 : Dispositif de migration pour l'électrophorèse de l'ADN.

Si la PCR est satisfaisante, on procède au séquençage dans le but de détecter les mutations génétiques.

V. Séquençage par Sanger : Applied Biosystems (3500 Series Genetic Analyzer)

Le séquençage de Sanger repose sur le procédé de la réplication de l'ADN. Les scientifiques font des copies de brins d'ADN. Ensuite, ils notent les nucléotides ajoutés. Ainsi, ils peuvent observer la séquence des nucléotides.

Protocole :

Le Flux de travail du séquençage consiste en cinq étapes majeures :

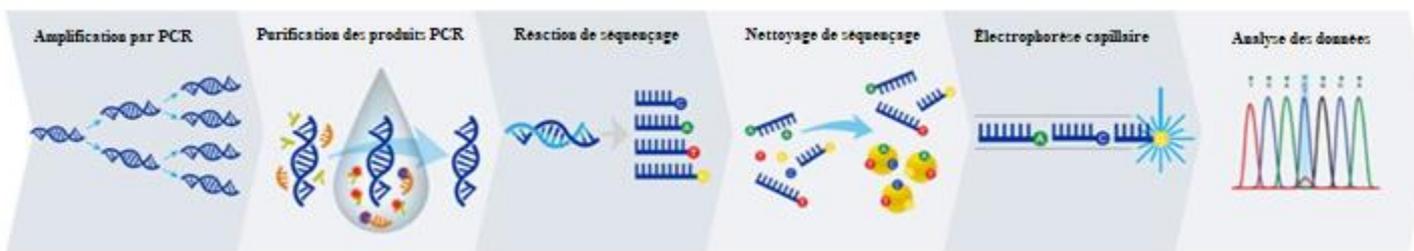


Figure 19 : Les étapes du séquençage par Sanger.

1. Purification des produits de la PCR

La première étape du séquençage est la purification, les produits PCR doivent subir un traitement à l'**exoSAP** (Exonuclease and Shrimp alkaline phosphatase) qui contient deux enzymes hydrolytiques, l'**exonucléase I** et la **phosphatase alcaline**.

- **L'exonucléase I** supprime les amorces simples brin résiduelles et tous les ADNs simple brin étrangers produits dans la PCR.
- **La phosphatase alcaline** supprime les dNTPs restant dans le mélange de la PCR.

Pour la purification de nos produits PCR, 2,5µl d'exoSAP étaient ajoutés directement à 5.5µl de produit PCR et le tout était incubé à 37°C pendant 5 min. Le réactif ExoSAP était ensuite inactivé par un simple chauffage à 80°C pendant 1 min.

2. Réaction de séquençage par BigDye® Terminator V3.1

Principe : La réaction de séquençage que nous utilisons au laboratoire d'oncogénétique et biologie moléculaire au CHU Fès repose sur la méthode de SANGER ou méthode des interrupteurs de chaîne. Le principe de ce séquençage est de réaliser, à partir d'amorces, des copies incomplètes d'une molécule d'ADN (matrice), interrompues au hasard. L'interruption est provoquée par l'incorporation aléatoire lors de la copie, d'un didésoxyribonucléotide (ddNTP) couplé à un marqueur fluorescent (ou fluorophore), qui bloque la réaction de PCR.

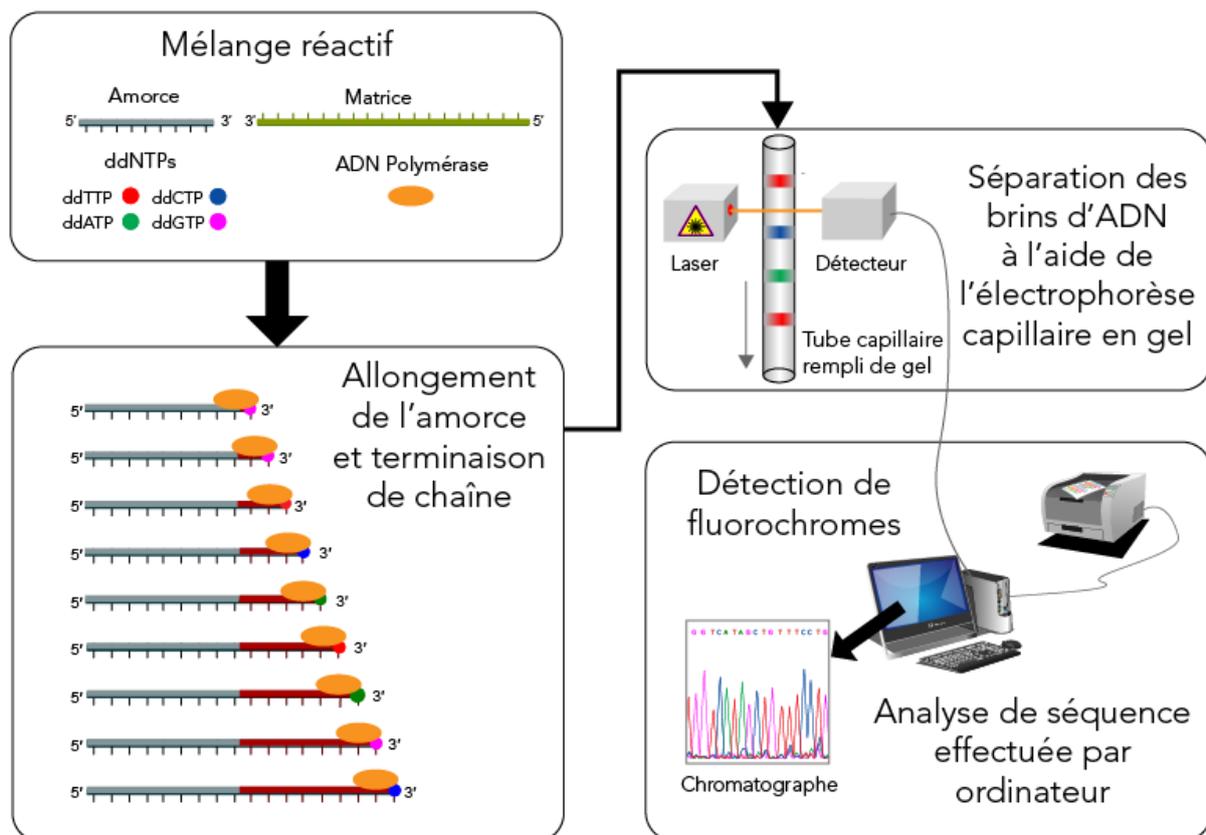


Figure 20 : Le processus automatisé du séquençage de l'ADN par Sanger.

Comme nous travaillons sur un très grand nombre de molécules de matrice (amplicons), nous obtenons toutes les copies partielles possibles. Les différents fragments sont ensuite séparés selon leur taille par électrophorèse capillaire. Le fluorophore étant différent selon la base, il est possible d'identifier le nucléotide au niveau duquel la copie s'est interrompue et reconstituer la succession des nucléotides tout au long de la copie. De ce fait, tous les fragments d'ADN synthétisés porteront ce fluorophore terminal appelé terminateur d'élongation ou "BigDyeTerminator".

La technologie BigDyeTerminator (BDT) utilise un système de transfert d'énergie par résonance (FRET) entre deux fluorochromes fixés sur le même ddNTP et reliés entre eux par un linker. Le

premier est une fluorescéine (6-carboxyfluorescéine) appelé fluorochrome donneur, commun aux quatre ddNTP. Le second est une dichlororhodamine (dRhodamine) qui joue le rôle de fluorochrome accepteur (figure). Le fluorochrome donneur est excité par un rayon laser à argon émettant à 488nm et 514,5nm. Son énergie de fluorescence émise (515-520nm) est captée intégralement par le fluorochrome accepteur qui est excité à son tour. Le fluorochrome accepteur ou dichloroRhodamine est différent pour chaque type de ddNTP (tableau).

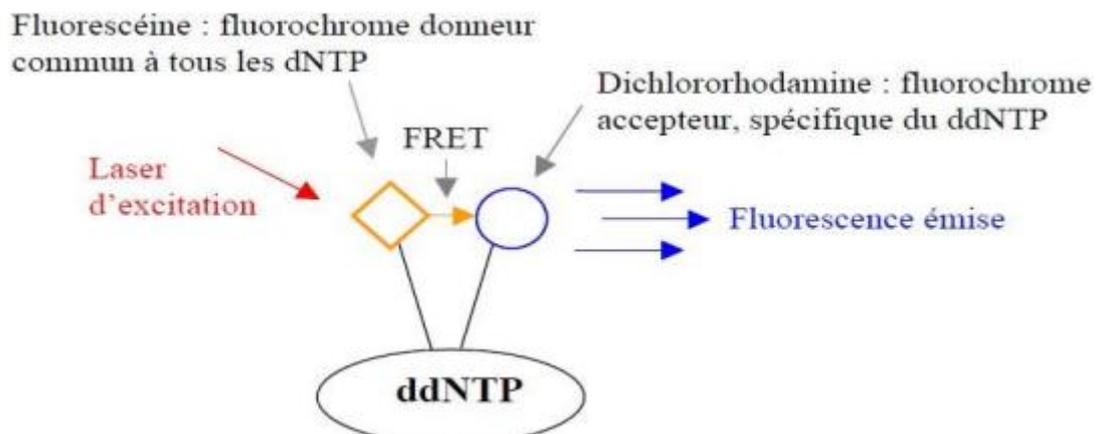


Figure 21: Mécanisme de la fluorescence par la technique du transfert d'énergie par résonance.

Tableau 10 : Spectre d'émission des dichloroRhodamines spécifiques de chaque type de ddNTP.

ddNTP	DichloroRhodamines utilisées	Spectre d'émission Maximum
A	dR6G	560-565nm
T	dROX	615-620nm
C	dR110	530-535nm
G	dTAMRA	590-595nm

Le spectre de la fluorescence réémise sera ainsi spécifique de chaque type de ddNTP. Le transfert du signal de la fluorescéine vers la dRhodamine permet une amplification du signal et par conséquent, une augmentation de la sensibilité de la technique.

La composition du mix réactionnel de la PCR de séquence ainsi que les conditions de programmation sont résumées dans les tableaux suivants :

Tableau 11 : Composition du mix de PCR de séquence

Réactifs	Volume (µl)
Eau stérile	4
Amorce F	1
Produit PCR purifié	4
Big Dye terminator V3.1	1

Tableau 12 : Programmation de la PCR de séquence.

	Températures	Temps
25 cycles	96°C	1 min
	95°C	10 sec
	50°C	5 sec
	60°C	5 min
	8°C	∞

3. Purification des produits de séquençage et détermination de la séquence

Une fois la réaction de séquence effectuée, il est nécessaire de procéder à une purification des produits de séquence. Nous utilisons pour cela le kit BigDye® Xterminator™ composé de deux flacons : un contenant la « Solution SAM » (Sequence Alignment/Map) et l'autre la « Solution XTerminator ». Ce kit permet la capture des dyes non incorporés dans la réaction de séquence, les sels et autres molécules chargées pouvant interférer lors de la détection des bases par électrophorèse capillaire. Nous ajoutons pour cela 45µl de la solution SAM et 10µl de la solution XTerminator à 10µl de produits de la réaction de séquençage. Après avoir vortexé le mélange à 1800rpm pendant 30min, les tubes sont centrifugés à 100000rpm pendant 3min. Ensuite, 15µl du surnageant de chaque tube sont pipetés et déposés dans une plaque. Celle-ci est placée au niveau du séquenceur automatique 3500Dx (Applied Biosystems) disponible au niveau du laboratoire. Les

électrophérogrammes sont ensuite analysés à l'aide du logiciel **Sequencing Analyzing** et comparées aux bases de données.

VI. Analyse bio-informatique des séquences

Dans le but de comprendre le rôle des mutations des gènes dans la cascade de carcinogenèse du cancer du sein. Des analyses avancées doivent être réalisées en utilisant des outils et logiciels bio-informatiques (Etude *in silico*). Après plusieurs essais, une méthodologie de recherche a été mise en place permettant d'analyser et exploiter les résultats obtenus par le séquenceur sanger.

1. Alignement

La première étape après obtention des résultats du séquençage est l'alignement de notre output avec la séquence du gène de référence.

L'outil le plus commun qui donne une forte sensibilité d'alignement est le **BLAST** (Basic Local Alignment Search Tool ou l'outil de recherche d'alignement local de base), **Nucleotide BLAST** (blastn) plus précisément. Il nous permet de trouver les régions de similarité locale entre les séquences. Le programme compare et donne une évaluation statistique de la pertinence de l'alignement du résultat de séquençage avec la séquence nucléotidique de référence publiée dans les banques de données.

Les transcrits des gènes de références ont été obtenus à partir de la base de donnée **CCDS** de **NCBI**, et la navigation au niveau des différents exons deux gènes a été possible à l'aide de **UCSC**.

2. Recherche de la mutation dans la littérature

ClinVar et **BRCA exchange** sont les deux outils utilisés dans notre étude pour la recherche des significations des mutations trouvées. Ce sont des archives publiques, accessibles gratuitement, de rapports sur les relations entre les variations et les phénotypes humains.

Ils nous permettent de rechercher si la mutation est déjà citée dans une étude précédente ou bien il nous faut plus d'analyse afin de conclure sa nature.

3. Traduction et alignement de la protéine

Dans cette étude, **Expasy**, un outil qui permet la traduction d'une séquence nucléotidique (ADN/ARN) en une séquence protéique, a été utilisé. La séquence protéique obtenue a été alignée à

l'aide de **BLASTp** et les sites de mutations des acides aminés ont été déterminées et comparées avec celles de référence.

4. Modélisation de la structure 2D de la protéine

Afin d'élucider l'impact de l'ensemble des substitutions des acides aminés chez chaque patiente sur la fonction des deux protéines BRCA1 et BRCA2, un modèle de structure secondaire a été prédit à partir des séquences protéiques à l'aide des deux outils bio-informatique **PSIPRED 4.0** et **PDBsum** ;

PSIPRED 4.0 est une discrimination de superfamille et de prédiction de structure secondaire simple et sensible, combinant les informations de la séquence et de la structure pour produire des alignements de domaine très précis. Il a été utile dans l'analyse et la comparaison entre la structure mutée et la structure de référence des régions bien définies de la protéine. Il nous a aidés majoritairement dans la reconnaissance et la prédiction des limites des domaines et de la nature des structures liées à chaque a.a. grâce aux options : **pDomTHREADER**, **DomPred** et **DOMSSEA**.

PDBsum dans l'autre part fournit les informations nécessaires sur la structure secondaire des protéines, les interactions protéine-ligand et protéine-ADN ainsi que les analyses de qualité structurale en comparaison avec la banque de données des protéines PDB.

Cette étape va nous permettre de conclure la présence ou l'absence des altérations dans les domaines et les sites d'interaction provoquant donc un changement de fonction de la protéine.

5. Modélisation de la structure 3D de la protéine

Les séquences de référence ont été téléchargées à partir de la banque de données des protéines **PDB data base**.

La modélisation de la structure tertiaire a été établie à l'aide des pipelines **Robetta**, **ALPHAFOLD2** et **I-TASSER** (classé comme le serveur n°1 dans CASP7, CASP8, CASP9 et CASP10) pour la modélisation d'homologie, par la suite la qualité stéréochimique des modèles obtenus en format pdb a été vérifiée en utilisant **SAVES V6.0** (Structural Analysis and Verification Server) ; serveur de validation de structure. La structure 3D obtenue a été comparée à celle de référence à l'aide de l'outil de modélisation par homologie **SWISS-MODEL**. **Pymol** et **Discovery Studio** ont été utilisées pour la visualisation des sites d'interactions avec d'autre protéine et pour une analyse plus avancée des structures 3D obtenues.



Résultats et discussion

Ce travail a été accepté par le comité d'éthique de la recherche au Maroc.

1. Epidémiologie descriptive des patientes étudiées

Nous avons collecté l'ensemble des informations cliniques concernant les 21 patientes atteintes du cancer de sein et recrutées au service d'oncogénétique. La majorité des patientes avaient un carcinome canalaire infiltrant avec des exceptions de carcinome canalaire in situ et de cancer métastatique. L'âge, la présence d'un antécédant familial, triple négatif ainsi que le traitement reçu sont les facteurs les plus intéressants pour notre étude.

En prenant compte le facteur sexe, il n'y avait aucun patient de sexe masculin dans notre étude, ceci est normal puisque les tumeurs du sein chez les hommes sont rarement décrites dans la littérature (<1%). Cette rareté s'expliquerait par le caractère atrophique de la glande mammaire [18].

Selon nos données (voir la figure), l'âge au diagnostic d'un carcinome mammaire est en moyenne de 38 ans avec des extrêmes de 30 à 49 ans (exception d'une seule patiente diagnostiquée à l'âge de 75ans). Ceci concorde avec plusieurs études dans la littérature nord-africaine sur le cancer du sein héréditaire [90] [91], [92] ; il touche principalement les jeunes femmes en Afrique du Nord par rapport aux pays occidentaux, cette différence d'incidence peut être expliquée par la présence d'un dépistage à grande échelle dans les pays occidentaux et son absence en Afrique du Nord notamment chez les femmes de plus de 50 ans (le groupe cible des programmes de dépistage organisé en Europe) en addition des conditions de vie. Une autre étude a recommandé d'ajuster la fréquence du dépistage en fonction de l'âge de la femme en plus d'un test semestriel de haute sensibilité approprié avant l'âge de 40 ans [93].

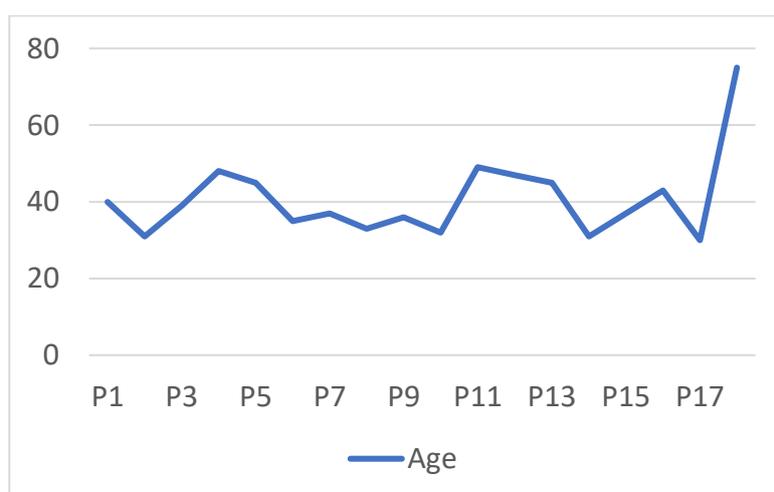


Figure 22 : Age des patientes au diagnostic.

Parmi les femmes ayant eu un cancer, 10 avaient des antécédents familiaux porteurs de la maladie, 8 n'en n'avaient pas et 3 manquaient les données cliniques. Dans une étude menée entre 2009 et 2015 publiée récemment, dans six centres en Égypte, en Tunisie et au Maroc, il a été conclu que les antécédents familiaux de cancer du sein, ainsi que des problèmes mammaires de type inflammatoire, un traumatisme mammaire et un faible statut socio-économique étaient associés à un risque accru de développer un carcinome mammaire [94].

Dans cette étude, 13 patientes ont été diagnostiquées par un carcinome mammaire infiltrant, 2 patientes avec un carcinome mammaire métastatique, 2 in situ. Parmi eux, un nombre relativement faible des patientes représentaient un cancer du sein triple négatif TNBC (5 parmi les 21 patientes) chose qui concorde avec la littérature puisque le TNBC représente environ 10 à 20 % de tous les cancers du sein. [95] [96]. Il est suggéré d'intégrer les prédictors génomiques de la maladie et les caractéristiques épidémiologiques des sous-types de cancer du sein moléculaire afin de fournir une évaluation des risques, un dépistage et un traitement personnalisés pour chaque patiente.

2. Séquençage des produits PCR purifiés des deux gènes *BRCA1* et *BRCA2*

Les produits amplifiés ont été séquencés afin de mettre en évidence la présence ou l'absence des mutations touchant l'exon 2 et l'exon 10 du gène *BRCA1*, ainsi que les exons 10 et 11 du gène *BRCA2*. Le tableau suivant correspond aux résultats du séquençage des deux gènes *BRCA1* et *BRCA2* ainsi que les polymorphismes détectés au cours de cette étude.

Tableau 13 : Résultats du séquençage.

Patiente	<i>BRCA1</i>				<i>BRCA2</i>			
	Exon2	Exon10		Exon10		Exon11		
		ADN	Acide aminé	ADN	Acide aminé	ADN	Acide aminé	
1	-	981 A>G 2081 C>T 2614 C>T 2734 A > G 3023 G > A 3549 A > G	694 S>F 912 R>G 1008 G>D	-	-	-	-	
2	-	1067 A > G 2614 C > T 2807 T>C 3114 A > G 3549 A > G 4564 A>G	356 S>C 872 P>S 936 L>P 1522 S>G	-	-	3807 T>C 4563 A>G 7841T>C	- - 2614 L>P	

3	-	981 A > G 2082 C > T 2311 T > C 2612 A > T 2734 A > G 2115 A > G 3023 G > A	771 C > R 871 K > M 912 R > G 1008 G > D	-	-	3396 A > G 4563 A > G	- -
4	-	2077 G > A 2082 C > T 2614 C > T 2115 A > G 3119 G > A 3549 A > G	693 V > M 872 P > S 1040 G > E	1788 T > C	-	3807 T > C 4563 A > G	- -
5	-	2077 G > A 2081 C > T 2610 C > T 2115 A > G 3119 G > A 3549 A > G	693 V > M 694 S > F 1040 G > F	-	-	3396 A > G 3989 A > T 4563 A > G 6513 G > C 7841 T > C	- 1330 N > I L2614P
6	-	1070 A > G 2081 C > T 2610 C > T 3114 A > G	357 E > G 694 S > F 697 A > V	-	-	4563 A > G 6513 G > C 3807 T > C 6511 G > C	- - - 2171 V > L
7	-	2090 C > T 2612 C > T 3113 A > G 3549 A > G	694 S > F 697 A > V	-	-	3807 T > C 6511 G > C 4563 A > G 6513 G > C	- 2171 V > L - -
8	-	1100 A > G 2092 C > T 2612 C > T 3113 A > G 3549 A > G	367 D > G 871 S > L 1038 Y > C 1138 E > G	-	-	3395 A > G 4563 A > G 6513 G > C	- - -
9	-	1429 G > C 2077 G > A 2081 C > T 2311 T > C 2610 C > T 3114 A > G 3549 A > G	171 S > R 477A > P 693 V > M 694 S > F	1151 C > T 1114 A > C	- -	1907 C > T 3396 A > G 3460 A > G 4563 A > G 6513 G > C	372 N > H 384 S > F 637 G > L
10	-	2081 C > T 2614 C > T 3113 A > G	694 S > F 872 P > S 1005 N > D	-	-	4563 A > G 6513 G > C	- -
11	-	2081 C > T 2614 C > T 3113 A > G 2222 T > C	694 S > F 872 P > S 1005 N > D 741 V > A	-	-	4563 A > G 6513 G > C	- -
12	-	2614 C > T 3119 G > A	872 P > S 1040 G > R	-	-	6513 G > C	-
13	-	-	-	-	-	4563 A > G 6513 G > C	- -
14	-	2081 C > T 2614 C > T 3113 A > G 3549 A > G	694 S > F 872 P > S 1005 N > D 1138 E > G	-	-	6513 G > C	-
15	-	2081 C > T 2614 C > T 3113 A > G 3549 A > G	694 S > F 872 P > S 1005 N > D 1138 E > G	-	-	6513 G > C	-

16	-	2081 C > T 2303 T > A 2311 T > C 2459 A > G 2612 A > T 3113 A > G 3549 A > G	694 S>F 768 I>N 771 C>R 820 Q>R 871 K>M 1005 N>D 1138 E>G	-		4563 A>G 6513 G>C	- -
17	-	2081 C > T 2612 A > T 3113 A > G 3418 A>G 3549 A > G	694 S>F 1138 E>G 1005 N>D	-		3199 A>G	1067 T>A
18	-	2521 C>T 3119 G>A	841 H>Y 1040 G>E	-		9340A>G	3114 I>V
19	-	2077 G > A 2081 C > T 2612 A > T 3113 A > G 3549 A > G	693 V>M 694 S>F 871 K>M 1005 N>D -	-		2971A>G	991 N>D
20	-	2077 G > A 2081 C > T 2612 A > T 3113 A > G 3549 A > G	693 V>M 694 S>F 871 K>M 1005 N>D -	-		4563 A>G 3167A>G	- 1056 Q>R
21	-	947 A>C 2081 C > T 2612 C > T 3113 A > G 3549 A > G	316 N> H 694 S>F 871 K>M 1005 N>D -	-		906 C>T 3396 A>G	- -

Alignement de la séquence nucléotidique: BlastN

Nous avons aligné les résultats obtenus par le séquenceur sanger avec la séquence de référence afin de confirmer notre cible recherché et analysé. Le résultat de blast de *BRCA1* et de *BRCA2* obtenu a révélé un pourcentage d'identité élevé, il est respectivement de 99,89% et de 99,97% (voir annexe 1 et 2). Ceci confirme aussi la bonne qualité de notre technique de séquençage et donc nous pouvons poursuivre notre étude.

Analyse des résultats

Bien que de nombreuses mutations germinales de *BRCA 1/2* (également appelées variantes de séquence) aient été rapportées, toutes les variantes ne conduisent pas à une prédisposition au cancer. Ainsi, la détermination du variant pathogène ou non est nécessaire pour l'interprétation de la signification clinique de la mutation détectée. La recherche avancée dans la littérature est donc un défi dans la pratique médicale. Dans notre cas, pour *BRCA1* ; seul un variant a été mentionné cliniquement non significatif (ou de signification incertaine) en juin 2020

([NM_007294.4\(BRCA1\):c.2081G>A \(p.Ser694Asn\)](#)). Les autres variants détectés chez les 21 patientes n'ont été cités jusqu'à l'heure actuelle dans aucune publication (sur *ClinVar* et *BRCA exchange*).

Le séquençage de l'exon 2 du gène *BRCA1* chez les 21 patientes atteintes du cancer de sein n'a pas donné de résultat, au contraire à l'exon10 sur lequel nous avons trouvé un nombre de variants de 29 ; avec un intervalle de 2-7 mutations chez chaque patiente. La majorité des mutations trouvées provoquent des changements d'acides aminés (mutation de substitution), alors qu'il existe d'autres mutations silencieuses. Nous avons aussi remarqué la présence de polymorphismes dispersés chez la population étudiée. Le tableau ci-dessous regroupe les positions mutées selon leurs abondances chez l'ensemble des patientes (par ordre décroissant).

Tableau 14: Les variants trouvés dans le gène *BRCA1*.

Variant	Pourcentage*
3549 A > G	14,43%
2081 C> T	13,40%
3113 A > G	11,34%
2614 C>T 2612 A> T	8,24%
2077 G > A	5,15%
3119 G > A	4,12%
3114 A > G 2115 A > G 2610 C > T 2311 T >C	3,09%
981 A>G 2734 A > G 3023 G > A 2082 C>T	2,06%
1070 A > G 2090 C > T 1100 A > G 2092 C > T 1429 G>C 2222 T > C 2303 T> A 2459 A>G 3418 A>G 2521 C>T 947 A>C 4564 A>G 2807 T>C 1067 A > G	1,03%

*Le nombre des répétitions / Le nombre totale des variants (94).

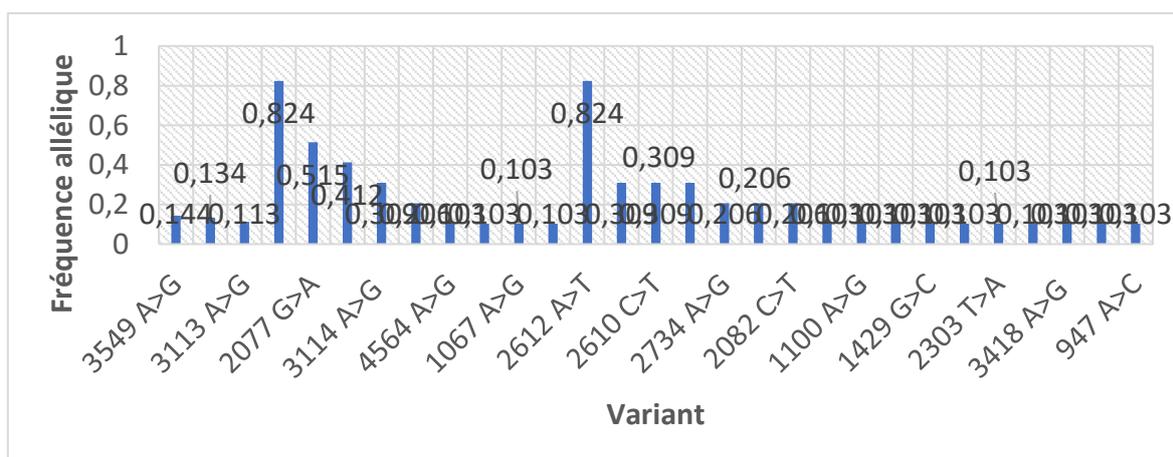


Figure 23: Fréquences alléliques des variants *BRCA1*.

Les mutations les plus fréquentes dans notre population avec un pourcentage de **82%** ont été : la substitution du Cytosine dans la position 2614 en Thymine et la substitution de l'Adénine dans la position 2612 en Thymine. La substitution retrouvée dans la littérature dont la signification pathologique est incertaine avaient une fréquence de 13,40% dans notre population. (2081 Guanine en Adénine).

L'analyse du séquençage de l'exon 10 du gène *BRCA2* a montré la présence de 3 variants germinaux chez deux patientes alors que pour l'exon 11 du gène nous avons trouvés 46 mutations sous forme de substitution chez les 21 patientes. En ce qui concerne la recherche bio-informatique sur *ClinVar* nous avons conclu que quatre sont des variants non significatifs sur le plan pathologique : [NM_000059.3\(BRCA2\):c.3199A>G \(p.Thr1067Ala\)](#)(Oct18,2019), [NM_000059.4\(BRCA2\):c.7841T>C\(p.Leu2614Pro\)](#)(Jan7,2021), [NM_000059.3\(BRCA2\):c.9340A>G \(p.Ile3114Val\)](#) (Jan 7, 2021), [NM_000059.3\(BRCA2\):c.3167A>G \(p.Gln1056Arg\)](#) (Jan 7, 2021)) et une seule variation qui a été considérée bénigne : [NM_000059.4\(BRCA2\):c.2971A>G \(p.Asn991Asp\)](#) (Sep 20, 2021). Ces variants peuvent s'agir de variants faux-sens ou de petites délétions ne décalant pas le cadre de lecture, de variants introniques ou exoniques pouvant éventuellement affecter un site d'épissage ou de variants pouvant toucher une zone régulatrice.

Tableau 15 : Les variants trouvés dans le gène *BRCA2*.

Variant	Pourcentage*
4563 A>G	28,26%
6513 G>C	26,08%
3807 T>C 3396 A>G	8,69%
7841T>C 6511 G>C	4,34%
3989A>T 3395A>G 1907C>T 3460A>G 3199A>G 9340A>G 2971A>G 3167A>G 906 C>T	2,17%

*Le nombre des répétitions / Le nombre totale des variants (46).

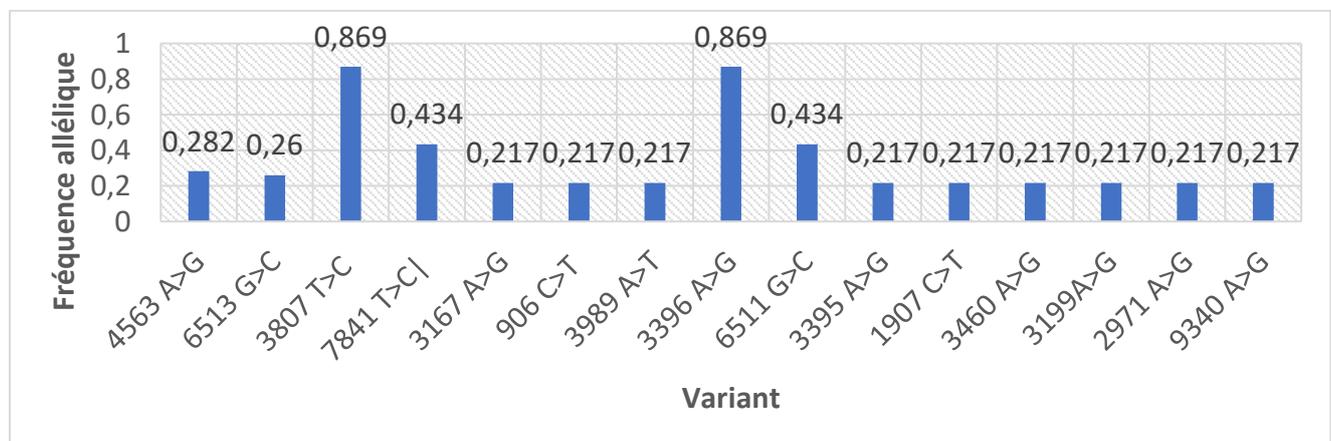


Figure 24: Fréquences alléliques des variants *BRCA2*.

Les mutations les plus fréquentes dans notre population avaient un pourcentage de 86 presque **87%** (3807T>C et 3396A>G). Les 4 variants non significatifs retrouvée au niveau de ce gène avaient une fréquence de **43%** pour la substitution T>C 7841, et 21% pour les autres, avec la même fréquence pour l'allèle bénin. La majorité de ces mutations provoquent des changements d'acides aminés, alors qu'il existe d'autres mutations silencieuses qui n'avais aucun impact sur la séquence au cours de la traduction. La modification d'un seul acide aminé dans la séquence d'une protéine peut entraîner une altération significative de sa structure et affecter sa fonction biologique dans une large mesure.

Les délétions ainsi que les insertions détectées et discutées dans plusieurs études, semblent indétectables au niveau des exons ciblés et analysés dans notre cas. Cette absence est probablement liée à un problème technique , d'où l'importance d'analyse des 2 gènes en entier par séquençage de nouvelle génération (NGS). Par ailleurs, le nombre des patientes est très restreint, d'où l'idée d'élargir la population pour confirmer le type d'anomalie génétique. A l'occasion, ces variants incertaines, en raison de leur conséquence sur la fonction protéique et de leur fréquence populationnelle, peuvent être réévalués comme polymorphismes ou mutations délétères, d'où l'importance d'une analyse pointue en bio-informatique qui peut confirmer si les mutations retrouvées peuvent avoir des conséquences pathologiques dans notre population.

3. La structure 2D des protéines BRCA1 et BRCA2

Avec l'avancement des technologies, on assiste à un afflux continu de nouvelles variantes dans différents gènes. Cependant, les informations sur l'impact clinique de ces variants manquent encore. Pour éviter le travail laborieux et coûteux d'investigation des conséquences structurelles et fonctionnelles de tous les nouveaux polymorphismes (SNP), l'analyse in-silico offre la possibilité de prédire leur résultat. Dans l'étude actuelle, plusieurs outils in-silico ont été utilisés pour étudier l'impact structurel et fonctionnel des SNPs dans BRCA1 et BRCA2 et son application dans les mécanismes cellulaires ; Le positionnement d'une variation au sein d'un domaine de liaison avec d'autres protéines peut altérer leurs interactions et donc avoir des conséquences sur une des fonctions biologiques de la protéine (BRCA1 et BRCA2 dans notre étude) ce qui pourrait déclencher un cancer. Dans le même sens et pour confirmer cette hypothèse, une traduction de la séquence nucléotidique par *ExPASy* pour la patiente qui représente le nombre le plus important des polymorphismes a été fait. Par la suite la séquence protéique a été modélisée par *PSIPRED* et alignée avec la séquence de référence en utilisant *PDBsum* (ID PDB : A1Ce).

La protéine BRCA1

La séquence nucléotidique de la patiente 16 a été traduite pour être étudiée et la modélisation avec *PSIPRED* 4.0 a permis de prédire la nature de la structure secondaire de notre séquence permettant de visualiser les acides aminés appartenant à chaque domaine. (figure22)

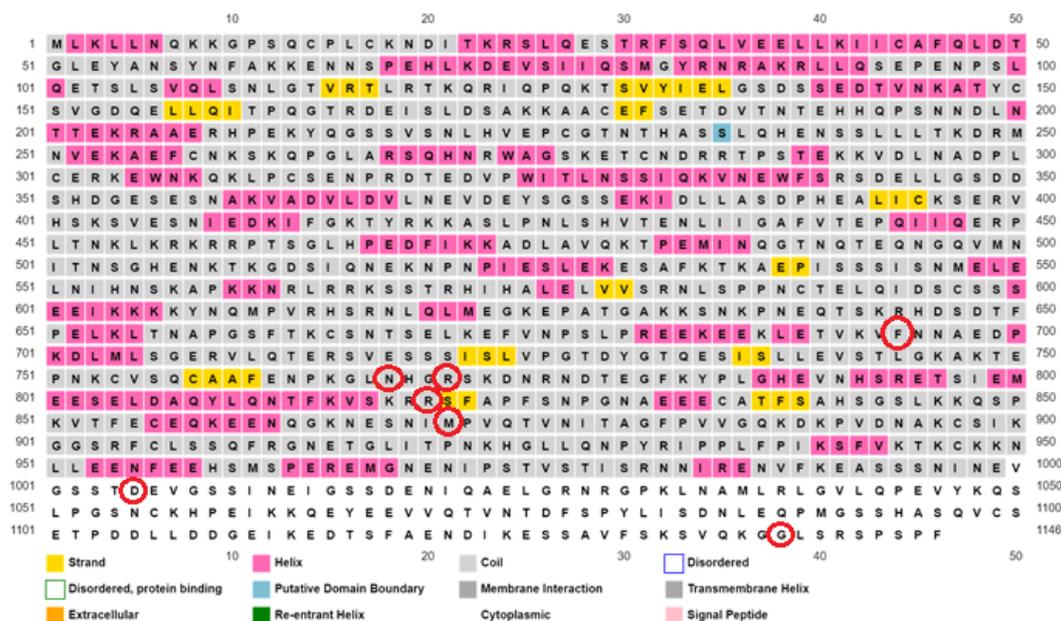


Figure 25 : Éléments de structure secondaire prédits par résidu de l'exon 10 du gène *BRCA1* chez la patiente 16.

Parmi les 7 variants trouvées chez la patiente 16 (entourés en rouge dans la figure), 5 des acides aminés substitués se trouvent au niveau d'une structure de type 'coil' ou bobine ; c'est un domaine hélicoïdal enroulé, un type de structure secondaire composée de deux ou plusieurs hélices alpha qui s'entrelacent pour former une structure de câble. Dans les protéines, les câbles hélicoïdaux jouent un rôle mécanique dans la formation de faisceaux rigides de fibres. La structure des 2 autres régions n'a pas été déchiffré par l'outil, mais nous avons pu conclure que la protéine n'est pas transmembranaire, chose qui concorde avec la littérature en ce qui concerne la nature de la protéine BRCA1.

L'alignement avec *PDBsum* a donné un pourcentage d'identité avec la protéine de référence (PDB ID : A1Ce) de **99,6%** et un pourcentage d'identité avec la structure des domaines brca1 brc1 en complexe avec un ligand (PDB ID : 4y2g) : **100%**.

Le résultat de structure secondaire de BRCA1 sauvage (PDB ID : A1Ce) modélisée à l'aide de l'outil *PDBsum* nous a permis de visualiser les différents domaines de la protéine.

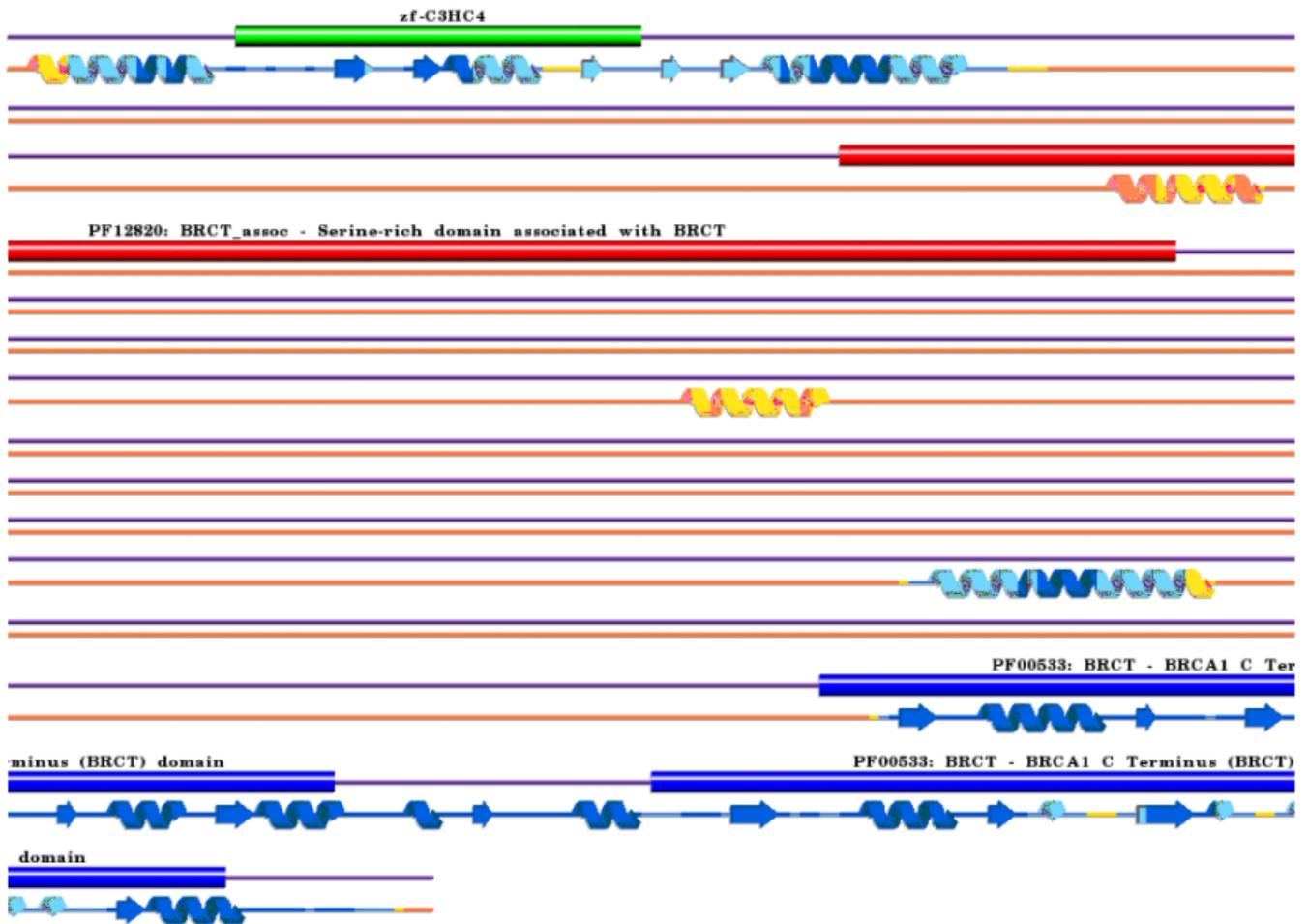


Figure 26 : Diaphragme de domaine du gène *BRCA1* (Modélisation de la structure secondaire par *PDBsum*). L'ensemble des polymorphismes détectés chez la patiente 16 dont la structure est de type bobine sont positionnés au niveau du domaine *BRCT* (*BRCA1* C-Terminus) .

Notre résultats concorde parfaitement avec la littérature [97] (*BRCA1* possède une région BRCT riche en sérine et en structure de type bobine enroulée en amont du domaine). Les domaines BRCT ont été impliqués dans les interactions protéiques indépendantes de la phosphorylation, la liaison à l'ADN et la liaison au poly(ADP-ribose). Plusieurs études ont également rapporté qu'une quantité énorme de mutations associées au cancer sont trouvées dans les domaines BRCT. Il existe plus de 100 mutations distinctes identifiées dans le domaine BRCT de *BRCA1*. La modification d'un seul acide aminé dans la séquence d'une protéine peut entraîner une altération significative de sa structure et affecter sa fonction biologique dans une large mesure. [98] [99]

La protéine *BRCA2*

De la même manière, la séquence nucléotidique de la patiente 9 a été traduit pour étudier l'exon10 et l'exon11 du gène *BRCA2*. La modélisation et l'alignement de la structure 2D de la protéine *BRCA2*

avec *PSIPRED* 4.0 et *PDBsum* avec un pourcentage de d'identité de **99,9%** (ID PBD : A1N0) sont mentionnés ci-dessous :

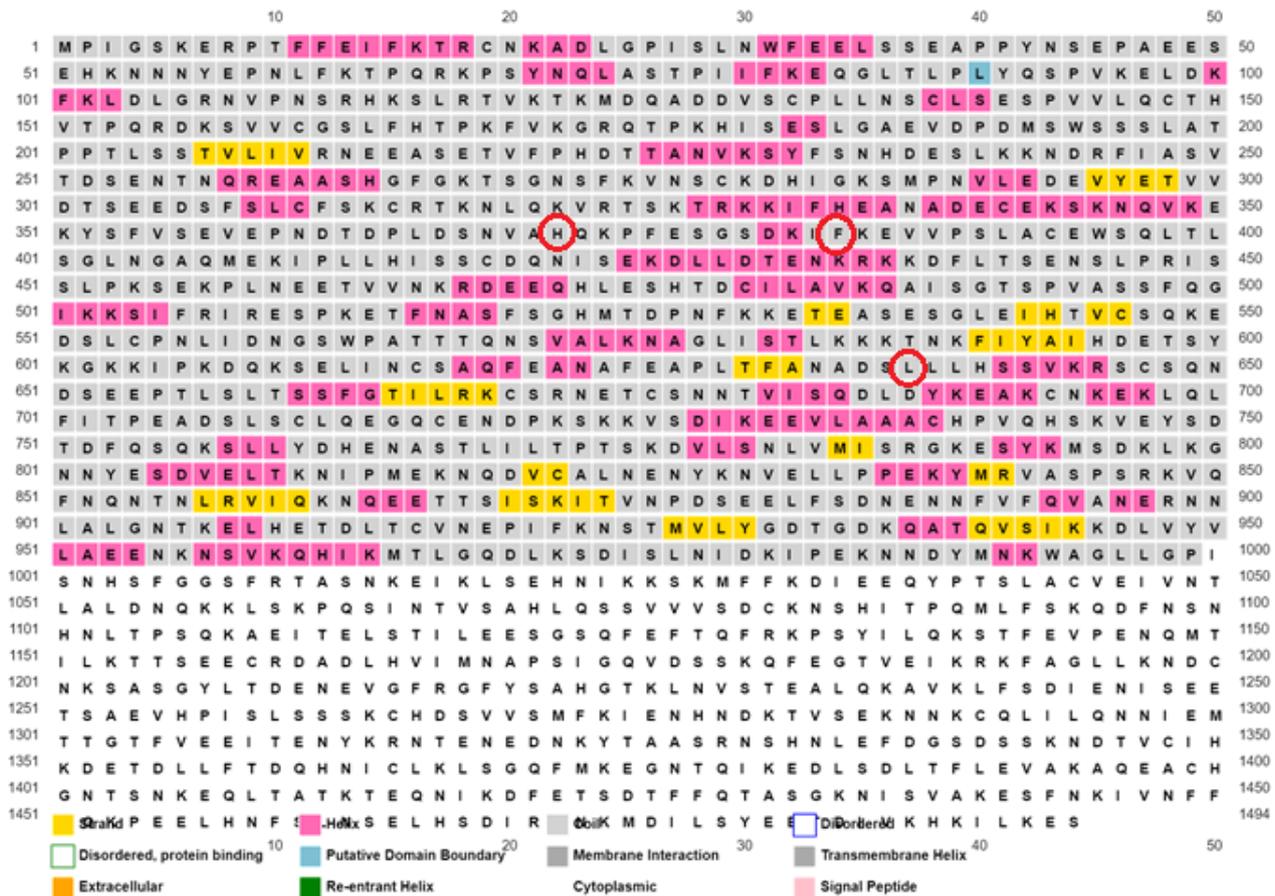


Figure 27 : Annotation de la séquence protéique des exons 10 et 11 du gène *BRCA2* chez la patiente 9 par *PSIPRED*.

Les variants détectés chez cette patiente sont positionnés dans les extrémités des domaines du gène *BRCA2*, toutes de structure de type 'coil', ils peuvent être des simples polymorphismes comme ils peuvent avoir un rôle dans les interactions entre les protéines. Il faut donc analyser les acides aminés substitués afin de prédire leurs impacts sur les protéines cibles.

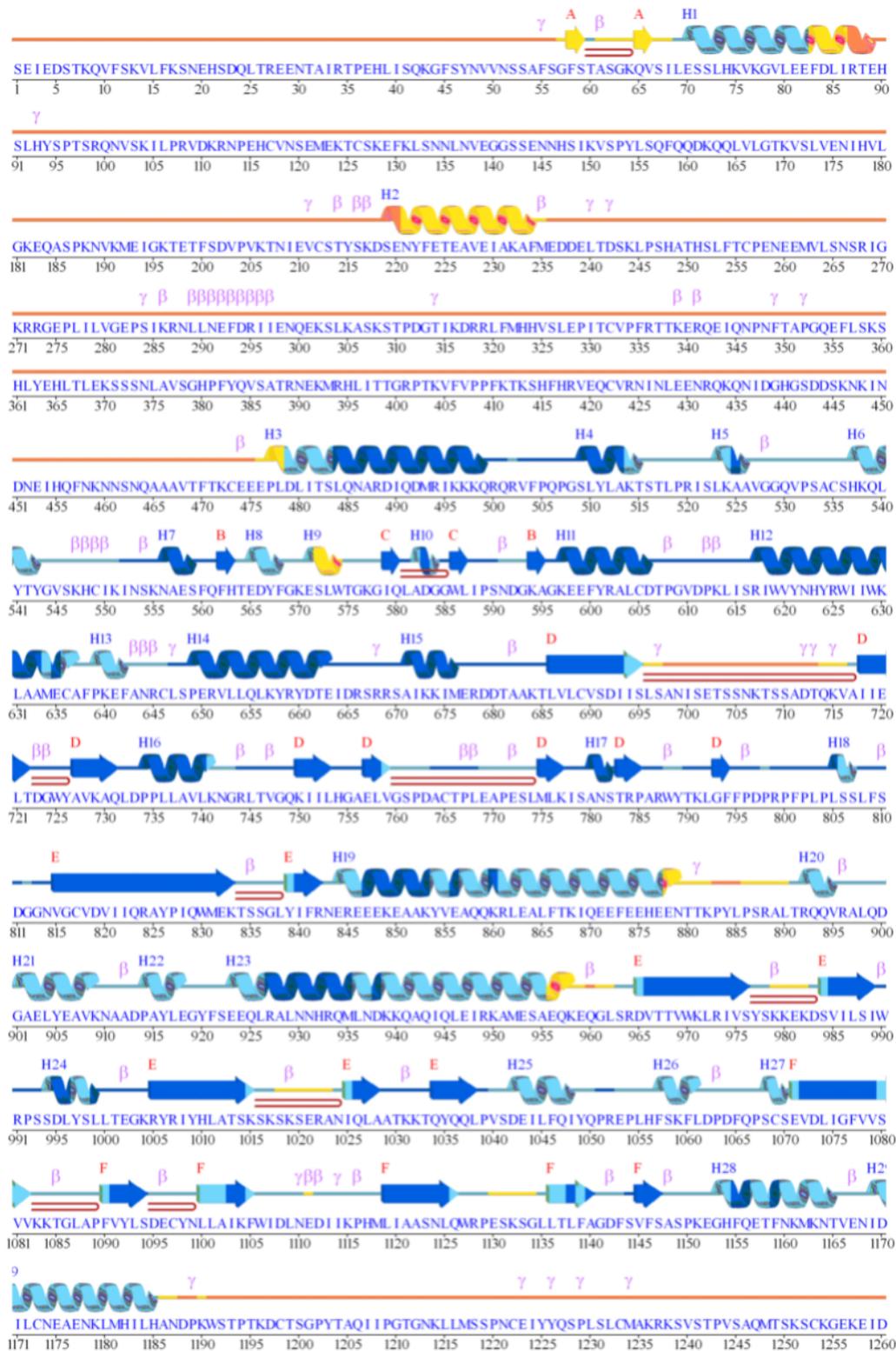


Figure 28 : La structure 2D de la protéine BRCA2 (ID PDB : A1N0).

Les acides aminés jouent un rôle crucial dans la structure, le métabolisme et la physiologie des cellules de tous les êtres vivants connus, en tant que constituants des peptides et des protéines. Ils sont regroupés en quatre groupes en fonction des propriétés de leur chaîne latérale. La substitution d'un acide aminé avec un autre du même groupe n'a normalement aucune influence sur les

interactions des protéines, mais si la protéine est substituée par un acide aminé de groupe différent dans ce cas-là elle peut aboutir à des conséquences physiologiques ou même pathologique.

Tableau 16: Les propriétés chimiques des acides aminés originales et substituées chez la patiente16 (*BRCA1*).

Acide aminé original		Acide aminé substitué	
Nomenclature	Propriétés chimiques	Nomenclature	Propriétés chimiques
S (Sérine)	Polaire, non chargé	F (Phénylalanine)	Aromatique
I (Isoleucine)	Aliphatique	N (Asparagine)	Polaire, non chargé
C (Cystéine)	Non polaire	R (Arginine)	Polaire, chargé +
Q (Glutamine)	Polaire, non chargé	R (Arginine)	Polaire, chargé +
K (Lysine)	Polaire, chargé +	M (Méthionine)	Non polaire
N (Asparagine)	Polaire, non chargé	D (Aspartate)	Polaire, chargé -
E (Glutamate)	Polaire, chargé -	G (Glycine)	Aliphatique

Tous les acides aminés substitués ont des propriétés chimiques différentes par rapport au originaux, cette altération de charge ainsi que le caractère hydrophobe des résidus dans le domaine BRCT peut perturber le mécanisme de réparation de l'ADN de *BRCA1* puisque la protéine doit se plier avec précision pour remplir efficacement ses fonctions. **Les résidus hydrophobes jouent un rôle important dans le repliement d'une chaîne protéique et sa stabilisation.**

Tableau 17 : Les propriétés chimiques des acides aminés originales et substituées chez la patiente9 (*BRCA2*)

Acide aminé original		Acide aminé substitué	
Nomenclature	Propriétés chimiques	Nomenclature	Propriétés chimiques
S (Sérine)	Polaire, non chargé	F (Phénylalanine)	Aromatique
N (Asparagine)	Polaire, non chargé	H (Histidine)	Polaire, chargé +
C (Cystéine)	Non polaire	T (Tyrosine)	Polaire, non chargé
G (Glycine)	Aliphatique	L (Leucine)	Aliphatique
A (Alanine)	Aliphatique	C (Cystéine)	Non polaire

Plusieurs études ont exploré l'impact clinique des SNPs [100] [101], [102]. La prédiction par analyse in-silico est importante pour réduire le nombre des SNPs potentielles afin d'économiser du temps et de l'argent avant de procéder à des expériences en laboratoire. D'autres études dans le même sens ont observé que des variants potentiellement délétères étaient regroupés dans les domaines RING et BRCT de *BRCA1*. Ils ont réalisé des études in-silico pour la détermination des SNPs dans les gènes *BRCA* et ont identifié plusieurs variants. Ces résultats indiquent que les données d'essais fonctionnels validés peuvent avoir un impact substantiel sur la classification des SNPs et la prise en

charge clinique associée pour de nombreuses personnes présentant des altérations héréditaires de *BRCA*.

4. La structure 3D de la protéine BRCA1

La structure cristalline des domaines BRCT du BRCA1 humain (dans un complexe avec un peptide phosphorylé d'acétyl-CoA carboxylase 1 humaine de 16a.a.) est téléchargée à partir de la banque de donnée des protéine *PDB* (ID : 3COJ), les petites molécules ont été enlevés à l'aide de *DISCOVERY STUDIO*, les différents aspects de la protéine ont été visualisé et le diaphragme 2D nous permet de prédire quelques résidus d'interactions avec le ligand. Le modèle de la structure 3D du domaine BRCT de BRCA1 et son diaphragme 2D de liaison avec Acétyl-CoA carboxylase 1 au niveau des chaines I,J,K,L,M,N,O et P par *DISCOVERY STUDIO* figure dans l'image suivante.

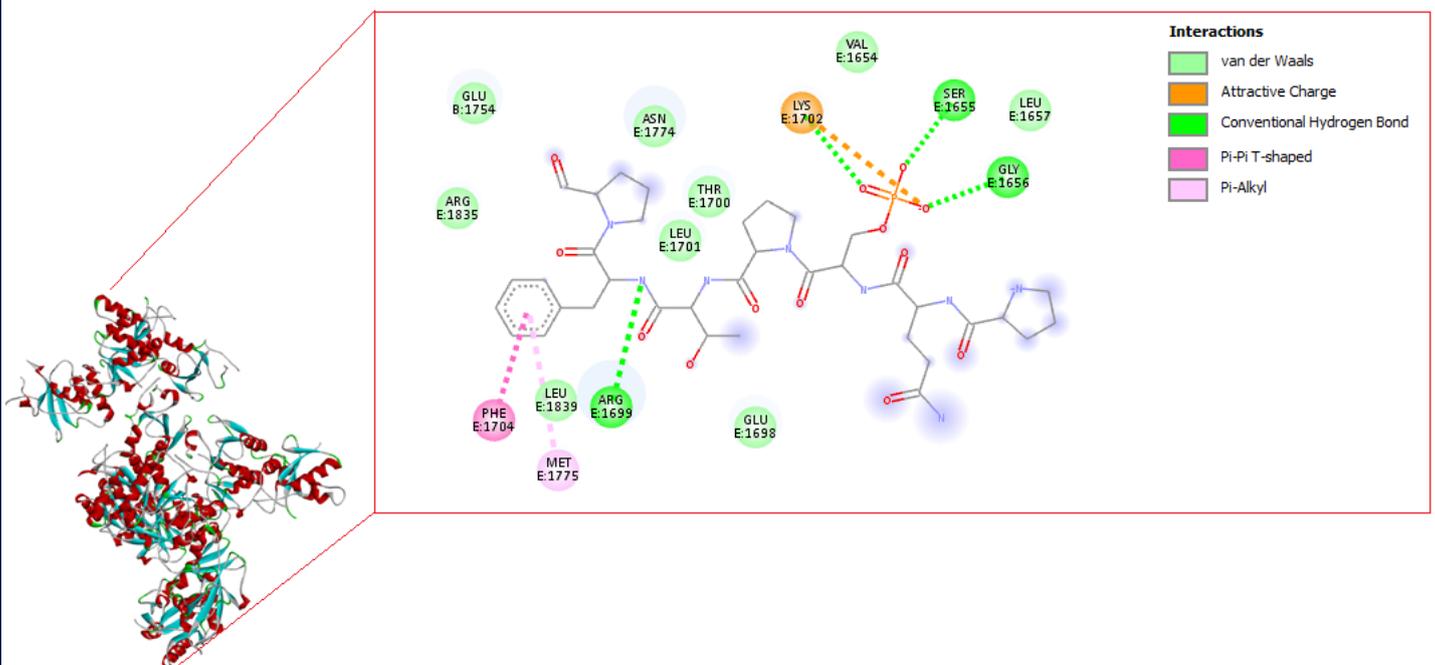


Figure 29 : Modèle de la structure 3D du domaine BRCT de BRCA1 en liaison avec Acétyl-CoA carboxylase 1 par *DISCOVERY STUDIO*.

Souvent, les complexes de protéines sont au cœur de nombreux processus cellulaires. Une description détaillée de leurs interactions et de la structure quaternaire globale est essentielle pour une compréhension globale des systèmes biologiques, du fonctionnement des complexes et des réseaux protéiques. La prédiction de la structure 3D de la protéine BRCA1 chez la patiente16 par *Robetta* a donnée 5 modèles (figure) que nous avons évalués à l'aide de *SAVES* et les résultats n'étaient pas si satisfaisante (figure), cela peut être expliqué par la longueur importante de la protéine.

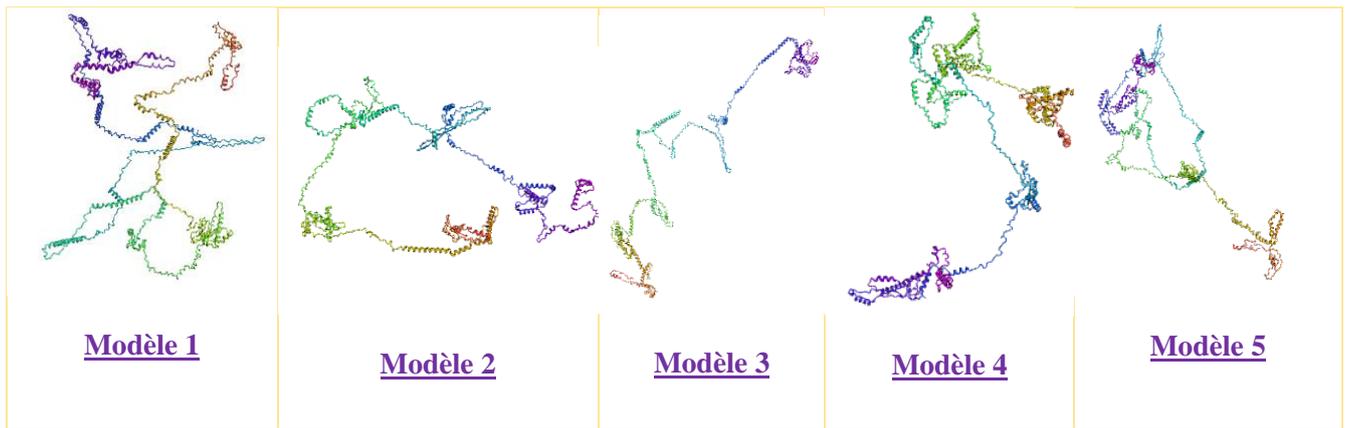


Figure 30: Les résultats de prédiction de la structure 3D de BRCA1 par *Robetta*.

<p>VÉRIFIER Terminé</p> <p>16,08 % des résidus ont un score moyen 3D-1D $\geq 0,2$</p> <p>Échouer</p> <p>Moins de 80% des acides aminés ont un score $\geq 0,2$ dans le profil 3D/1D.</p>	<p>PROCHECK terminé</p> <p>Sur 9 évaluations</p> <ul style="list-style-type: none"> • Erreurs : 5 • Avertissement : 0 • Passe : 4
---	---

Figure 31: Qualification des modèles *Robetta* pas *SAVES*.

Un deuxième essaie a été réaliser à l'aide de l'outil *ALPHAFOLD2*, et cet essai a échoué comme affiché dans la figure. Ce problème est causé par la taille importante de la protéine qui rend sa modélisation difficile et pour le faire il faut avoir la version pro.

```

AlphaFold2.ipynb
Fichier Modifier Affichage Insérer Exécution Outils Aide Impossible d'enregistrer les modifications

+ Code + Texte Copier sur Drive

Gather input features, predict structure
Afficher le code

running model_1
-----
UnfilteredStackTrace Traceback (most recent call last)
<ipython-input-5-af48741e914e> in <module>()
     50     model_params=model_params, use_model=use_model,
--> 51     do_relax=use_amber)

-----
UnfilteredStackTrace: RuntimeError: RESOURCE_EXHAUSTED: Out of memory while trying to allocate 28951696632 bytes.

The stack trace below excludes JAX-internal frames.
The preceding is the original exception that occurred, unmodified.

-----

The above exception was the direct cause of the following exception:

RuntimeError Traceback (most recent call last)
/usr/local/lib/python3.7/dist-packages/jax/interpreters/xla.py in _execute_compiled(compiled, avals, handlers, kept_var_idx, *args)
     958     for i, x in enumerate(args)
     959         if x is not token and i in kept_var_idx:
--> 960     out_bufs = compiled.execute(input_bufs)
     961     check_special(xla_call_p.name, out_bufs)
     962     return [handler(*bs) for handler, bs in zip(handlers, _partition_outputs(avals, out_bufs))]

RuntimeError: RESOURCE_EXHAUSTED: Out of memory while trying to allocate 28951696632 bytes.

```

Figure 32: Les résultats de prédiction de la structure 3D de BRCA1 par *ALPHAFOLD2*.

Un dernier essai de modélisation de la structure tertiaire de la protéine BRCA1 a été effectué en utilisant *I-TASSER* qui a donné des structures d'une qualité exploitable (figure). Le C-score est un score de confiance pour estimer la qualité des modèles prédits par I-TASSER, il est calculé en fonction de l'importance des alignements. C-score est généralement dans la plage de [-5,2]. Dans notre cas, le modèle 4 est celui avec la valeur C-score la plus élevée, et c'est en fait celui qui représente plus de similitude à la structure de référence.

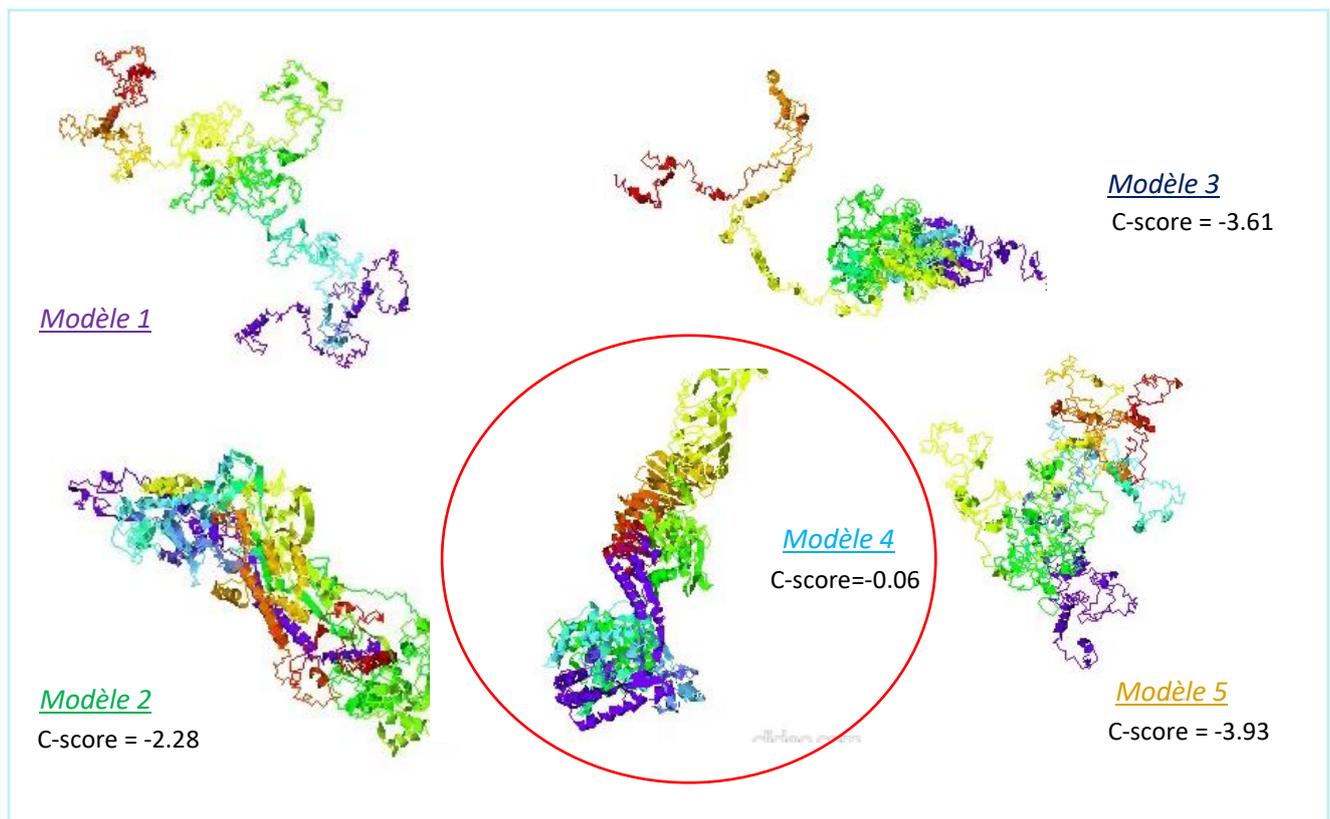


Figure 33: Les modèles prédits de la structure 3D de BRCA1 par *I-TASSER*.

5. La structure 3D de la protéine *BRCA2*

Le modèle tridimensionnel de la protéine *BRCA2* chez la patiente9 est construit à l'aide du serveur web de bio-informatique structurale *SWISS-MODEL* (modélisation automatique et rapide des structures des longues séquences protéiques). Et le pourcentage d'identité été de 72,80% avec la structure de référence de *BRCA2* (PDB ID : 1iyj.1.B).

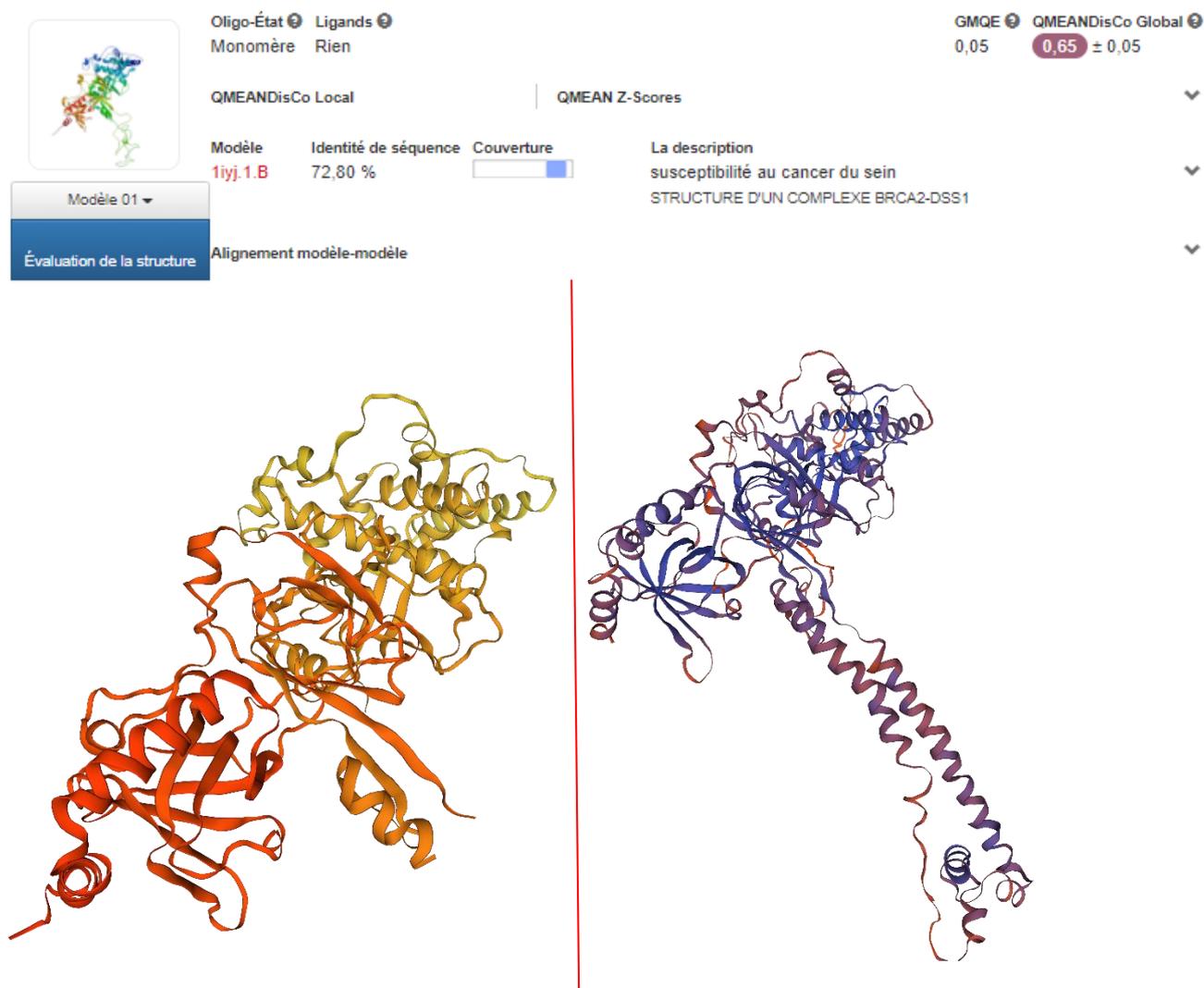


Figure 34 : La structure 3D de la protéine sauvage (En gauche), et la structure en violet est le model 3D prédit à partir des données de la patiente9.

L'évaluation de **Ramachandran** a favorisée la qualité de la prédiction du modèle donc on peut le prendre en considération pour la comparaison. A l'œil nu on peut visualiser la différence entre la structure normale et celle mutée, nous avons par la suite fait une comparaison au niveau structurale a l'aide de l'outil 'structure comparaison' de **swiss-model** qui permet de superposer les structures tri-dimensionnelles afin de trouver les différences entre les modèles ;

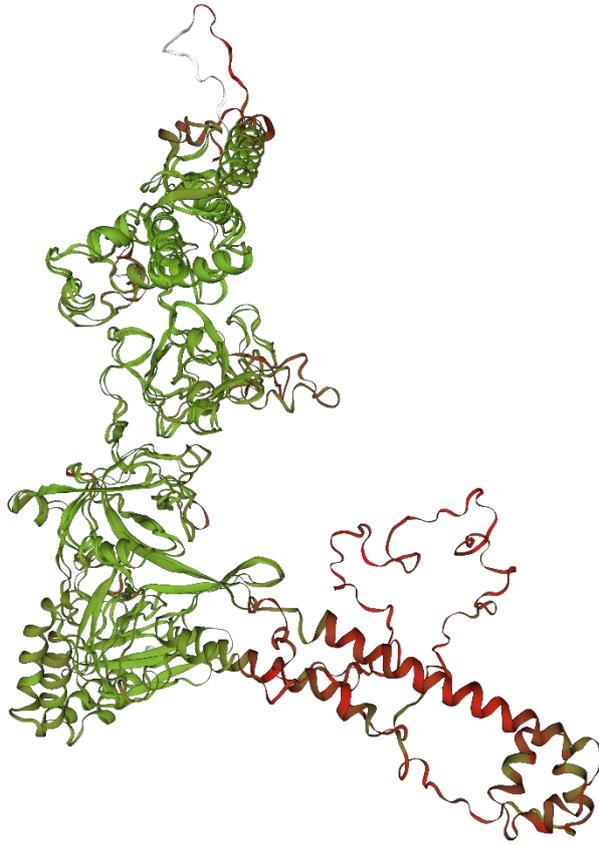


Figure 35 : Comparaison Structure-Structure par swiss-model.

Les structures en rouge sont celles non superposées ceci peut être expliquée par le fait que les liaisons entre les acides aminés ont été interrompus chose qui a changé la conformation générale de la protéine. La substitution de 5 acides aminés (N372H, S384 F, G637 L, C1151 T, A1114 C) dans les exons 10 et 11 a altéré le repliement de la protéine *BRCA2*.



Conclusion et perspectives

L'ADN, support de notre information génétique, est sans cesse soumis à des stress susceptibles de l'endommager, qui peuvent être endogènes tel le stress oxydatif issu du métabolisme cellulaire ou exogènes. Les gènes *BRCA1* et *BRCA2* sont des gènes suppresseurs de tumeurs qui jouent le rôle de « caretakers ». Ils favorisent la réparation du matériel génétique par recombinaison homologue, afin de maintenir la stabilité génomique. Une défaillance dans ce système peut aboutir à des conséquences pathologiques qui peuvent être transmises dans les générations qui suivent. L'identification des mutations pénétrantes dans les gènes *BRCA1* et *BRCA2* a eu de vastes implications pour les femmes à risque et leurs familles, pour les professionnels de la santé qui s'occupent de ces personnes et pour les chercheurs fondamentaux. Avec l'avancement des technologies, on assiste à un afflux continu de nouvelles variantes dans différents gènes, plus de centaines de mutations dans les deux gènes sont documentées jusqu'à l'heure actuelle. Cependant, les informations sur l'impact clinique de quelques variants manquent encore. Pour éviter le travail laborieux et coûteux d'investigation des conséquences structurelles et fonctionnelles de tous les nouveaux polymorphismes (SNP), l'analyse in-silico offre la possibilité de prédire leur résultat. Dans l'étude actuelle, une méthodologie de travail à l'aide de plusieurs outils in-silico a été mise en place pour étudier l'impact structurel et fonctionnel des SNPs dans les exons 2 et 10 du *BRCA1* et 10 et 11 du *BRCA2* issus par séquençage de Sanger (SGS) et son application dans les mécanismes cellulaires en admettant que le reste des exons est intacte, chose qui ne peut pas être confirmée sans analyse du gène en entier, d'où la nécessité d'adopter l'usage d'un séquenceur de nouvelle génération (NGS) afin d'évaluer correctement le statut mutationnel dans le cancer du sein et détecter les mutations des gènes dans plusieurs exons simultanément.

Liste des références

- [1] « Human hg38 chr13:32315508-32400268 UCSC Genome Browser v420 ». https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr13%3A32315508%2D32400268&hgsid=1170026549_u2SDEeaHdka4IYRHx8IF8JgZKIJq (consulté le sept. 21, 2021).
- [2] « Centre International de Recherche sur le Cancer | Cancer et environnement ». <https://www.cancer-environnement.fr/172-Centre-International-de-Recherche-sur-le-Cancer.ce.aspx> (consulté le oct. 20, 2021).
- [3] C. Garnis, T. P. Buys, et W. L. Lam, « Genetic alteration and gene expression modulation during cancer progression », *Molecular Cancer*, vol. 3, n° 1, p. 9, mars 2004, doi: 10.1186/1476-4598-3-9.
- [4] C. Sawan, T. Vaissière, R. Murr, et Z. Herceg, « Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer », *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 642, n° 1, p. 1-13, juill. 2008, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2008.03.002.
- [5] V. Viassolo, A. Ayme, et P. O. Chappuis, « Cancer du sein : risque génétique », *Imagerie de la Femme*, vol. 26, n° 2, p. 95-104, juin 2016, doi: 10.1016/j.femme.2016.04.009.
- [6] D. Ang *et al.*, « Novel Mutations in Neuroendocrine Carcinoma of the Breast: Possible Therapeutic Targets », *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, vol. 23, n° 2, p. 97-103, févr. 2015, doi: 10.1097/PDM.0b013e3182a40fd1.
- [7] B. A. Howard et B. A. Gusterson, « Human Breast Development », *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, vol. 5, n° 2, p. 119-137, avr. 2000, doi: 10.1023/A:1026487120779.
- [8] C. S. Potten *et al.*, « The effect of age and menstrual cycle upon proliferative activity of the normal human breast », *Br J Cancer*, vol. 58, n° 2, p. 163-170, août 1988, doi: 10.1038/bjc.1988.185.
- [9] L. C. Hartmann *et al.*, « Understanding the Premalignant Potential of Atypical Hyperplasia through Its Natural History: A Longitudinal Cohort Study », *Cancer Prev Res*, vol. 7, n° 2, p. 211-217, févr. 2014, doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-13-0222.
- [10] A. L. Kierszenbaum, *Histologie et biologie cellulaire: Une introduction à l'anatomie pathologique*. De Boeck Supérieur, 2006.
- [11] V. Lavoué *et al.*, « Tumeurs bénignes du sein : recommandations pour la pratique clinique du Collège national des gynécologues et obstétriciens français (CNGOF) – Texte court », *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction*, vol. 44, n° 10, p. 1049-1064, déc. 2015, doi: 10.1016/j.jgyn.2015.09.033.
- [12] J. L. Connolly et S. J. Schnitt, « Benign breast disease. Resolved and unresolved issues », *Cancer*, vol. 71, n° 4, p. 1187-1189, févr. 1993, doi: 10.1002/1097-0142(19930215)71:4<1187::aid-cncr2820710402>3.0.co;2-v.
- [13] P. L. Fitzgibbons, D. E. Henson, et R. V. Hutter, « Benign breast changes and the risk for subsequent breast cancer: an update of the 1985 consensus statement. Cancer Committee of the College of American Pathologists », *Arch Pathol Lab Med*, vol. 122, n° 12, p. 1053-1055, déc. 1998.
- [14] L. C. Hartmann *et al.*, « Benign Breast Disease and the Risk of Breast Cancer », *New England Journal of Medicine*, vol. 353, n° 3, p. 229-237, juill. 2005, doi: 10.1056/NEJMoa044383.
- [15] « Types of Breast Cancer: Non-Invasive, Invasive and More », *Breastcancer.org*, juill. 29, 2021. <https://www.breastcancer.org/symptoms/types> (consulté le août 07, 2021).
- [16] W. D. Dupont et D. L. Page, « Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease », *N Engl J Med*, vol. 312, n° 3, p. 146-151, janv. 1985, doi: 10.1056/NEJM198501173120303.
- [17] V. Andolina et S. Lillé, *Mammographic Imaging: A Practical Guide*. Lippincott Williams & Wilkins, 2011.
- [18] « Breast Cancer Causes and Known Risk Factors: Genetics, Hormones, Diet, and More ». <https://www.webmd.com/breast-cancer/what-causes-breast-cancer> (consulté le août 10, 2021).

- [19] M. C. Pike, D. V. Spicer, L. Dahmouch, et M. F. Press, « Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk », *Epidemiol Rev*, vol. 15, n° 1, p. 17-35, 1993, doi: 10.1093/oxfordjournals.epirev.a036102.
- [20] D. R. Ciocca et M. A. Fanelli, « Estrogen Receptors and Cell Proliferation in Breast Cancer », *Trends in Endocrinology & Metabolism*, vol. 8, n° 8, p. 313-321, oct. 1997, doi: 10.1016/S1043-2760(97)00122-7.
- [21] M. A. Fanelli, L. M. Vargas-Roig, F. E. Gago, O. Tello, R. L. De Angelis, et D. R. Ciocca, « Estrogen receptors, progesterone receptors, and cell proliferation in human breast cancer », *Breast Cancer Res Tr*, vol. 37, n° 3, p. 217-228, oct. 1996, doi: 10.1007/BF01806503.
- [22] N. S. El Saghir *et al.*, « Trends in epidemiology and management of breast cancer in developing Arab countries: A literature and registry analysis », *International Journal of Surgery*, vol. 5, n° 4, p. 225-233, août 2007, doi: 10.1016/j.ijso.2006.06.015.
- [23] « SFSPM_2010_56.pdf ». Consulté le: août 11, 2021. [En ligne]. Disponible sur: http://documents.irevues.inist.fr/bitstream/handle/2042/38705/SFSPM_2010_56.pdf
- [24] H. Charaka *et al.*, « Knowledge, Perceptions, and Satisfaction of Moroccan Women Towards a New Breast Cancer Screening Program in Morocco », *J Canc Educ*, vol. 36, n° 4, p. 657-663, août 2021, doi: 10.1007/s13187-019-01680-6.
- [25] « Plan_National_de_Prevention_et_de_Controlle_du_Cancer_2020-2029_VF.pdf ». Consulté le: août 11, 2021. [En ligne]. Disponible sur: https://www.sante.gov.ma/Documents/2021/03/Plan_National_de_Prevention_et_de_Controlle_du_Cancer_2020-2029_VF.pdf?csf=1&e=ejDjaj
- [26] K. W. Hance, W. F. Anderson, S. S. Devesa, H. A. Young, et P. H. Levine, « Trends in Inflammatory Breast Carcinoma Incidence and Survival: The Surveillance, Epidemiology, and End Results Program at the National Cancer Institute », *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, vol. 97, n° 13, p. 966-975, juill. 2005, doi: 10.1093/jnci/dji172.
- [27] Y.-S. Sun *et al.*, « Risk Factors and Preventions of Breast Cancer », *Int J Biol Sci*, vol. 13, n° 11, p. 1387-1397, nov. 2017, doi: 10.7150/ijbs.21635.
- [28] D. L. Brown, B. F. Cole, et B. A. Arrick, « Re: Multifactorial Analysis of Differences Between Sporadic Breast Cancers and Cancers Involving BRCA1 and BRCA2 Mutations », *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, vol. 91, n° 1, p. 90a-991, janv. 1999, doi: 10.1093/jnci/91.1.90a.
- [29] « WHO Classification of Tumours of the Breast - UQ eSpace ». <https://espace.library.uq.edu.au/view/UQ:8984059> (consulté le août 13, 2021).
- [30] G. A. Colditz et B. Rosner, « Cumulative Risk of Breast Cancer to Age 70 Years According to Risk Factor Status: Data from the Nurses' Health Study », *American Journal of Epidemiology*, vol. 152, n° 10, p. 950-964, nov. 2000, doi: 10.1093/aje/152.10.950.
- [31] « D0282016.pdf ». Consulté le: août 10, 2021. [En ligne]. Disponible sur: <http://ao.um5.ac.ma/xmlui/bitstream/handle/123456789/17207/D0282016.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- [32] S. Desjardins, « Analyse de gènes candidats au cancer du sein impliqués dans les interactions avec BRCA1 et BRCA2 », 2010, Consulté le: août 06, 2021. [En ligne]. Disponible sur: <https://corpus.ulaval.ca/jspui/handle/20.500.11794/21747>
- [33] « Cancer du sein chez l'homme - Cancer du sein ». <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Cancer-du-sein-chez-l-homme> (consulté le sept. 23, 2021).
- [34] C. C. Benz, « Impact of aging on the biology of breast cancer », *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, vol. 66, n° 1, p. 65-74, avr. 2008, doi: 10.1016/j.critrevonc.2007.09.001.
- [35] P. A. van den Brandt *et al.*, « Pooled Analysis of Prospective Cohort Studies on Height, Weight, and Breast Cancer Risk », *American Journal of Epidemiology*, vol. 152, n° 6, p. 514-527, sept. 2000, doi: 10.1093/aje/152.6.514.
- [36] « Physical Activity and Breast Cancer: A Systematic Review on JSTOR ». https://www.jstor.org/stable/20486329?casa_token=c2GwZqG8tDoAAAAA%3AdTE_Ux6_9kDCaruHWJNHL-h1QM7N5TV_yc_-LSciCm3Xd8Or-

RmtlUUsdpl_FvLEDMUA1ao8oJx2bEFyxop8AhQ2JI00_B1ut4n3cYgwFq4sk79fI6AK&seq=1#metadata_info_tab_contents (consulté le sept. 23, 2021).

- [37] « Alcohol, tobacco and breast cancer – collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58 515 women with breast cancer and 95 067 women without the disease », *Br J Cancer*, vol. 87, n° 11, p. 1234-1245, nov. 2002, doi: 10.1038/sj.bjc.6600596.
- [38] K. W. Singletary et S. M. Gapstur, « Alcohol and Breast Cancer Review of Epidemiologic and Experimental Evidence and Potential Mechanisms », *JAMA*, vol. 286, n° 17, p. 2143-2151, nov. 2001, doi: 10.1001/jama.286.17.2143.
- [39] Y. Chen, W. Thompson, R. Semenciw, et Y. Mao, « Epidemiology of Contralateral Breast Cancer », *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, vol. 8, n° 10, p. 855-861, oct. 1999.
- [40] M. R. Stratton et N. Rahman, « The emerging landscape of breast cancer susceptibility », *Nat Genet*, vol. 40, n° 1, p. 17-22, janv. 2008, doi: 10.1038/ng.2007.53.
- [41] Beral, V. et al., « Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast cancer: Breast cancer and abortion: collaborative reanalysis of data from 53 epidemiological studies, including 83000 women with breast cancer from 16 countries », *Lancet*, vol. 363, n° 9414, p. 1007-1016, janv. 2004, doi: 10.1016/s0140-6736(04)15835-2.
- [42] J. L. Kelsey, M. D. Gammon, et E. M. John, « Reproductive factors and breast cancer », *Epidemiol Rev*, vol. 15, n° 1, p. 36-47, 1993, doi: 10.1093/oxfordjournals.epirev.a036115.
- [43] J. Coignard et al., « A case-only study to identify genetic modifiers of breast cancer risk for BRCA1/BRCA2 mutation carriers », *Nat Commun*, vol. 12, p. 1078, févr. 2021, doi: 10.1038/s41467-020-20496-3.
- [44] « Multifactorial Analysis of Differences Between Sporadic Breast Cancers and Cancers Involving BRCA1 and BRCA2 Mutations | JNCI: Journal of the National Cancer Institute | Oxford Academic ». <https://academic.oup.com/jnci/article/90/15/1138/2519544?login=true> (consulté le août 13, 2021).
- [45] F. K. Al-thoubaity, « Molecular classification of breast cancer: A retrospective cohort study », *Ann Med Surg (Lond)*, vol. 49, p. 44-48, déc. 2019, doi: 10.1016/j.amsu.2019.11.021.
- [46] « Les grades du cancer - Cancer du sein ». <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Les-grades-du-cancer> (consulté le sept. 29, 2021).
- [47] « D0282016.pdf ». Consulté le: août 13, 2021. [En ligne]. Disponible sur: <http://ao.um5.ac.ma/xmlui/bitstream/handle/123456789/17207/D0282016.pdf?sequence=3&isAllo wed=y>
- [48] « Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets | PNAS ». <https://www.pnas.org/content/100/14/8418.short> (consulté le août 21, 2021).
- [49] C. Prunier, « Evaluation de l'efficacité thérapeutique d'un nouvel inhibiteur des LIM Kinases « Pyr1 » dans le cancer du sein », 2015.
- [50] O. Fletcher et R. S. Houlston, « Architecture of inherited susceptibility to common cancer », *Nat Rev Cancer*, vol. 10, n° 5, p. 353-361, mai 2010, doi: 10.1038/nrc2840.
- [51] N. Rahman, « Realizing the promise of cancer predisposition genes », *Nature*, vol. 505, n° 7483, p. 302-308, janv. 2014, doi: 10.1038/nature12981.
- [52] A. Vincent-Salomon, G. Bataillon, et L. Djerroudi, « Les cancers héréditaires du sein vus par le pathologiste », *Annales de Pathologie*, vol. 40, n° 2, p. 78-84, avr. 2020, doi: 10.1016/j.annpat.2020.02.023.
- [53] « Human hg38 chr17:43,044,295-43,125,483 UCSC Genome Browser v420 ». https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr17%3A43044295%2D43125483&hgside=1170026549_u2SDEeaHdka4IYRHx8IF8JgZKIJq (consulté le sept. 21, 2021).
- [54] « Expression of BRCA1 and BRCA2 in Normal and Neoplastic Cells | SpringerLink ». <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1018784031651> (consulté le sept. 23, 2021).
- [55] « BRCA1 BRCA1 Réparation de l'ADN associée [Homo sapiens (humain)] - Gène - NCBI ». <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/672> (consulté le sept. 21, 2021).

- [56] E. Curtit *et al.*, « First description of a sporadic breast cancer in a woman with BRCA1 germline mutation », *Oncotarget*, vol. 6, n° 34, p. 35616-35624, sept. 2015.
- [57] T. Thorslund et S. C. West, « BRCA2: a universal recombinase regulator », *Oncogene*, vol. 26, n° 56, p. 7720-7730, déc. 2007, doi: 10.1038/sj.onc.1210870.
- [58] « The Role of the BRCA1 Tumor Suppressor in DNA Double-Strand Break Repair | Molecular Cancer Research ». <https://mcr.aacrjournals.org/content/3/10/531.short> (consulté le sept. 23, 2021).
- [59] A. R. Venkitaraman, « Cancer Susceptibility and the Functions of BRCA1 and BRCA2 », *Cell*, vol. 108, n° 2, p. 171-182, janv. 2002, doi: 10.1016/S0092-8674(02)00615-3.
- [60] R. Roy, J. Chun, et S. N. Powell, « BRCA1 and BRCA2: important differences with common interests », *Nat Rev Cancer*, vol. 12, n° 5, p. 372-372, mai 2012, doi: 10.1038/nrc3181-c3.
- [61] P. A. Futreal *et al.*, « BRCA1 Mutations in Primary Breast and Ovarian Carcinomas », *Science*, vol. 266, n° 5182, p. 120-122, oct. 1994, doi: 10.1126/science.7939630.
- [62] S. Lee, « Cancer du sein chez l'homme », *Société canadienne du cancer*. <https://cancer.ca/fr/cancer-information/cancer-types/breast/what-is-breast-cancer/breast-cancer-in-men> (consulté le sept. 21, 2021).
- [63] PubChem, « BRCA2 - BRCA2 DNA repair associated (human) ». <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/gene/BRCA2/human> (consulté le sept. 21, 2021).
- [64] « Expression profiling of familial breast cancers demonstrates higher expression of FGFR2 in BRCA2-associated tumors | SpringerLink ». <https://link.springer.com/article/10.1007/s10549-008-0087-1> (consulté le sept. 21, 2021).
- [65] L. N. Hoang et B. C. Gilks, « Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome: Moving Beyond BRCA1 and BRCA2 », *Advances In Anatomic Pathology*, vol. 25, n° 2, p. 85-95, mars 2018, doi: 10.1097/PAP.000000000000177.
- [66] A. Javadi *et al.*, « Data from: PTEN controls glandular morphogenesis through a juxtamembrane β -Arrestin1/ARHGAP21 scaffolding complex ». Dryad, p. 368462 bytes, 2017. doi: 10.5061/DRYAD.NS5QS.
- [67] « Human hg38 chr10:87863625-87971930 UCSC Genome Browser v420 ». https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr10%3A87863625%2D87971930&hgsid=1170026549_u2SDEeaHdka4IYRHx8IF8JgZKlJq (consulté le sept. 21, 2021).
- [68] « Molecular apocrine differentiation is a common feature of breast cancer in patients with germline PTEN mutations | Breast Cancer Research | Full Text ». <https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr2626> (consulté le sept. 21, 2021).
- [69] « Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis | SpringerLink ». <https://link.springer.com/article/10.1186/bcr1122> (consulté le sept. 21, 2021).
- [70] I. U.-T. D. RESERVES, « Orphanet: Syndrome de Li Fraumeni ». https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Expert=524&lng=FR (consulté le sept. 21, 2021).
- [71] « TP53 protéine tumorale p53 [Homo sapiens (humain)] - Gène - NCBI ». <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7157> (consulté le sept. 21, 2021).
- [72] « Human hg38 chr17:7668421-7687490 UCSC Genome Browser v420 ». https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr17%3A7668421%2D7687490&hgsid=1170026549_u2SDEeaHdka4IYRHx8IF8JgZKlJq (consulté le sept. 21, 2021).
- [73] M. G. Rath *et al.*, « Prevalence of germline TP53 mutations in HER2+ breast cancer patients », *Breast Cancer Res Treat*, vol. 139, n° 1, p. 193-198, mai 2013, doi: 10.1007/s10549-012-2375-z.
- [74] « Analyse génomique & médecine personnalisée ». <https://www.roche.fr/fr/patients/info-patients-cancer/diagnostic-cancer/analyse-genomique-medecine-personalisee.html> (consulté le sept. 22, 2021).
- [75] F. R. Vogenberg, C. Isaacson Barash, et M. Pursel, « Personalized Medicine », *P T*, vol. 35, n° 10, p. 560-576, oct. 2010.

- [76] S. Richards *et al.*, « Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology », *Genet Med*, vol. 17, n° 5, p. 405-423, mai 2015, doi: 10.1038/gim.2015.30.
- [77] M. S. Cline *et al.*, « BRCA Challenge: BRCA Exchange as a global resource for variants in BRCA1 and BRCA2 », *PLOS Genetics*, vol. 14, n° 12, p. e1007752, déc. 2018, doi: 10.1371/journal.pgen.1007752.
- [78] M. J. Landrum *et al.*, « ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype », *Nucleic Acids Research*, vol. 42, n° D1, p. D980-D985, janv. 2014, doi: 10.1093/nar/gkt1113.
- [79] P. D. Stenson *et al.*, « The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies », *Human Genetics*, vol. 136, n° 6, Art. n° 6, juin 2017, doi: 10.1007/s00439-017-1779-6.
- [80] « LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases - Fokkema - 2011 - Human Mutation - Wiley Online Library ». <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/humu.21438> (consulté le sept. 24, 2021).
- [81] « An international initiative to identify genetic modifiers of cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1 and BRCA2 (CIMBA) | Breast Cancer Research | Full Text ». <https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr1670> (consulté le sept. 24, 2021).
- [82] A. B. Spurdle *et al.*, « ENIGMA—Evidence-based network for the interpretation of germline mutant alleles: An international initiative to evaluate risk and clinical significance associated with sequence variation in BRCA1 and BRCA2 genes », *Human Mutation*, vol. 33, n° 1, p. 2-7, 2012, doi: 10.1002/humu.21628.
- [83] D. M. Eccles *et al.*, « BRCA1 and BRCA2 genetic testing—pitfalls and recommendations for managing variants of uncertain clinical significance », *Annals of Oncology*, vol. 26, n° 10, p. 2057-2065, oct. 2015, doi: 10.1093/annonc/mdv278.
- [84] « Traitements du cancer du sein | Fondation contre le Cancer ». <https://www.cancer.be/les-cancers/types-de-cancers/cancer-du-sein/traitements> (consulté le sept. 22, 2021).
- [85] S. M. Wallerstedt, A. Nilsson Ek, R. Olofsson Bagge, A. Kovács, A. Strandell, et B. Linderholm, « Personalised medicine and the decision to withhold chemotherapy in early breast cancer with intermediate risk of recurrence - a systematic review and meta-analysis », *Eur J Clin Pharmacol*, vol. 76, n° 9, p. 1199-1211, sept. 2020, doi: 10.1007/s00228-020-02914-z.
- [86] « IDT - xGen Exome Research Panel V2 Target Regions ». https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgc?hgsid=1170026549_u2SDEeaHdka4IYRHx8f8JgZKlJq&db=hg38&c=chr17&l=43044294&r=43125483&o=43115725&t=43115779&g=xGen_Research_Targets_V2&i= (consulté le sept. 24, 2021).
- [87] « IDT - xGen Exome Research Panel V2 Target Regions ». https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgc?hgsid=1170026549_u2SDEeaHdka4IYRHx8f8JgZKlJq&db=hg38&c=chr17&l=43044294&r=43125483&o=43090943&t=43091032&g=xGen_Research_Targets_V2&i= (consulté le sept. 24, 2021).
- [88] « IDT - xGen Exome Research Panel V2 Target Regions ». https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgc?hgsid=1170026549_u2SDEeaHdka4IYRHx8f8JgZKlJq&db=hg38&c=chr13&l=32315507&r=32400268&o=32336264&t=32341196&g=xGen_Research_Targets_V2&i= (consulté le sept. 24, 2021).
- [89] « IDT - xGen Exome Research Panel V2 Target Regions ». https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgc?hgsid=1170026549_u2SDEeaHdka4IYRHx8f8JgZKlJq&db=hg38&c=chr13&l=32315507&r=32400268&o=32344557&t=32344653&g=xGen_Research_Targets_V2&i= (consulté le sept. 24, 2021).
- [90] M. Ren *et al.*, « Germline variants in hereditary breast cancer genes are associated with early age at diagnosis and family history in Guatemalan breast cancer », *Breast Cancer Res Treat*, vol. 189, n° 2, p. 533-539, sept. 2021, doi: 10.1007/s10549-021-06305-5.
- [91] M. Corbex, S. Bouzbid, et P. Boffetta, « Features of breast cancer in developing countries, examples from North-Africa », *European Journal of Cancer*, vol. 50, n° 10, p. 1808-1818, juill. 2014, doi: 10.1016/j.ejca.2014.03.016.

- [92] L. M. Foxcroft, E. B. Evans, et A. J. Porter, « The diagnosis of breast cancer in women younger than 40 », *The Breast*, vol. 13, n° 4, p. 297-306, août 2004, doi: 10.1016/j.breast.2004.02.012.
- [93] M. M. A. Tilanus-Linthorst *et al.*, « Hereditary breast cancer growth rates and its impact on screening policy », *European Journal of Cancer*, vol. 41, n° 11, p. 1610-1617, juill. 2005, doi: 10.1016/j.ejca.2005.02.034.
- [94] C. Schairer *et al.*, « Risk factors for inflammatory and non-inflammatory breast cancer in North Africa », *Breast Cancer Res Treat*, vol. 184, n° 2, p. 543-558, nov. 2020, doi: 10.1007/s10549-020-05864-3.
- [95] J. M. Dolle *et al.*, « Risk Factors for Triple-Negative Breast Cancer in Women Under the Age of 45 Years », *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, vol. 18, n° 4, p. 1157-1166, avr. 2009, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-1005.
- [96] W. D. Foulkes, I. E. Smith, et J. S. Reis-Filho, « Triple-Negative Breast Cancer », *New England Journal of Medicine*, vol. 363, n° 20, p. 1938-1948, nov. 2010, doi: 10.1056/NEJMra1001389.
- [97] C. C. Y. Leung et J. M. Glover, « BRCT domains », *Cell Cycle*, vol. 10, n° 15, p. 2461-2470, août 2011, doi: 10.4161/cc.10.15.16312.
- [98] L. R. Yadav, M. N. Biswal, M. V. Hosur, N. S. Kumar, et A. K. Varma, « Structural basis to characterise transactivation domain of BRCA1 », *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, vol. 35, n° 1, p. 1-7, janv. 2017, doi: 10.1080/07391102.2015.1136896.
- [99] S. Kumar, L. Jena, M. Sahoo, K. Mohod, S. Daf, et A. K. Varma, « Effect of single amino acid mutations on C-terminal domain of breast cancer susceptible protein 1 », *International Journal of Bioinformatics Research and Applications*, nov. 2019, Consulté le: oct. 03, 2021. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.inderscienceonline.com/doi/abs/10.1504/IJBRA.2019.103783>
- [100] V. C. Fernandes *et al.*, « Impact of amino acid substitutions at secondary structures in the BRCT domains of the tumor suppressor BRCA1: Implications for clinical annotation », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 294, n° 15, p. 5980-5992, avr. 2019, doi: 10.1074/jbc.RA118.005274.
- [101] « A Multiplex Homology-Directed DNA Repair Assay Reveals the Impact of More Than 1,000 BRCA1 Missense Substitution Variants on Protein Function », *The American Journal of Human Genetics*, vol. 103, n° 4, p. 498-508, oct. 2018, doi: 10.1016/j.ajhg.2018.07.016.
- [102] S. Arshad, I. Ishaque, S. Mumtaz, M. U. Rashid, et N. Malkani, « In-Silico Analyses of Nonsynonymous Variants in the BRCA1 Gene », *Biochem Genet*, mai 2021, doi: 10.1007/s10528-021-10074-7.

Listes des annexes

Annexe 1: Alignement de la séquence *BRCA1*

Requête : Aucune ID de requête : lcl|Query_1669 Longueur : 5451

>Homo sapiens BRCA1 ADN réparation associée (BRCA1), variant de transcription 1, ARNm

ID de séquence : NM_007294.4 Longueur : 7088

Plage 1 : 255 à 5705

Score : 10033 bits (5433), attente : 0,0,

Identités :5445/5451(99%), écarts :0/5451(0%), brin : Plus/Plus

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_1732746264

Annexe 2: Alignement de la séquence *BRCA2*

Requête : Aucune ID de requête : lcl|Query_47441 Longueur : 10257

>Homo sapiens BRCA2 Réparation de l'ADN associée (BRCA2), ARNm

ID de séquence : NM_000059.4 Longueur : 11954

Plage 1 : 200 à 10456

Score : 18925 bits (10 248), attente : 0,0,

Identités : 10254/10257 (99 %), écarts : 0/10257 (0 %), brin : Plus/Plus

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_1813836564