

UNIVERSITE MOHAMMED V - SOUISSI
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE -RABAT-

ANNEE: 2014

THESE N°: 11

DETECTION DES ALTERATIONS GENETIQUES PAR
PCR/SEQUENÇAGE DU GENE SUPPRESSEUR DE TUMEUR BRCA2
DANS DES CAS DE CANCER DU SEIN MASCULIN ET FEMININ AU MAROC

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le :.....

PAR

Mlle Kanza RAHALI

Née le 05 septembre 1988 à Rabat

Pour l'Obtention du Doctorat en Pharmacie

MOTS CLES : Cancer du sein – Mutations – PCR/séquençage – BRCA2.

JURY

Mr. L. CHABRAOUI

Professeur de Biochimie

PRESIDENT

Mme. N. ALAMI-OUAHABI

Professeur de Biochimie et Biologie Moléculaire

RAPPORTEUR

Mr. O. CHOKAIRI

Professeur d'Histologie-Embryologie et Cytogénétique

JUGES

Mr. A. AL IBRAHIMI

Professeur de Biotechnologie Médicale

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

سُبْحَانَكَ

لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا بِمَا عَلَّمْتَنَا

إِنَّكَ أَنْتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ
العظمة

﴿سورة البقرة: من الآية: 31﴾



17 JUIN 2013

**UNIVERSITE MOHAMMED V- SOUISSI
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE – RABAT**

DOYENS HONORAIRES :

1962 – 1969 : Professeur Abdelmalek FARAJ
1969 – 1974 : Professeur Abdellatif BERBICH
1974 – 1981 : Professeur Bachir LAZRAK
1981 – 1989 : Professeur Taieb CHKILI
1989 – 1997 : Professeur Mohamed Tahar ALAOUI
1997 – 2003 : Professeur Abdelmajid BELMAHI
2003 – 2013 : Professeur Najia HAJJAJ - HASSOUNI

ADMINISTRATION :

Doyen : Professeur Mohamed ADNAOUI
Vice Doyen chargé des Affaires Académiques et estudiantines
Professeur Mohammed AHALLAT
Vice Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération
Professeur Jamal TAOUFIK
Vice Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie
Professeur Jamal TAOUFIK
Secrétaire Général : Mr. El Hassane AHALLAT

PROFESSEURS :

Mai et Octobre 1981

Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajih Chirurgie Cardio-Vasculaire
Pr. TAOBANE Hamid* Chirurgie Thoracique

Mai et Novembre 1982

Pr. ABROUQ Ali* Oto-Rhino-Laryngologie
Pr. BENSOUHA Mohamed Anatomie
Pr. BENOSMAN Abdellatif Chirurgie Thoracique
Pr. LAHBABI Naïma Physiologie

Novembre 1983

Pr. BELLAKHDAR Fouad Neurochirurgie
Pr. HAJJAJ Najia ép. HASSOUNI Rhumatologie

Décembre 1984

Pr. EL GUEDDARI Brahim El Khalil Radiothérapie
Pr. MAAOUNI Abdelaziz Médecine Interne
Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi Anesthésie -Réanimation
Pr. SETTAF Abdellatif Chirurgie

Novembre et Décembre 1985

Pr. BENJELLOUN Halima
Pr. BENSAID Younes
Pr. EL ALAOUI Faris Moulay El Mostafa
Pr. IRAQI Ghali

Cardiologie
Pathologie Chirurgicale
Neurologie
Pneumo-phtisiologie

Janvier, Février et Décembre 1987

Pr. AJANA Ali
Pr. CHAHED OUAZZANI Houria
Pr. EL YAACOUBI Moradh
Pr. ESSAID EL FEYDI Abdellah
Pr. LACHKAR Hassan
Pr. YAHYAOUI Mohamed

Radiologie
Gastro-Entérologie
Traumatologie Orthopédie
Gastro-Entérologie
Médecine Interne
Neurologie

Décembre 1988

Pr. BENHAMAMOUCHE Mohamed Najib
Pr. DAFIRI Rachida
Pr. HERMAS Mohamed
Pr. TOLOUNE Farida*

Chirurgie Pédiatrique
Radiologie
Traumatologie Orthopédie
Médecine Interne

Décembre 1989 Janvier et Novembre 1990

Pr. ADNAOUI Mohamed
Pr. BOUKILI MAKHOUKHI Abdelali*
Pr. CHAD Bouziane
Pr. CHKOFF Rachid
Pr. HACHIM Mohammed*
Pr. KHARBACH Aïcha
Pr. MANSOURI Fatima
Pr. OUAZZANI Taïbi Mohamed Réda
Pr. TAZI Saoud Anas

Médecine Interne
Cardiologie
Pathologie Chirurgicale
Pathologie Chirurgicale
Médecine-Interne
Gynécologie -Obstétrique
Anatomie-Pathologique
Neurologie
Anesthésie Réanimation

Février Avril Juillet et Décembre 1991

Pr. AL HAMANY Zaïtounia
Pr. AZZOUZI Abderrahim
Pr. BAYAHIA Rabéa
Pr. BELKOUCHI Abdelkader
Pr. BENABDELLAH Chahrazad
Pr. BENCHEKROUN Belabbes Abdellatif
Pr. BENSOUDA Yahia
Pr. BERRAHO Amina
Pr. BEZZAD Rachid
Pr. CHABRAOUI Layachi

Anatomie-Pathologique
Anesthésie Réanimation
Néphrologie
Chirurgie Générale
Hématologie
Chirurgie Générale
Pharmacie galénique
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique
Biochimie et Chimie

Pr. CHERRAH Yahia
Pr. CHOKAIRI Omar
Pr. JANATI Idrissi Mohamed*
Pr. KHATTAB Mohamed
Pr. SOULAYMANI Rachida
Pr. TAOUFIK Jamal

Pharmacologie
Histologie Embryologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Pharmacologie
Chimie thérapeutique

Décembre 1992

Pr. AHALLAT Mohamed
Pr. BENSOUADA Adil
Pr. BOUJIDA Mohamed Najib
Pr. CHAHED OUZZANI Laaziza
Pr. CHRAIBI Chafiq
Pr. DAOUDI Rajae
Pr. DEHAYNI Mohamed*
Pr. EL OUAHABI Abdessamad
Pr. FELLAT Rokaya
Pr. GHAFIR Driss*
Pr. JIDDANE Mohamed
Pr. OUZZANI TAIBI Med Charaf Eddine
Pr. TAGHY Ahmed
Pr. ZOUHDI Mimoun

Chirurgie Générale
Anesthésie Réanimation
Radiologie
Gastro-Entérologie
Gynécologie Obstétrique
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique
Neurochirurgie
Cardiologie
Médecine Interne
Anatomie
Gynécologie Obstétrique
Chirurgie Générale
Microbiologie

Mars 1994

Pr. AGNAOU Lahcen
Pr. BENCHERIFA Fatiha
Pr. BENJAAFAR Noureddine
Pr. BEN RAIS Nozha
Pr. CAOUI Malika
Pr. CHRAIBI Abdelmjid
Pr. EL AMRANI Sabah
Pr. EL AOUAD Rajae
Pr. EL BARDOUNI Ahmed
Pr. EL HASSANI My Rachid
Pr. EL IDRISSE Lamghari Abdennaceur
Pr. ERROUGANI Abdelkader
Pr. ESSAKALI Malika
Pr. ETTAYEBI Fouad
Pr. HADRI Larbi*
Pr. HASSAM Badredine
Pr. IFRINE Lahssan
Pr. JELTHI Ahmed
Pr. MAHFOUD Mustapha

Ophtalmologie
Ophtalmologie
Radiothérapie
Biophysique
Biophysique
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Gynécologie Obstétrique
Immunologie
Traumato-Orthopédie
Radiologie
Médecine Interne
Chirurgie Générale
Immunologie
Chirurgie Pédiatrique
Médecine Interne
Dermatologie
Chirurgie Générale
Anatomie Pathologique
Traumatologie – Orthopédie

Pr. MOUDENE Ahmed*
Pr. RHRAB Brahim
Pr. SENOUCI Karima

Traumatologie- Orthopédie
Gynécologie –Obstétrique
Dermatologie

Mars 1994

Pr. ABBAR Mohamed*
Pr. ABDELHAK M'barek
Pr. BELAIDI Halima
Pr. BRAHMI Rida Slimane
Pr. BENTAHILA Abdelali
Pr. BENYAHIA Mohammed Ali
Pr. BERRADA Mohamed Saleh
Pr. CHAMI Ilham
Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae
Pr. EL ABBADI Najia
Pr. HANINE Ahmed*
Pr. JALIL Abdelouahed
Pr. LAKHDAR Amina
Pr. MOUANE Nezha

Urologie
Chirurgie – Pédiatrique
Neurologie
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie
Gynécologie – Obstétrique
Traumatologie – Orthopédie
Radiologie
Ophtalmologie
Neurochirurgie
Radiologie
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie

Mars 1995

Pr. ABOUQUAL Redouane
Pr. AMRAOUI Mohamed
Pr. BAIDADA Abdelaziz
Pr. BARGACH Samir
Pr. BEDDOUCHE Amokrane*
Pr. CHAARI Jilali*
Pr. DIMOU M'barek*
Pr. DRISSI KAMILI Med Nordine*
Pr. EL MESNAOUI Abbes
Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila
Pr. FERHATI Driss
Pr. HASSOUNI Fadil
Pr. HDA Abdelhamid*
Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed
Pr. IBRAHIMY Wafaa
Pr. MANSOURI Aziz
Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia
Pr. SEFIANI Abdelaziz
Pr. ZEGGWAGH Amine Ali

Réanimation Médicale
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Gynécologie Obstétrique
Urologie
Médecine Interne
Anesthésie Réanimation
Anesthésie Réanimation
Chirurgie Générale
Oto-Rhino-Laryngologie
Gynécologie Obstétrique
Médecine Préventive, Santé Publique et Hygiène
Cardiologie
Urologie
Ophtalmologie
Radiothérapie
Ophtalmologie
Génétique
Réanimation Médicale

Décembre 1996

Pr. AMIL Touriya*
Pr. BELKACEM Rachid
Pr. BOULANOUAR Abdelkrim
Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan
Pr. GAOUZI Ahmed
Pr. MAHFOUDI M'barek*
Pr. MOHAMMADINE EL Hamid
Pr. MOHAMMADI Mohamed
Pr. MOULINE Soumaya
Pr. OUADGHIRI Mohamed
Pr. OUZEDDOUN Naima
Pr. ZBIR EL Mehdi*

Radiologie
Chirurgie Pédiatrie
Ophtalmologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Radiologie
Chirurgie Générale
Médecine Interne
Pneumo-phtisiologie
Traumatologie-Orthopédie
Néphrologie
Cardiologie

Novembre 1997

Pr. ALAMI Mohamed Hassan
Pr. BEN AMAR Abdesselem
Pr. BEN SLIMANE Lounis
Pr. BIROUK Nazha
Pr. CHAOUIR Souad*
Pr. DERRAZ Said
Pr. ERREIMI Naima
Pr. FELLAT Nadia
Pr. GUEDDARI Fatima Zohra
Pr. HAIMEUR Charki*
Pr. KADDOURI Nouredine
Pr. KOUTANI Abdellatif
Pr. LAHLOU Mohamed Khalid
Pr. MAHRAOUI CHAFIQ
Pr. NAZI M'barek*
Pr. OUAHABI Hamid*
Pr. TAOUFIQ Jallal
Pr. YOUSFI MALKI Mounia

Gynécologie-Obstétrique
Chirurgie Générale
Urologie
Neurologie
Radiologie
Neurochirurgie
Pédiatrie
Cardiologie
Radiologie
Anesthésie Réanimation
Chirurgie Pédiatrique
Urologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Cardiologie
Neurologie
Psychiatrie
Gynécologie Obstétrique

Novembre 1998

Pr. AFIFI RAJAA
Pr. BENOMAR ALI
Pr. BOUGTAB Abdesslam
Pr. ER RIHANI Hassan
Pr. EZZAITOUNI Fatima
Pr. LAZRAK Khalid *
Pr. BENKIRANE Majid*
Pr. KHATOURI ALI*

Gastro-Entérologie
Neurologie
Chirurgie Générale
Oncologie Médicale
Néphrologie
Traumatologie Orthopédie
Hématologie
Cardiologie

Pr. LABRAIMI Ahmed*

Janvier 2000

Pr. ABID Ahmed*

Pr. AIT OUMAR Hassan

Pr. BENCHERIF My Zahid

Pr. BENJELLOUN Dakhama Badr.Sououd

Pr. BOURKADI Jamal-Eddine

Pr. CHAOUI Zineb

Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer

Pr. ECHARRAB El Mahjoub

Pr. EL FTOUH Mustapha

Pr. EL MOSTARCHID Brahim*

Pr. EL OTMANY Azzedine

Pr. HAMMANI Lahcen

Pr. ISMAILI Mohamed Hatim

Pr. ISMAILI Hassane*

Pr. KRAMI Hayat Ennoufouss

Pr. MAHMOUDI Abdelkrim*

Pr. TACHINANTE Rajae

Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

Novembre 2000

Pr. AIDI Saadia

Pr. AIT OURHROUI Mohamed

Pr. AJANA Fatima Zohra

Pr. BENAMR Said

Pr. BENCHEKROUN Nabiha

Pr. CHERTI Mohammed

Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma

Pr. EL HASSANI Amine

Pr. EL IDGHIRI Hassan

Pr. EL KHADER Khalid

Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah*

Pr. GHARBI Mohamed El Hassan

Pr. HSSAIDA Rachid*

Pr. LAHLOU Abdou

Pr. MAFTAH Mohamed*

Pr. MAHASSINI Najat

Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae

Pr. NASSIH Mohamed*

Pr. ROUIMI Abdelhadi

Décembre 2001

Pr. ABABOU Adil

Anatomie Pathologique

Pneumophtisiologie

Pédiatrie

Ophtalmologie

Pédiatrie

Pneumo-phtisiologie

Ophtalmologie

Chirurgie Générale

Chirurgie Générale

Pneumo-phtisiologie

Neurochirurgie

Chirurgie Générale

Radiologie

Anesthésie-Réanimation

Traumatologie Orthopédie

Gastro-Entérologie

Anesthésie-Réanimation

Anesthésie-Réanimation

Médecine Interne

Neurologie

Dermatologie

Gastro-Entérologie

Chirurgie Générale

Ophtalmologie

Cardiologie

Anesthésie-Réanimation

Pédiatrie

Oto-Rhino-Laryngologie

Urologie

Rhumatologie

Endocrinologie et Maladies Métaboliques

Anesthésie-Réanimation

Traumatologie Orthopédie

Neurochirurgie

Anatomie Pathologique

Pédiatrie

Stomatologie Et Chirurgie Maxillo-Faciale

Neurologie

Anesthésie-Réanimation

Pr. BALKHI Hicham*
 Pr. BELMEKKI Mohammed
 Pr. BENABDELJLIL Maria
 Pr. BENAMAR Loubna
 Pr. BENAMOR Jouda
 Pr. BENELBARHDADI Imane
 Pr. BENNANI Rajae
 Pr. BENOUACHANE Thami
 Pr. BENYOUSSEF Khalil
 Pr. BERRADA Rachid
 Pr. BEZZA Ahmed*
 Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi
 Pr. BOUHOUCHE Rachida
 Pr. BOUMDIN El Hassane*
 Pr. CHAT Latifa
 Pr. CHELLAOUI Mounia
 Pr. DAALI Mustapha*
 Pr. DRISSE Sidi Mourad*
 Pr. EL HIJRI Ahmed
 Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid
 Pr. EL MADHI Tarik
 Pr. EL MOUSSAIF Hamid
 Pr. EL OUNANI Mohamed
 Pr. ETTAIR Said
 Pr. GAZZAZ Miloudi*
 Pr. GOURINDA Hassan
 Pr. HRORA Abdelmalek
 Pr. KABBAJ Saad
 Pr. KABIRI EL Hassane*
 Pr. LAMRANI Moulay Omar
 Pr. LEKEHAL Brahim
 Pr. MAHASSIN Fattouma*
 Pr. MEDARHRI Jalil
 Pr. MIKDAME Mohammed*
 Pr. MOHSINE Raouf
 Pr. NOUINI Yassine
 Pr. SABBAH Farid
 Pr. SEFIANI Yasser
 Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia

Anesthésie-Réanimation
 Ophtalmologie
 Neurologie
 Néphrologie
 Pneumo-phtisiologie
 Gastro-Entérologie
 Cardiologie
 Pédiatrie
 Dermatologie
 Gynécologie Obstétrique
 Rhumatologie
 Anatomie
 Cardiologie
 Radiologie
 Radiologie
 Radiologie
 Radiologie
 Chirurgie Générale
 Radiologie
 Anesthésie-Réanimation
 Neuro-Chirurgie
 Chirurgie-Pédiatrique
 Ophtalmologie
 Chirurgie Générale
 Pédiatrie
 Neuro-Chirurgie
 Chirurgie-Pédiatrique
 Chirurgie Générale
 Anesthésie-Réanimation
 Chirurgie Thoracique
 Traumatologie Orthopédie
 Chirurgie Vasculaire Périphérique
 Médecine Interne
 Chirurgie Générale
 Hématologie Clinique
 Chirurgie Générale
 Urologie
 Chirurgie Générale
 Chirurgie Vasculaire Périphérique
 Pédiatrie

Décembre 2002

Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane*
 Pr. AMEUR Ahmed*
 Pr. AMRI Rachida

Anatomie Pathologique
 Urologie
 Cardiologie

Pr. AOURARH Aziz*
 Pr. BAMOU Youssef *
 Pr. BELMEJDOUB Ghizlene*
 Pr. BENZEKRI Laila
 Pr. BENZZOUBEIR Nadia*
 Pr. BERNOUSSI Zakiya
 Pr. BICHRA Mohamed Zakariya
 Pr. CHOHO Abdelkrim *
 Pr. CHKIRATE Bouchra
 Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair
 Pr. EL BARNOUSSI Leila
 Pr. EL HAOURI Mohamed *
 Pr. EL MANSARI Omar*
 Pr. ES-SADEL Abdelhamid
 Pr. FILALI ADIB Abdelhai
 Pr. HADDOUR Leila
 Pr. HAJJI Zakia
 Pr. IKEN Ali
 Pr. ISMAEL Farid
 Pr. JAAFAR Abdeloihab*
 Pr. KRIOUILE Yamina
 Pr. LAGHMARI Mina
 Pr. MABROUK Hfid*
 Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss*
 Pr. MOUSTAGHFIR Abdelhamid*
 Pr. NAITLHO Abdelhamid*
 Pr. OUJILAL Abdelilah
 Pr. RACHID Khalid *
 Pr. RAISS Mohamed
 Pr. RGUIBI IDRISSE Sidi Mustapha*
 Pr. RHOU Hakima
 Pr. SIAH Samir *
 Pr. THIMOU Amal
 Pr. ZENTAR Aziz*

Gastro-Entérologie
 Biochimie-Chimie
 Endocrinologie et Maladies Métaboliques
 Dermatologie
 Gastro-Entérologie
 Anatomie Pathologique
 Psychiatrie
 Chirurgie Générale
 Pédiatrie
 Chirurgie Pédiatrique
 Gynécologie Obstétrique
 Dermatologie
 Chirurgie Générale
 Chirurgie Générale
 Gynécologie Obstétrique
 Cardiologie
 Ophtalmologie
 Urologie
 Traumatologie Orthopédie
 Traumatologie Orthopédie
 Pédiatrie
 Ophtalmologie
 Traumatologie Orthopédie
 Gynécologie Obstétrique
 Cardiologie
 Médecine Interne
 Oto-Rhino-Laryngologie
 Traumatologie Orthopédie
 Chirurgie Générale
 Pneumophtisiologie
 Néphrologie
 Anesthésie Réanimation
 Pédiatrie
 Chirurgie Générale

Janvier 2004

Pr. ABDELLAH El Hassan
 Pr. AMRANI Mariam
 Pr. BENBOUZID Mohammed Anas
 Pr. BENKIRANE Ahmed*
 Pr. BOUGHALEM Mohamed*
 Pr. BOULAADAS Malik
 Pr. BOURAZZA Ahmed*

Ophtalmologie
 Anatomie Pathologique
 Oto-Rhino-Laryngologie
 Gastro-Entérologie
 Anesthésie Réanimation
 Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
 Neurologie

Pr. CHAGAR Belkacem*
Pr. CHERRADI Nadia
Pr. EL FENNI Jamal*
Pr. EL HANCHI ZAKI
Pr. EL KHORASSANI Mohamed
Pr. EL YOUNASSI Badreddine*
Pr. HACHI Hafid
Pr. JABOURIK Fatima
Pr. KARMANE Abdelouahed
Pr. KHABOUZE Samira
Pr. KHARMAZ Mohamed
Pr. LEZREK Mohammed*
Pr. MOUGHIL Said
Pr. SASSENOU ISMAIL*
Pr. TARIB Abdelilah*
Pr. TIJAMI Fouad
Pr. ZARZUR Jamila

Janvier 2005

Pr. ABBASSI Abdellah
Pr. AL KANDRY Sif Eddine*
Pr. ALAOUI Ahmed Essaid
Pr. ALLALI Fadoua
Pr. AMAZOUZI Abdellah
Pr. AZIZ Nouredine*
Pr. BAHIRI Rachid
Pr. BARKAT Amina
Pr. BENHALIMA Hanane
Pr. BENHARBIT Mohamed
Pr. BENYASS Aatif
Pr. BERNOUSSI Abdelghani
Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Mohamed
Pr. DOUDOUH Abderrahim*
Pr. EL HAMZAOUI Sakina
Pr. HAJJI Leila
Pr. HESSISSEN Leila
Pr. JIDAL Mohamed*
Pr. KARIM Abdelouahed
Pr. KENDOUSI Mohamed*
Pr. LAAROUSSI Mohamed
Pr. LYAGOUBI Mohammed
Pr. NIAMANE Radouane*

Traumatologie Orthopédie
Anatomie Pathologique
Radiologie
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie
Cardiologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique
Traumatologie Orthopédie
Urologie
Chirurgie Cardio-Vasculaire
Gastro-Entérologie
Pharmacie Clinique
Chirurgie Générale
Cardiologie

Chirurgie Réparatrice et Plastique
Chirurgie Générale
Microbiologie
Rhumatologie
Ophtalmologie
Radiologie
Rhumatologie
Pédiatrie
Stomatologie et Chirurgie Maxillo Faciale
Ophtalmologie
Cardiologie
Ophtalmologie
Ophtalmologie
Biophysique
Microbiologie
Cardiologie
Pédiatrie
Radiologie
Ophtalmologie
Cardiologie
Chirurgie Cardio-vasculaire
Parasitologie
Rhumatologie

Pr. RAGALA Abdelhak
Pr. SBIHI Souad
Pr. TNACHERI OUAZZANI Btissam
Pr. ZERAIDI Najia

Gynécologie Obstétrique
Histo-Embryologie Cytogénétique
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique

Décembre 2005

Pr. CHANI Mohamed

Anesthésie Réanimation

Avril 2006

Pr. ACHEMLAL Lahsen*
Pr. AKJOUJ Said*
Pr. BELMEKKI Abdelkader*
Pr. BENCHEIKH Razika
Pr. BIYI Abdelhamid*
Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine
Pr. BOULAHYA Abdellatif*
Pr. CHENGUETI ANSARI Anas
Pr. DOGHMI Nawal
Pr. ESSAMRI Wafaa
Pr. FELLAT Ibtissam
Pr. FAROUDY Mamoun
Pr. GHADOUANE Mohammed*
Pr. HARMOUCHE Hicham
Pr. HANAFI Sidi Mohamed*
Pr. IDRIS LAHLOU Amin
Pr. JROUNDI Laila
Pr. KARMOUNI Tariq
Pr. KILI Amina
Pr. KISRA Hassan
Pr. KISRA Mounir
Pr. LAATIRIS Abdelkader*
Pr. LMIMOUNI Badreddine*
Pr. MANSOURI Hamid*
Pr. OUANASS Abderrazzak
Pr. SAFI Soumaya*
Pr. SEKKAT Fatima Zahra
Pr. SOUALHI Mouna
Pr. TELLAL Saida*
Pr. ZAHRAOUI Rachida

Rhumatologie
Radiologie
Hématologie
O.R.L
Biophysique
Chirurgie - Pédiatrique
Chirurgie Cardio – Vasculaire
Gynécologie Obstétrique
Cardiologie
Gastro-entérologie
Cardiologie
Anesthésie Réanimation
Urologie
Médecine Interne
Anesthésie Réanimation
Microbiologie
Radiologie
Urologie
Pédiatrie
Psychiatrie
Chirurgie – Pédiatrique
Pharmacie Galénique
Parasitologie
Radiothérapie
Psychiatrie
Endocrinologie
Psychiatrie
Pneumo – Phtisiologie
Biochimie
Pneumo – Phtisiologie

Octobre 2007

Pr. ABIDI Khalid
Pr. ACHACHI Leila
Pr. ACHOUR Abdessamad*

Réanimation médicale
Pneumo phtisiologie
Chirurgie générale

Pr. AIT HOUSSA Mahdi*
Pr. AMHAJJI Larbi*
Pr. AMMAR Haddou
Pr. AOUI Sarra
Pr. BAITE Abdelouahed*
Pr. BALOUCH Lhousaine*
Pr. BENZIANE Hamid*
Pr. BOUTIMZIANE Nourdine
Pr. CHARKAOUI Naoual*
Pr. EHIRCHIOU Abdelkader*
Pr. ELABSI Mohamed
Pr. EL BEKKALI Youssef*
Pr. EL MOUSSAOUI Rachid
Pr. EL OMARI Fatima
Pr. GANA Rachid
Pr. GHARIB Nouredine
Pr. HADADI Khalid*
Pr. ICHOU Mohamed*
Pr. ISMAILI Nadia
Pr. KEBDANI Tayeb
Pr. LALAOUI SALIM Jaafar*
Pr. LOUZI Lhousain*
Pr. MADANI Naoufel
Pr. MAHI Mohamed*
Pr. MARC Karima
Pr. MASRAR Azlarab
Pr. MOUSSAOUI Abdelmajid
Pr. MOUTAJ Redouane *
Pr. MRABET Mustapha*
Pr. MRANI Saad*
Pr. OUZZIF Ez zohra*
Pr. RABHI Monsef*
Pr. RADOUANE Bouchaib*
Pr. SEFFAR Myriame
Pr. SEKHSOKH Yessine*
Pr. SIFAT Hassan*
Pr. TABERKANET Mustafa*
Pr. TACHFOUTI Samira
Pr. TAJDINE Mohammed Tariq*
Pr. TANANE Mansour*
Pr. TLIGUI Houssain
Pr. TOUATI Zakia

Chirurgie cardio vasculaire
Traumatologie orthopédie
ORL
Parasitologie
Anesthésie réanimation
Biochimie-chimie
Pharmacie clinique
Ophtalmologie
Pharmacie galénique
Chirurgie générale
Chirurgie générale
Chirurgie cardio vasculaire
Anesthésie réanimation
Psychiatrie
Neuro chirurgie
Chirurgie plastique et réparatrice
Radiothérapie
Oncologie médicale
Dermatologie
Radiothérapie
Anesthésie réanimation
Microbiologie
Réanimation médicale
Radiologie
Pneumo ptisiologie
Hématologie biologique
Anesthésier réanimation
Parasitologie
Médecine préventive santé publique et hygiène
Virologie
Biochimie-chimie
Médecine interne
Radiologie
Microbiologie
Microbiologie
Radiothérapie
Chirurgie vasculaire périphérique
Ophtalmologie
Chirurgie générale
Traumatologie orthopédie
Parasitologie
Cardiologie

Décembre 2008

Pr ZOUBIR Mohamed*

Pr TAHIRI My El Hassan*

Anesthésie Réanimation

Chirurgie Générale

PROFESSEURS AGREGES :

Mars 2009

Pr. ABOUZAHIR Ali*

Pr. AGDR Aomar*

Pr. AIT ALI Abdelmounaim*

Pr. AIT BENHADDOU El hachmia

Pr. AKHADDAR Ali*

Pr. ALLALI Nazik

Pr. AMAHZOUNE Brahim*

Pr. AMINE Bouchra

Pr. AZENDOUR Hicham*

Pr. BELYAMANI Lahcen*

Pr. BJIJOU Younes

Pr. BOUHSAIN Sanae*

Pr. BOUI Mohammed*

Pr. BOUNAIM Ahmed*

Pr. BOUSSOUGA Mostapha*

Pr. CHAKOUR Mohammed *

Pr. CHTATA Hassan Toufik*

Pr. DOGHMI Kamal*

Pr. EL MALKI Hadj Omar

Pr. EL OUENNASS Mostapha*

Pr. ENNIBI Khalid*

Pr. FATHI Khalid

Pr. HASSIKOU Hasna *

Pr. KABBAJ Nawal

Pr. KABIRI Meryem

Pr. KADI Said *

Pr. KARBOUBI Lamya

Pr. L'KASSIMI Hachemi*

Pr. LAMSAOURI Jamal*

Pr. MARMADE Lahcen

Pr. MESKINI Toufik

Pr. MESSAOUDI Nezha *

Pr. MSSROURI Rahal

Pr. NASSAR Ittimade

Pr. OUKERRAJ Latifa

Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani *

Pr. ZOUHAIR Said*

Médecine interne

Pédiatre

Chirurgie Générale

Neurologie

Neuro-chirurgie

Radiologie

Chirurgie Cardio-vasculaire

Rhumatologie

Anesthésie Réanimation

Anesthésie Réanimation

Anatomie

Biochimie-chimie

Dermatologie

Chirurgie Générale

Traumatologie orthopédique

Hématologie biologique

Chirurgie vasculaire périphérique

Hématologie clinique

Chirurgie Générale

Microbiologie

Médecine interne

Gynécologie obstétrique

Rhumatologie

Gastro-entérologie

Pédiatrie

Traumatologie orthopédique

Pédiatrie

Microbiologie

Chimie Thérapeutique

Chirurgie Cardio-vasculaire

Pédiatrie

Hématologie biologique

Chirurgie Générale

Radiologie

Cardiologie

Pneumo-phtisiologie

Microbiologie

Octobre 2010

Pr. ALILOU Mustapha
Pr. AMEZIANE Taoufiq*
Pr. BELAGUID Abdelaziz
Pr. BOUAITY Brahim*
Pr. CHADLI Mariama*
Pr. CHEMSI Mohamed*
Pr. CHERRADI Ghizlan
Pr. DAMI Abdellah*
Pr. DARBI Abdellatif*
Pr. DENDANE Mohammed Anouar
Pr. EL HAFIDI Naima
Pr. EL KHARRAS Abdennasser*
Pr. EL MAZOUZ Samir
Pr. EL SAYEGH Hachem
Pr. ERRABIH Ikram
Pr. LAMALMI Najat
Pr. LEZREK Mounir
Pr. MALIH Mohamed*
Pr. MOSADIK Ahlam
Pr. MOUJAHID Mountassir*
Pr. NAZIH Mouna*
Pr. RAISSOUNI Zakaria*
Pr. ZOUAIDIA Fouad

Anesthésie réanimation
Médecine interne
Physiologie
ORL
Microbiologie
Médecine aéronautique
Cardiologie
Biochimie chimie
Radiologie
Chirurgie pédiatrique
Pédiatrie
Radiologie
Chirurgie plastique et réparatrice
Urologie
Gastro entérologie
Anatomie pathologique
Ophtalmologie
Pédiatrie
Anesthésie Réanimation
Chirurgie générale
Hématologie
Traumatologie Orthopédie
Anatomie pathologique

Mai 2012

Pr. Abdelouahed AMRANI
Pr. ABOUELALAA Khalil*
Pr. Ahmed JAHID
Pr. BELAIZI Mohamed*
Pr. BENCHEBBA Drissi*
Pr. DRISSI Mohamed*
Pr. EL KHATTABI Abdessadek*
Pr. EL OUAZZANI Hanane*
Pr. MEHSSANI Jamal*
Pr. Mouna EL ALAOUI MHAMDI
Pr. Mounir ER-RAJI
Pr. RAISSOUNI Maha*

Chirurgie Pédiatrique
Anesthésie Réanimation
Anatomie Pathologique
Psychiatrie
Traumatologie Orthopédique
Anesthésie Réanimation
Médecine Interne
Pneumophtisiologie
Psychiatrie
Chirurgie Générale
Chirurgie Pédiatrique
Cardiologie

ENSEIGNANTS SCIENTIFIQUES

PROFESSEURS

Pr. ABOUDRAR Saadia
Pr. ALAMI OUHABI Naima
Pr. ALAOUI KATIM
Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma
Pr. ANSAR M'hammed
Pr. BOUHOUCHE Ahmed
Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz
Pr. BOURJOUANE Mohamed
Pr. CHAHED OUAZZANI Lalla Chadia
Pr. DAKKA Taoufiq
Pr. DRAOUI Mustapha
Pr. EL GUESSABI Lahcen
Pr. ETTAIB Abdelkader
Pr. FAOUZI Moulay El Abbes
Pr. HAMZAOUI Laila
Pr. HMAMOUCHE Mohamed
Pr. IBRAHIMI Azeddine
Pr. KHANFRI Jamal Eddine
Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSE Med
Pr. REDHA Ahlam
Pr. TOUATI Driss
Pr. ZAHIDI Ahmed
Pr. ZELLOU Amina

Physiologie
Biochimie
Pharmacologie
Histologie-Embryologie
Chimie Organique et Pharmacie Chimique
Génétique Humaine
Applications Pharmaceutiques
Microbiologie
Biochimie
Physiologie
Chimie Analytique
Pharmacognosie
Zootechnie
Pharmacologie
Biophysique
Chimie Organique
Biotechnologie
Biologie
Chimie Organique
Biochimie
Pharmacognosie
Pharmacologie
Chimie Organique

*Enseignants Militaires**

Mise à jour le 02/05/2013



Je dédie cette thèse



A Mes très chers parents et ma grand-mère

Je vous dédie ce travail en reconnaissance de l'amour que vous m'avez offerte depuis ma naissance, de tous les sacrifices que vous vous êtes imposés pour assurer mon éducation et mon bien être, de votre tolérance, et de votre bonté exceptionnelle.

J'espère être la fille que vous aviez voulu que je sois, et je m'efforcerai d'être digne de ce que vous auriez souhaité que je sois. Ce titre de Docteur en Pharmacie, je le porterai fièrement et je vous le dédie tout particulièrement.

Les mots ne peuvent exprimer ma gratitude pour votre soutien, Puisse Dieu vous procurer bonheur, santé, longue vie et vous garder à mes côtés le plus longtemps possible afin que je puisse un jour vous rendre ne serait ce qu'un peu de ce que vous avez fait pour moi...





A mon cher frère et ma chère sœur,

Othmane et Mounia

Vous qui m'avez soutenue, chacun à sa façon, durant tant d'années, j'espère avoir été à la hauteur de votre estime et que ce travail soit un témoignage de mes sentiments les plus chers que j'ai pour vous.

Que Dieu vous protège, vous comble de bonheur et de réussite, vous garde à mes côtés le plus longtemps possible et fasse régner entre nous l'amour et l'harmonie les plus parfaits.





*A mes collègues, mes confrères, mes consœurs, mes compagnons d'études
pharmaceutiques et mes amis d'enfance*

Pour tous les moments inoubliables qu'on a passé ensemble.

*Aucune expression ne saurait traduire les sentiments que j'ai pour
vous. Votre soutien a été très précieux pour moi.*

*Veillez accepter ce travail comme symbole de mon estime et de ma
reconnaissance.*

*Avec vous j'ai appris beaucoup, que dieu nous rassemble une autre
fois pour l'autre vie éternelle.*



Remerciements



A notre maître et président de thèse

M. L. Chabraoui

Professeur de Biochimie

En présidant ce jury, vous me faites un grand honneur.

Votre compétence, votre rigueur et vos qualités humaines exemplaires, ont toujours suscité mon admiration.

Veillez trouver, cher maître, dans ce modeste travail, l'expression de ma très haute considération et ma profonde gratitude.





A notre maître et rapporteur de thèse

Mme. N. ALAMI-OUAHABI

Professeur de biochimie et biologie moléculaire

Je vous remercie d'avoir voulu diriger ce travail.

J'ai eu le grand plaisir de travailler sous votre direction, et trouvé auprès de vous le conseiller et le guide qui m'a reçue avec bienveillance.

Je tiens à vous adresser mes vifs remerciements pour m'avoir suggérée ce sujet très passionnant.

Je voudrais être digne de la confiance que vous m'avez accordée et vous prier, chère Maître, de trouver ici le témoignage de ma sincère reconnaissance et profonde gratitude.





A notre maître et juge de thèse

M. O. Chokairi

Professeur d'histologie, embryologie et cytogénétique

C'est un réel plaisir et un honneur pour moi de vous compter parmi les membres de ce jury de thèse.

Je vous présente mes vifs remerciements d'avoir accepté de juger mon travail.

Veillez trouver, cher maître, l'expression de ma très haute considération et ma profonde gratitude.





A

A notre maître et juge de thèse

M. A. Al Ibrahimi

Professeur de biotechnologie médicale

Je vous remercie sincèrement de l'honneur que vous me faites en siégeant dans ce jury.

Veillez agréer, cher professeur, l'expression de mes sincères remerciements et ma grande estime.

Que ce travail soit pour moi l'occasion de vous exprimer ma gratitude et mon profond respect.





Liste des illustrations

LISTE DES ABREVIATIONS

ACE	: Antigène Carcinoembryonnaire
ADN	: Acide Désoxyribonucléique
Ag	: Anti-gène
ARN	: Acide Ribonucléique
ARNm	: Acide Ribonucléique messenger
ARNt	: Acide Ribonucléique de transfert
ATM	: Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	: Adénosine triphosphate
ATR	: Ataxia Telangiectasia and Rad3 related
BARD1	: BRCA1-Associated RING Domain Protein 1
BRCT	: BRCA1 C Terminal
BRCA2Tr	: BRCA2 truncated
CCIS	: Carcinome Canaux In Situ
CD	: Cellules Dendritiques
Chk2	: Checkpoint Kinase 2
CNRST	: Centre National de Recherche Scientifique et Technique
CPA	: Cellules Présentatrices d'Ag
CstF	: Cleavage stimulatory factor or cleavage stimulation Factor
DSBs	: Double Strand Breaks
EDTA	: Acide Ethylène Diamine Tétracétique
EFG	: Epidermal Growth Factor

EFGR	: Epidermal Growth Factor Receptor
FAS	: Fanconi Anaemia Syndrome
FISH	: Hybridation In Situ en Fluorescence
IHC	: Immunohistochimie
JNK	: c-jun-N-terminal Kinase
LOH	: Loss of heterozygosity
MCDB	: Moroccan Cancer Database Explorer 1.0
MDM2	: Mouse double minute 2
MMC	: Mitomycine C
NER	: Nucleotide Excision Repair
NHEJ	: Jointure Non Homologue des Extrémités
NLS	: Séquences de Localisation Nucléaire
Paf	: Ponction à l'aiguille fine
PCR	: Polymerase Chain Reaction
RH	: Recombinaison Homologue
RING	: Really Interesting New Gene
RT-PCR	: Real Time Polymerase Chain Reaction
SGBD	: Système de Gestion de Bases de Données
TCR	: Transcription-Coupled-Repair
TPS	: Tissue Polypeptide Specific Antigen
WHO	: World Health Organization

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Cancer dans le monde. <i>Source : WHO Globocan</i>	16
Figure 2 : Schéma de transcription et de traduction.....	21
Figure 3 : Signal de la puce à ADN	21
Figure 4 : Structure de la protéine P53	38
Figure 5 : Structure des protéines BRCA1 et BRCA2.....	38
Figure 6: Interactions de BRCA1 et BRCA2	39
Figure 7 : Capture d'écran de l'interface Authentification.....	44
Figure 8: Capture d'écran de l'interface Menu	44
Figure 9: Capture d'écran de l'interface Saisie des patients	45
Figure 10: Capture d'écran de l'interface Recherche	46
Figure 11: Capture d'écran de l'interface Liens Utiles	47
Figure 12: Banque de sang recueillie.....	50
Figure 13 : Procédure d'extraction d'ADN. <i>Source : Manuel du PureLink™ Genomic DNA Kits</i>	54
Figure 14 : Position des mutations de BRCA1 et BRCA2 sur les exons. <i>Source : Nat Rev Cancer© 2007 Nature Publishing Group</i>	62
Figure 15: Schéma de la PCR en temps réel [58]	66
Figure 16 : Appareil Veriti® 96 well Thermal cycler, Applied Biosystems.....	68

Figure 17: Schéma de la méthode Sanger de séquençage	70
Figure 18 : Photo du séquenceur ABI 3130xl Genetic Analyzer Applied Biosystems.....	75
Figure 19 : Capture d'écran de l'interface validation de saisie	77
Figure 20 : Capture d'écran de l'interface Recherche	78
Figure 21 : Capture d'écran de l'interface Résultat de recherche	79
Figure 22 : Exemple de résultat de quantification au Nanorop.....	80
Figure 23 : Photo du gel d'électrophorèse (1).....	81
Figure 24 : Photo du gel d'électrophorèse (2).....	82
Figure 25 : Photo du gel d'électrophorèse (3).....	82
Figure 26 : Exemple de résultat de séquence d'un échantillon visualisé par le logiciel Sequence Scanner v. 1.0.....	83
Figure 27 : Exemple de résultat de séquence d'un échantillon visualisé par le logiciel Sequence Scanner v. 1.0.....	84
Figure 28 : Capture d'écran de l'alignement des séquences par le logiciel CLC Sequence Viewer (Qiagen).....	88
Figure 29 : Capture d'écran de l'alignement des séquences par le logiciel CLC Sequence Viewer (Qiagen).....	89

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Mutations de BRCA1 et BRCA2 de la littérature chez différentes populations.....	61
Tableau 2 : Volumes utilisés pour le mix de la réaction de PCR par échantillon	67
Tableau 3 : Tableau de mélange réactionnel pour la réaction de séquence.....	73



Sommaire

Introduction générale	1
Partie théorique	3
1) Information génétique	4
2) Réplication	8
3) Oncogenèse	12
5) HER 2	22
6) p53	25
7) BRCA1 et BRCA2.....	28
7-1 BRCA1.....	29
7-2 BRCA2.....	32
Matériels et méthodes	40
1) Application informatique	42
2) Extraction de l'ADN.....	48
3) Analyse de séquences	55
4) Mutations de BRCA1/BRCA2.....	60
5) Polymerase Chain Reaction (PCR)	63
6) Séquençage	69

Résultats 76

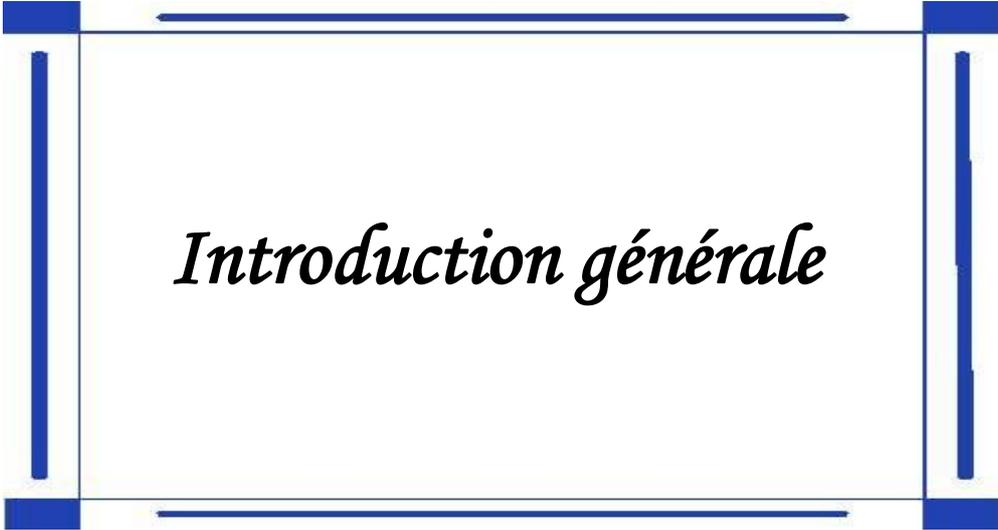
Discussion 90

Conclusion et perspectives 94

Résumés

Annexes

Bibliographie



Introduction générale

Le cancer du sein, étant le plus fréquemment diagnostiqué chez la femme au Maroc (Tazi MA et al 2013) et vu son incidence qui ne cesse de croître, constitue un problème majeur de santé publique. Son diagnostic clinique, radiologique et biochimique représente un moyen indétournable de dépistage. Cependant, le diagnostic moléculaire des marqueurs génétiques du cancer du sein, s'ajoutant à ces diagnostics pourrait améliorer le pronostic en fournissant des éléments majeurs pour un dépistage précoce.

Le but global du projet que j'ai intégré est d'effectuer une analyse par PCR/séquençage et par PCR en temps réel des mutations des gènes suppresseurs de tumeur BRCA1, BRCA2, P53 et de détecter par RT-PCR l'amplification de l'oncogène Erb2 (Her2/neu), marqueur génétique de métastases. Le but global étant de comparer les deux techniques afin d'instaurer une routine rapide et efficace d'analyse moléculaire des marqueurs génétiques du cancer du sein.

Nous avons effectué une collecte de 200 échantillons de sang de patients atteints de cancer du sein féminin et masculin, dont 44 contrôles négatifs, validée par des questionnaires et des consentements éclairés. Nous avons également développé une application informatique qui permet d'exploiter de façon ciblée et accessible la totalité des informations, archivées et numérisées formant ainsi notre base de données.



Partie théorique

L'étude des mutations des marqueurs génétiques du cancer du sein, faisant l'objet de la présente thèse nécessite de présenter une introduction portant sur l'information génétique, l'oncogénèse ainsi que le cancer du sein.

1) Information génétique

Le génome humain, support de son information génétique, se trouve dans le noyau de chaque cellule du corps sauf pour les globules rouges qui ne renferment pas de noyau, il se trouve également dans la mitochondrie où il représente une structure spatiale différente du noyau. Il est organisé en 46 molécules : les chromosomes, 44 entre elles s'appellent les autosomes et les 2 restantes sont des chromosomes sexuels.

Le génome humain est formé de très longues chaînes constituées de trois unités essentielles :

- Les bases azotées : puriques : Adénine (A), Guanine (G), et pyrimidiques : Thymine (T) et Cytosine (C) ;
- Les désoxyriboses ;
- Les groupements phosphates.

Le chromosome, quant à lui, consiste en deux chaînes connectées et disposées en deux directions opposées pour former une double hélice. La connexion entre les chaînes suit une règle stricte: La base A ne s'apparie qu'avec la base T, et pareil entre la base C avec la G. Dans l'ensemble, trois milliards de paires de bases forment le génome humain. Chaque trois paires de bases représentent un triplet.

Ainsi l'une des chaînes, orientée 5'-3', est appelée brin sens, parce qu'elle contient l'information nécessaire pour la production des protéines et l'autre chaîne est appelée brin antisens, orienté 3'-5'.

L'ensemble des chromosomes peut s'agencer selon une structure exploitable appelée « caryotype ». Le caryotype humain est une disposition de son génome, il présente tous ses chromosomes après les avoir arrangés en paires appelées « homologues », et disposés selon une organisation spéciale modulée par leur taille et la position du centromère.

Le centromère du chromosome est la partie centrale qui sépare les deux bras. La partie supérieure, plus courte est appelée le bras p et la partie inférieure est le bras q.

En général, les gènes peuvent être définis comme des segments d'ADN qui produisent des messages codés pour les cellules pour aboutir à un produit (protéine). Chaque triplet code pour un acide aminé particulier, tandis que certains permettent de débiter ou arrêter la lecture du message. Les triplets permettent aux cellules d'assembler les acides aminés dans l'ordre adéquat pour aboutir au bon polypeptide.

1-1 Transcription

Les deux brins d'ADN aboutissent à l'ARN via une étape clé de l'expression génétique : la transcription. Les informations portées par ces brins ne sont pas utilisées entièrement, c'est parce que les gènes contiennent des parties codantes appelées exons et d'autres non codantes appelées introns.

La transcription recrute des promoteurs pour son fonctionnement, il s'agit de séquences de nucléotides qui sont reconnues par des protéines spécifiques dont la structure permet une liaison avec l'ADN (DNA binding proteins). Les séquences qui reconnaissent ces protéines ont des effets sur la vitesse de la transcription, ils peuvent soit l'activer ou l'inhiber. L'ARN polymérase II est l'enzyme de transcription, elle assure sa continuité jusqu'à ce qu'elle rencontre une séquence 3'-TTATTT-5' comme signal d'arrêt. Ainsi, le brin sens est transcrit en ARN et en fin de processus, on obtient de l'ARN qui est de structure identique au brin sens, sauf qu'il contient de l'uracile au lieu de la thymine. (fig 2. Planche 1)

Le nouveau brin d'ARN subit un ensemble de modifications avant de remplir ses fonctions :

- Une enzyme ajoute un nucléotide à Guanine sur le premier nucléotide et transfère des radicaux méthyles sur les premiers nucléotides : c'est le capping.
- Une enzyme coupe le transcrit environ 10 à 20 nucléotides avant sa fin et y synthétise une longue chaîne à Adénine polymérisés : c'est la queue poly-A.
- Des enzymes peuvent également modifier certaines bases.
- Comme indiqué précédemment, les introns non-codantes aboutissent à des séquences qui sont coupées et éliminées et les séquences restantes sont rassemblées : c'est l'excision-épissage.

Ces modifications visant la régulation post-traductionnelle, représentent une étape très importante pour l'obtention d'une protéine fonctionnelle.

L'ARN diffère de l'ADN par :

- Sa structure en un seul brin ;
- La base Uracile (U) au lieu de la Thymine (T) ;
- Un ribose au lieu d'un désoxyribose.

1-2 Traduction

L'ARNm ainsi formé sort du noyau pour subir une traduction en protéines cytoplasmiques, ou pour conduire ces protéines dans les membranes et les organites de la cellule ou pour les excréter vers l'extérieur de la cellule. Une fois dans le cytoplasme, un autre type d'ARN, l'ARN de transfert (ARNt) portant son propre acide aminé se lie à l'ARNm par complémentarité entre trois nucléotides de chaque ARN. Les trois nucléotides de l'ARNm constituent un codon tandis que les autres trois sont des anticodons.

Le ribosome, avec ses deux sites A et P vient encadrer cette liaison, l'ARNt se fixe sur le site P et après l'hydrolyse d'une liaison ester riche en énergie, le peptide du site P est transféré à l'acide aminé de l'ARNt du site A. Ces transferts d'acides aminés se poursuivent au long de l'ARNm jusqu'à la présence d'un codon stop sur l'ARNm : Le ribosome se dissocie, l'ARNt est libéré et la protéine nouvellement synthétisée subit certaines modifications post-traductionnelles avant de devenir une protéine mature et remplir sa fonction. (fig 2. Planche 1)

2) Réplication

2-1- Cycle cellulaire

Au cours du cycle cellulaire, une série d'étapes s'enchaînent pour aboutir à deux cellules filles. Chaque cellule subit une préparation en phase G1 pour ensuite démarrer le mécanisme de dédoublement de son ADN en phase S. Cette dernière étape est réparée en phase G2 et après la mitose, chaque cellule fille reçoit l'information génétique complète.

Les deux brins d'ADN sont copiés à l'aide de : l'ADN primase qui synthétise l'amorce d'ARN, l'ADN polymérase qui se charge de la copie de courts fragments et enfin de l'ADN ligase responsable de la liaison entre les fragments pour être transmis aux nouvelles cellules : c'est la réplication.

Nos cellules sont recrutées perpétuellement dans ce cycle assurant leur existence, et comme tout mécanisme il risque de se détériorer ou de fournir un produit délétère, c'est ce qu'on risque d'observer certaines fois dans l'ADN répliqué.

De nombreux agents chimiques peuvent entraîner des altérations de l'ADN. Les agents alkylants additionnent des groupes alkyles aux bases ($-CH_3$). L'acide nitreux (dérivé des nitrates ou nitrites des produits alimentaires et engrais) conduit à une désamination oxydative de l'adénine adénine en hypoxanthine. Des composés ressemblant à des bases puriques ou pyrimidiques peuvent s'incorporer dans l'ADN de BromoUracile (analogue de la thymine). Les agents intercalants comme le bromure d'éthydiu ou BET bloquent la réplication. D'autres agents peuvent conduire à des coupures de l'ADN ou à des ponts entre les brins.

2-2 Systèmes de réparation

Devant ces phénomènes indésirables, la cellule fait appel aux réparateurs qu'on appelle les mécanismes réparateurs de l'ADN :

- Les télomères : Protègent les extrémités des chromosomes.
- Le système NER (Nucleotide Excision Repair) : La nucléase d'excision humaine enlève au niveau de l'erreur toute ou une partie d'une série de nucléotides encadrant cette erreur.
- Il existe une autre voie plus rare, celle du TCR (*Transcription-Coupled-Repair*). Celui-ci excise les lésions de l'ADN qui bloquent l'ARN polymérase.
- Mismatch Repair : opère lorsqu'il y a une discordance entre deux bases, il recrute des hétérodimères et de l'ATP pour la réparation.
- La recombinaison homologe: dans le cas où on obtient une lacune dans l'un des deux brins d'ADN, l'information qui manque est récupérée à partir de la copie non altérée du brin homologue.
- Nucléases : ce sont des protéines associées au complexe enzymatique de l'ADN polymérase.

Devant ces mécanismes semblant efficaces on fait souvent face à un échec de réparation, les variations leur échappent et la cellule se multiplie en présentant une variation.

2-3 Mutations

Certaines de ces variations ne semblent pas affecter la transmission des messages et en conséquence la production des protéines par les cellules, ce qui est souvent le cas.

Dans d'autres cas, le message ne peut être lu ou est lu différemment, ce type de variation est appelé mutation. Un gène mutant peut mener à un problème de développement et fonctionnement de différents systèmes et organes.

La mutation peut être :

- Somatique : n'ayant de conséquences qu'au niveau de l'organisme qui la porte.
- Germinale : peut se retrouver portée par une cellule œuf à l'origine d'un nouvel individu. Cette mutation va alors se transmettre de génération en génération.

Un modèle particulier est celui des « deux coups » de Knudson, particulièrement adapté aux maladies tumorales génétiquement transmises liées à des mutations de gènes suppresseurs de tumeurs. Dans ce modèle, toutes les cellules d'un individu hébergent un allèle muté du gène suppresseur de tumeur en cause, hérité d'un ascendant (premier coup). Cette mutation hémizygotique n'est pas suffisante pour entraîner l'apparition du phénotype tumoral, la version normale de l'allèle sur l'autre chromosome de la paire assure une activité suppressive de tumeur efficace. Toutefois, le phénotype tumoral peut apparaître si cet allèle normal est accidentellement muté dans une des cellules de l'organisme (second coup) notamment par un mécanisme de perte

d'hétérozygocité (LOH) (délétion localisée d'un fragment d'ADN comprenant notamment le locus du gène en cause).

La localisation de ces délétions permet d'ailleurs de cerner le locus du gène responsable dans les maladies tumorales familiales.

- Pour les délétions, on parle de perte d'hétérozygotie quand une portion du chromosome contenant un ou plusieurs gènes disparaît, laissant le (ou les) autre(s) gène(s) homologue(s), situé(s) sur l'autre chromosome de la paire (s'il s'agit d'un autosome), seul(s), en situation d'hémizygotie ;

- Dans le cas des mutations ponctuelles, on parle, entre autres, de transition en cas de passage d'une base purique ou pyrimidique à une base du même type, et de transversion dans le cas contraire.

3) Oncogenèse

L'oncogenèse correspond à l'ensemble des facteurs et des mécanismes à l'origine des cancers. Ses processus sont très variés mais ils présentent des caractères communs pour la plupart des cancers humains. L'oncogenèse peut être déclenchée essentiellement soit par la surexpression d'oncogènes (ex : Her2/neu) ou de l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur (ex : P53, BRCA1/2).

3-1 Les proto-oncogènes :

Ces gènes, existant dans les cellules normales, codent pour des protéines qui interviennent dans l'une des étapes de la transmission d'un signal de croissance conduisant à la division cellulaire. Leur surexpression peut être liée à différents types d'altérations génétiques : une amplification du nombre de copies de gène ou une mutation activatrice qui rend la protéine active de façon non régulable ou encore une translocation chromosomique.

Citons comme exemple :

- ✓ c-erb-B1 ;
- ✓ Ras ;
- ✓ Myc.

3-2 Les anti-oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs :

Ces gènes arrêtent la prolifération, le premier découvert a été le gène Rb (découvert grâce à l'étude du rétinoblastome). On connaît aujourd'hui une trentaine de ces gènes, qui interviennent spécifiquement dans certains types de tumeurs. En réintroduisant le gène suppresseur manquant dans une cellule

tumorale, on arrête sa prolifération. Contrairement aux oncogènes, ils sont dits récessifs au niveau cellulaire. Citons comme exemple :

- ✓ Gène du rétinoblastome (RB) ;
- ✓ Gène de la protéine p53 ;
- ✓ BRCA1 et BRCA2.

En plus des deux types de gènes préalablement indiqués, il existe d'autres facteurs contribuant à l'oncogenèse :

3-3 Apoptose :

En oncologie, plusieurs observations ont appuyé l'importance de l'apoptose dans l'oncogenèse, l'apparition des tumeurs n'est pas due uniquement à une prolifération cellulaire excessive mais aussi à un déséquilibre dans la mort.

3-4 Modification épigénétique de l'expression des gènes :

L'expression des gènes peut être modifiée de façon stable dans la cellule tumorale par des modifications chimiques au niveau des séquences promotrices des gènes.

3-5 Activité télomérase :

La télomérase, reconstitue le court fragment manquant après chaque division et permet le maintien de la longueur des télomères. Le rôle de la télomérase dans l'oncogenèse humaine a été établi sur des bases expérimentales. Elle est fréquemment active dans les cancers, alors qu'elle est le plus souvent indétectable dans les tumeurs bénignes.

3-6 Boucles auto- et paracrines :

La croissance tumorale implique également des boucles d'activation autocrine de la cellule tumorale sur elle-même, et surtout des mécanismes paracrines entre cellules tumorales et microenvironnement qui sous-tendent l'angiogenèse et l'invasion, deux facteurs-clefs de la progression tumorale.

Le cancer du sein est le type de cancer étudié dans la présente thèse. Ses facteurs, son épidémiologie, ses classifications et son dépistage sont des éléments essentiels à traiter avant d'introduire ses marqueurs génétiques.

4) Cancer du sein

La cellule cancéreuse présente la capacité de proliférer après avoir échappé aux contraintes préalablement évoquées qui imposent dans les cas normaux l'arrêt de la prolifération : elle continue à se diviser. Dans les cellules saines, l'interaction du facteur de croissance avec ses récepteurs cellulaires donne lieu à une cascade d'événements cellulaires transmettant au noyau le signal de prolifération. Dans les cellules tumorales, après altération du facteur de croissance ou/et de son récepteur, la prolifération cellulaire est dérégulée.

4-1- Principaux facteurs de cancérogenèse

a) Les facteurs génétiques :

On estime que 5 à 10% des cancers du sein sont liés à une mutation constitutionnelle, d'un gène de prédisposition, la majorité est due à BRCA1 et BRCA2.

b) Les facteurs hormonaux :

La puberté précoce, la ménopause tardive et l'utilisation des contraceptifs oraux ou d'une thérapie hormonale substitutive pourrait augmenter le risque du cancer du sein.

c) Les facteurs exogènes :

Les carcinogènes physiques et chimiques, ainsi que l'alcool et l'alimentation riche en graisses sont associés à un risque élevé du cancer du sein.

4-2- Epidémiologie des cancers

Cancers dans le monde :

World cancer cases 2012

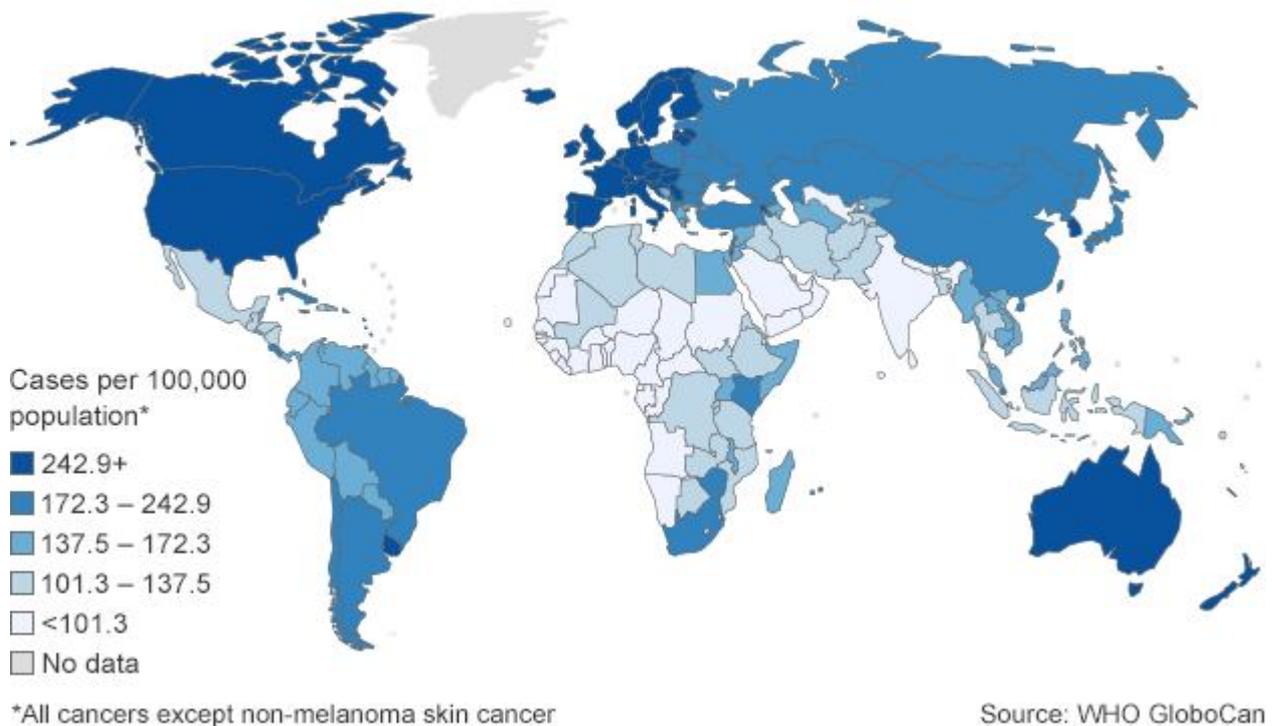


Figure 1 : Cancer dans le monde. *Source : WHO Globocan*

4-3- Classification thérapeutique

La classification internationale TNM (UICC) prend en compte la tumeur primitive (T), l'état des ganglions axillaires (N) et l'existence de métastases (M).

En l'absence de données suffisantes, les patientes sont cotées T \times , N \times , M \times . Après une intervention chirurgicale, la classification pathologique est exprimée en pT, pN (p pour pathological). L'état ganglionnaire est symbolisé par les notations N $-$ (absence d'envahissement) et N $+$ (adénopathie(s) métastatique(s)).

4-4- Classification histologique

La stratégie thérapeutique dans le cancer du sein repose sur des facteurs pronostiques classiques comme la taille, le grade histologique, l'envahissement ganglionnaire de l'aisselle et l'expression des récepteurs hormonaux.

a) Communément, quatre entités de cancer du sein ont été définies selon les travaux princeps de Sorlie et al. et Perou et al. [48]. Les cancers du sein dits « *luminaux* ». Ils se divisent en deux catégories : les sous-types d'origine lumineuse A se caractérisent par une prolifération cellulaire peu élevée ; les sous-types d'origine lumineuse B par une prolifération cellulaire plus élevée. Les cancers du sein dits « *Her2 +++* » surexpriment l'oncoprotéine cErbB2 Her2, mais également peuvent exprimer les récepteurs aux estrogènes et à la progestérone. Enfin, les cancers du sein de *phénotype basal*, n'expriment ni les récepteurs hormonaux, ni l'oncoprotéine Her2.

b) Le grade histopronostic de Scarff Bloom et Richardson (SBR) : Etablit un score en fonction du degré d'anomalie nucléocytoplasmiques, de la différenciation et du nombre de mitoses, il est noté en chiffres arabes.

c) Le stade : Etablit un score en fonction de l'extension de la tumeur, il est noté en chiffres romains.

4-5 Dépistage:

Le diagnostic du cancer du sein repose sur les examens suivants :

- *Examen physique ;*
- *Mammographie ;*

- ***Echographie ;***
- ***Ponction à l'aiguille fine (Paf) ;***
- ***Microbiopsie ;***
- ***Biopsie chirurgicale ;***
- ***Dosage des marqueurs sériques, comme : CA 15-3, TPS, les récepteurs aux œstrogènes et le proto-oncogène her2/neu.***
- ***Immunohistochimie :***

Le principe de l'immunohistochimie consiste à mettre en évidence une protéine d'intérêt dans un échantillon tissulaire ou cellulaire grâce à un anticorps spécifique. Les techniques immunohistochimiques jouent un rôle important dans la pathologie tumorale pour poser le diagnostic ainsi que pour guider la stratégie thérapeutique. Elle permet l'identification et le typage des cellules tumorales grâce à la mise en évidence de marqueurs de différenciation spécifiques ou à l'identification de produits d'anomalies moléculaires ou génétiques caractéristiques.

Les techniques immunohistochimiques sont devenues indispensables pour la mise en évidence des cibles moléculaires des thérapies ciblées : la détection de Her2/neu dans le cancer du sein métastatique dans le cadre d'un traitement par trastuzumab.

- ***Cytogénétique moléculaire in situ: FISH :***

Les sondes (probes) pour le FISH sont des fragments d'ADN marqués par un fluorochrome, à la suite de l'incorporation dans la double molécule d'ADN de l'uridyl-biotinilé à la place de la thymine (Nick translation). Après marquage,

la sonde est dénaturée ce qui permet l'hybridation spécifique avec sa séquence complémentaire sur le matériel d'étude. Celui-ci peut être soit un frottis cellulaire avec des noyaux interphasiques (FISH interphasique), soit une préparation chromosomique obtenue selon les méthodes cytogénétiques habituelles (FISH métaphasique).

- ***Puce à ADN :***

Les puces à ADN, permettent de mesurer simultanément et quantitativement l'expression de plusieurs milliers de gènes à partir d'un support solide de taille réduite (quelques cm²).

Principe général :

Le principe de fonctionnement des puces à ADN se fonde plus précisément sur la propriété d'hybridation spécifique entre deux séquences complémentaires d'acides nucléiques. Ainsi, un jeu ordonné de plusieurs milliers de séquences d'ADN, ADN complémentaire (ADNc) ou oligonucléotides de synthèse, est immobilisé sur une surface solide. Chaque emplacement de séquence est soigneusement annoté (la position $x_i; y_i$ correspond au gène i). Par la suite, les acides nucléiques à étudier, préalablement marqués, sont hybridés sur ce support solide. L'intensité du signal au niveau d'une séquence donnée sera proportionnelle à la quantité de gène cible dans l'échantillon analysé. Cette méthode peut être utilisée aussi bien pour quantifier l'expression des gènes avec l'ARN comme substrat de départ que pour mesurer le nombre de copies d'un gène avec de l'ADN génomique comme substrat (SBH, CGH array...).

Dans le cas du diagnostic moléculaire du cancer, les sondes des puces vont couvrir l'ensemble des mutations potentielles (substitution, délétion, addition). De manière générale, l'analyse de substitutions (pour une position donnée) implique donc l'utilisation de quatre sondes, une pour la séquence sauvage et trois pour chacun des nucléotides pouvant se substituer au nucléotide original. Cela permet ainsi de repérer des séquences mutantes dans un échantillon test (Fig. 3, planche 1).

Planche 1

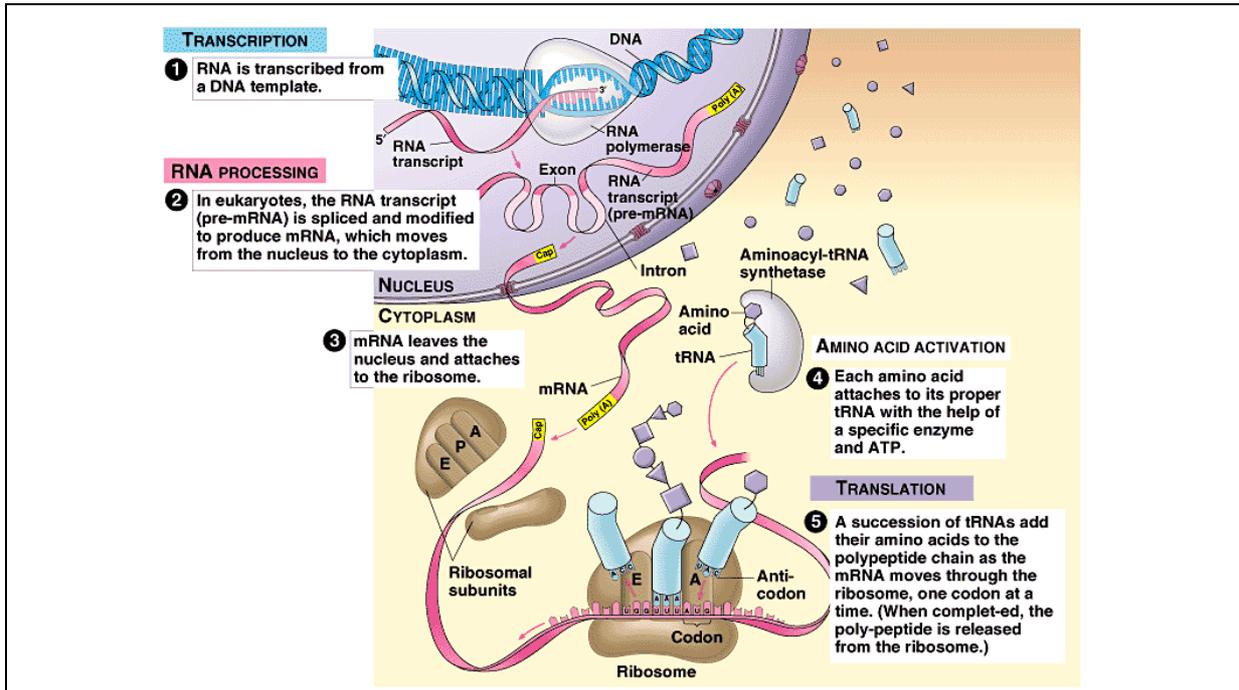


Figure 2 : Schéma de transcription et de traduction [56]

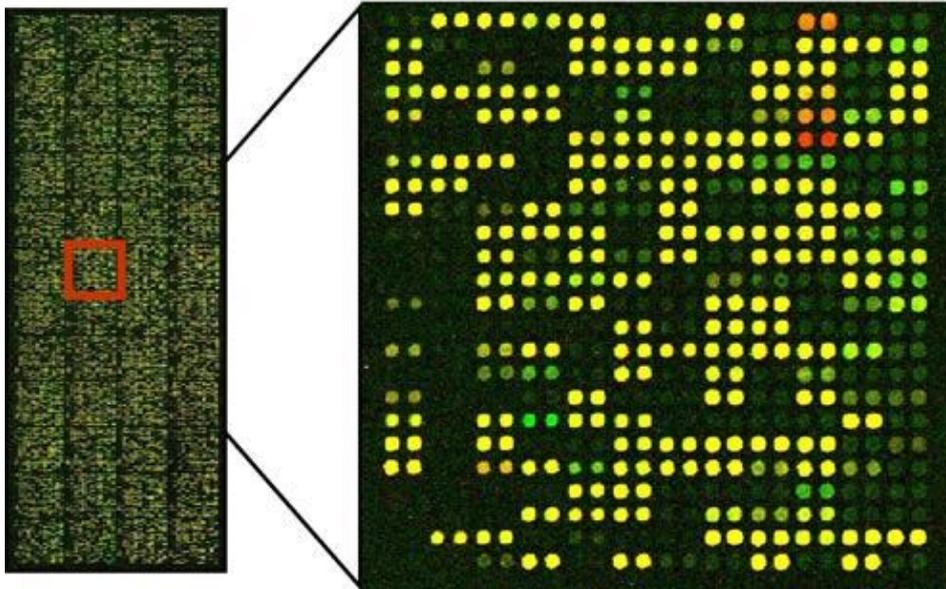


Figure 3 : Signal de la puce à ADN [57]

Gènes suppresseurs de tumeur et oncogènes :

Les gènes suppresseurs de tumeur BRCA1/2 et P53 occupent une place très importante dans l'oncogenèse du cancer du sein. Leurs importants rôles dans la réparation de l'ADN sont démontrés lors de la perte de leur fonction par mutation. Tandis que l'oncogène Her 2, il rend compte de l'agressivité du cancer du sein quand il est amplifié.

5) HER 2

Le récepteur HER-2 appartient à la famille HER des récepteurs de facteur de croissance dont le chef de file est le récepteur de facteur de croissance épidermique *Epidermal Growth Factor Receptor 1* (EGFR) ou HER-1. C'est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase de 185 kDa, codé par le gène *cerb-B2* ou *HER2/neu*, proto-oncogène situé sur le bras long du chromosome 17 (17q21.1). Il présente une structure bien caractéristique organisée en trois domaines :

- Un domaine extracellulaire présentant deux domaines riches en cystéine (ou boucles de dimérisation) et deux domaines de liaison du ligand ;
- Un domaine transmembranaire qui permet l'ancrage du récepteur dans la membrane cellulaire ;
- Un domaine intracytoplasmique riche en résidus tyrosine qui comprend le domaine catalytique tyrosine kinase.

Chez l'homme, la protéine HER-2 est normalement exprimée dans l'épithélium de très nombreux organes (sein, poumon, estomac, vessie, pancréas, prostate, placenta...) et à de très faibles niveaux dans le myocarde. Elle dirige tout un réseau hiérarchisé et complexe de signalisation qui implique les quatre récepteurs de la famille HER [36]. Les signaux transmis par les hétérodimères contenant HER-2 sont contrôlables et conduisent à une croissance cellulaire normale.

Cependant, elle est surexprimée dans 20 % des cancers du sein invasifs, 54 à 100 % des cancers colorectaux, 25 % des cancers de l'ovaire, 17 à 82 % des cancers du pancréas et 34 % des cancers de la prostate [37] et [29]. Des études in vitro et in vivo ont démontré le rôle de HER2 aux différents niveaux du processus tumoral :

- La prolifération cellulaire ;
- La transformation maligne de lignées cellulaires en culture ;
- La mobilité cellulaire (élément déterminant dans le potentiel métastatique des cellules tumorales).

5-1 Her 2 et amplification génique :

L'amplification génique a pour conséquence, en règle, l'hyperexpression du ou des gène(s) amplifié(s), et, lorsqu'il s'agit d'un oncogène comme HER2, elle donne un avantage sélectif prolifératif aux cellules qui en sont porteuses. L'amplification et/ou la surexpression de HER2 serait une des causes de transformation cancéreuse des cellules par un mécanisme de potentialisation de la croissance cellulaire. L'évaluation de la surexpression de la protéine

HER2 par immuno-histochimie (IHC) chez des patientes atteintes de cancer du sein infiltrant permet de prédire leur réponse au traitement d'Herceptin[®] ou trastuzumab qui a montré son efficacité en situations palliatives, néoadjuvantes et depuis peu adjuvantes, au point d'être considéré comme une « révolution thérapeutique » [30].

Cette surexpression est corrélée à une plus grande agressivité tumorale, à un risque accru de récurrence et à un pronostic sombre. La surexpression de HER2 au niveau de la membrane des cellules tumorales en a fait une cible de choix pour l'immunothérapie anticancéreuse.

5-2 Vaccination anti-her2 :

Dès 1994, différentes études ont permis de mettre en évidence chez certains patients atteints de tumeurs surexprimant HER2, une réponse immunitaire anti-HER2. Cette immunité serait associée à une limitation du développement tumoral et des métastases dans les stades précoces de la maladie. Associées à l'efficacité aujourd'hui démontrée d'une immunothérapie passive anti-HER2 à base de trastuzumab, ces observations ont conduit au développement de différentes stratégies vaccinales anti-HER2.

Les Ag utilisés dans le cadre de la vaccination anti-HER2 peuvent être soit non spécifiques, à base de cellules tumorales allogéniques ou de cellules autologues, soit spécifiques de HER2 pouvant être délivrés soit via des cellules présentatrices d'Ag (CPA) et notamment les cellules dendritiques (CD), soit sous forme d'ADN, de peptides ou de protéines.

6) P53

Appelée gardienne du génome, la protéine du gène p53 remplit cette fonction suite à des signaux de stress en stimulant l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire ou la réparation de l'ADN, ce qui la présente comme prototype des gènes suppresseurs de tumeur.

6-1 Structure de la protéine :

La protéine p53 humaine est une phosphoprotéine de 393 acides aminés. Son organisation en domaines fonctionnels est caractéristique de celle d'un facteur de transcription (fig. 4, planche 2). Ses régions principales sont :

- La région N-terminale : comprend un domaine acide (résidus 1-42) responsable de l'interaction de p53 avec les composants de l'appareil transcriptionnel, ainsi qu'une région riche en résidus proline (résidus 63-97).
- La région centrale : correspond au domaine de fixation spécifique à l'ADN (résidus 100-300). C'est une région très structurée qui se fixe spécifiquement à une séquence comportant deux motifs de 10 paires de bases, retrouvée dans tous les gènes cibles de p53.
- La région C-terminale : comprend le domaine de tétramérisation (résidus 335-356) qui facilite la fixation spécifique de p53 à la séquence d'ADN et un domaine basique (résidus 363-393) qui participe à la régulation négative de l'activité de p53 lorsque cette protéine doit être maintenue sous une forme inactive.

6-2 Activation de p53 :

Son activation est effectuée en trois temps :

Premier temps : cette étape consiste en la neutralisation des interactions de p53 avec les protéines qui médient sa dégradation, notamment hdm2, (l'homologue humain de la protéine de souris mdm2) et la forme inactive de la kinase de stress JNK (c-jun-N-terminal kinase), ces deux protéines qui se lient à p53 et agissent comme des ubiquitines-ligases pour l'expédier vers le protéasome où elle est dégradée.

Deuxième temps : La région N-terminale de p53 interagit avec les molécules à activité histone-acétyl transférase qui acétylent les résidus lysine présents au niveau de la partie C-terminale, d'où un changement de conformation qui libère le domaine central de la régulation négative. D'autres modifications post-traductionnelles complètent et stabilisent ce changement de conformation.

Troisième temps : La p53 se lie à l'ADN d'une façon dépendante des conditions d'oxydo-réduction. L'architecture moléculaire du domaine de liaison à l'ADN doit sa stabilité à la présence d'un atome de zinc coordonné par des résidus sensibles à l'oxydo-réduction.

La protéine p53 est localisée généralement dans le noyau cellulaire et est normalement exprimée à faible taux avec une courte demi-durée de vie. Un grand nombre de mutations ponctuelles distinctes dans le gène p53 ont été décrites et une partie d'entre elles est appelée mutations fortes dans la mesure où elles ont un effet dominant-négatif, la protéine mutante se fixe à la protéine sauvage et inactive celle-ci dans les cellules hétérozygotes pour la mutation, p53

sauvage fonctionne comme un homotétramère et les mutants p53 exercent un effet dominant-négatif dans des complexes hétérotétramères contenant à la fois les formes sauvages et mutées de p53. La fonction d'oligomérisation réside dans le domaine C-terminal de p53, en dehors de la région où sont localisées la plupart des mutations.

Après exposition des cellules à des agents génotoxiques, tels que des radiations ionisantes, il se produit une augmentation transitoire du taux de p53 accompagnée d'une activation de cette protéine due à des modifications post-traductionnelles (phosphorylation, acétylation, O-glycosylation). Cette accumulation et cette activation de p53 peuvent avoir deux conséquences alternatives : l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 ou l'apoptose. Une conséquence de l'arrêt du cycle cellulaire peut être de donner à l'ADN cellulaire le temps d'être réparé avant l'entrée en phase S, ce qui assure la stabilité génomique. Alternativement, l'accumulation et l'activation de la protéine p53 peuvent causer l'apoptose avec, pour conséquence, l'élimination des cellules contenant des chromosomes altérés. En réponse à l'irradiation ionisante, le choix de la cellule entre l'arrêt en G1 ou l'apoptose dépend notamment du type cellulaire et d'autres facteurs encore mal connus.

7) BRCA1 et BRCA2

a) Présentation :

Les femmes qui héritent des mutations dans l'un de ces gènes ont une chance de plus de 85% de développer un cancer du sein à l'âge de 70 ans. BRCA1 et BRCA2, localisés respectivement sur les chromosomes 17 et 13, sont dits suppresseurs de tumeur parce que l'allèle sauvage est fréquemment perdu dans les tumeurs de porteurs hétérozygotes. En plus du cancer du sein, les porteurs de ces mutations ont un risque élevé de cancer de l'ovaire, de la prostate et du pancréas.

Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer le rôle de BRCA1 et BRCA2 dans le maintien de la stabilité du chromosome à travers des fonctions dans la réplication de l'ADN. Les fourches de réplication arrêtées suite à divers mécanismes comme des lésions de bases, cassures d'ADN ou lacunes dans les brins, entraînent un besoin de la recombinaison homologe (RH) pour redémarrer la réplication. Si la recombinaison homologe n'est pas fonctionnelle, les fourches arrêtées conduisent à des ruptures persistantes d'ADN et par conséquent, des réarrangements de chromosomes. Ces phénomènes sont fréquents dans les cellules qui sont déficitaires en BRCA1 et BRCA2.

b) Les deux protéines :

Les deux gènes codent pour des protéines représentées sur la figure 5 de la planche 2 :

Le domaine RING de BRCA1 est un domaine d'interaction protéine-protéine qui est supposé avoir une activité ubiquitine ligase. Le domaine BRCT est un autre site d'interaction protéine-protéine qui est retrouvé principalement dans les protéines impliquées dans le métabolisme et la réparation de l'ADN, il semble réguler le chargement de RAD51¹ sur l'ADN.

BRCA2 contient neuf sites d'interaction avec RAD51 : huit sites répétés et un site carboxy-terminal indépendant. BRCA1 et BRCA2 contiennent tous les deux des séquences de localisation nucléaire (NLS). Les deux protéines ont été détectées dans 26 échantillons de lait directement après l'accouchement, elles sont présentes après formation par exocytose des lipides des cellules épithéliales des glandes mammaires (Vissac C et al 2002).

7-1 BRCA1

7-1-1 BRCA1 et réparation de l'ADN

a) RAD51

Le premier indice faisant allusion que BRCA1 et BRCA2 peuvent jouer un rôle dans la voie de réparation de l'ADN est leur association avec RAD51. BRCA2 semble interagir directement avec sa protéine, hRAD51, à l'aide de deux sites de liaison – l'un dans la partie N-terminale de la région codée par l'exon 11 et un autre dans la partie C-terminale de la protéine. Il semble jouer un rôle important dans la régulation de sa disponibilité et de son activité. Paradoxalement, BRCA1 se trouve dans le même emplacement mais n'interagit pas directement avec hRAD51. Tous les deux font partie d'un complexe multiprotéique qui contient encore de l'ARN polymérase II. Certaines données

¹ Gène responsable de la réparation de l'ADN, homologue de RecA chez la bactérie.

suggèrent que BRCA1 se lie à hRAD50 qui est impliquée dans la réparation de la cassure des deux brins et dans la jointure non homologue. Cependant, hRAD 50 ne se trouve pas à côté de hRAD 51 ni en cas d'absence ou de présence de dégâts, ils n'interagissent pas non plus (Maser et al. 1997).

b) Ataxia Telangiectasia Mutated et Ataxia Telangiectasia and Rad3 related :

La réponse efficace aux dommages d'ADN exige des mécanismes de sa détection, ainsi que la transduction de son signal aux agents responsables de l'arrêt du cycle cellulaire et de la réparation. Les kinases : ATM (ataxia telangiectasia mutated) et ATR (ataxia telangiectasia and Rad3 related), sont essentielles à la réponse aux dommages de l'ADN. La perte d'ATM supprime les points de contrôle dans la transition G1-S, la phase S et la limite de G2-M.

ATM phosphoryle BRCA1 également après traitement par des radiations ionisantes, dans la mesure d'induire une réponse à l'agression d'ADN. Tout comme ATM, ATR phosphoryle à son tour BRCA1. D'un côté, la phosphorylation de BRCA1 après des radiations ionisantes est largement ATM-dépendante, de l'autre côté, la phosphorylation en réponse à un arrêt de réplication induit par l'hydroxyurée ou des dégâts UV nécessite ATR. Additionnellement, ATR se trouve à côté de BRCA1 en réponse à un arrêt de réplication. Ce qui suggère que les voies à travers lesquelles ATM et ATR activent BRCA1 sont distinctes et elles répondent à différentes classes de dégâts d'ADN.

7-1-2 BRCA1 et ARNm

Un rôle en plus de BRCA1 est dans le processus de l'ARNm. *Kleiman et Manley* [49] ont démontré que BARD1² interagit avec le facteur de la polyadénylation³ CstF et inhibe le processus des précurseurs des extrémités 3' de l'ARNm. Une étude similaire du même groupe [43] a démontré que des dommages d'ADN soit par UV ou hydroxyurée peuvent inhiber la polyadénylation in vitro et cette inhibition est effectuée par l'interaction BARD1–CstF. La régulation de la polyadénylation est censée jouer un rôle important dans le contrôle de la croissance cellulaire. Un complexe contenant BRCA1, BARD1 et CstF augmente transitoirement en suivant les dommages d'ADN et inhibe la polyadénylation. Ceci peut prévenir les procédés inappropriés d'ARN et la production de transcrits aberrants.

7-1-3 BRCA1 et remodelage de la chromatine

BRCA1 réside dans le BASC⁴, contenant l'hélicase du remodelage de l'ADN BLM et dans un complexe distinct avec les protéines SWI-SNF qui remodelent la chromatine. BRCA1 interagit également avec une autre hélicase, BACH1, qui est impliquée dans la réparation des DSBs. Ceci dit, ces observations suggèrent que certains rôles de BRCA1 dans la transcription et la réparation de l'ADN peuvent être reliés au remodelage de la structure de l'ADN autour des kits de la transcription basale, les fourches de répllication arrêtées et les DSBs.

² BRCA1-Associated RING Domain Protein 1

³ L'addition de la queue polyA sur l'ARNm.

⁴ The BRCA1 associated genome surveillance complex.

7-1-4 Interactions de BRCA1

BRCA1 a des interactions biochimiques avec au moins 13 protéines différentes qui sont impliquées dans la réparation de l'ADN et la susceptibilité aux cancers, ce qui suggère que BRCA1 existe dans un réseau de signalisation essentiellement dédié à l'intégrité du génome [17], [32], [34], [35] et [26]. (fig 6. Planche 3)

L'exon 11 code des protéines phosphorylées par ATM kinase ou ChK2. La délétion de l'exon donne une instabilité génomique et une recombinaison homologue altérée, mais donne toujours une protéine qui se localise dans les sites DSBs. Les souris avec les mutations de l'exon 11 présentent une létalité prénatale.

7-2 BRCA2

Les gènes associés au cancer sont classés selon une certaine approche en deux groupes:

- Les gatekeepers (gardiens): représentés par les gènes suppresseurs de tumeur et les proto-oncogènes, responsables du contrôle et l'inhibition de la croissance cellulaire.
- Les carekeepers: ne sont pas directement reliés à la croissance cellulaire mais ils assurent l'intégrité du génome en réparant ses dégâts, citons comme exemple les gènes mlh1 et msh2, impliqués dans la réparation des discordances durant la réplication.

Certains gènes peuvent jouer les deux rôles à la fois, BRCA2 en est la preuve, en réparant l'ADN et en jouant un rôle de facteur régulateur de transcription d'autres gènes. Un autre exemple est le gène p53, il aide le génome à remédier aux mutations et assure les points de contrôle en arrêtant le cycle et réparer les dommages ou en entraînant l'apoptose de la cellule si les dégâts sont irréparables.

- La fonction carekeeper de BRCA2 : réparatrice d'ADN :

La plupart des informations à propos de BRCA2 sont originaires des études de la protéine murine. La séquence nucléotidique de gène BRCA2 murin est 74% similaire à l'humaine. Une observation a constaté une grande instabilité constitutionnelle d'une région restreinte du génome 9p23-24, chez des familles portant des mutations de BRCA2 [50]. Cette instabilité a été révélée par FISH et implique des réplifications et des inversions. Dans un certain nombre de cellules, des translocations et amplifications ont été détectées.

La majorité des mutations de BRCA2 sont des faux sens, donnant un arrêt prématuré de la transcription et en conséquence la synthèse d'une protéine plus courte et coupée en C-terminal, qui manque du Signal de Localisation Nucléaire (NLS) et du site de l'interaction avec RAD51, représentant l'élément essentiel dans la fonction de *carekeeper*.

- La fonction gatekeeper de BRCA2 : régulation de la transcription :

Les premières indications que BRCA2 est un facteur de transcription proviennent de l'observation que l'exon 3 (aa23-105) a un acide aminé homologue au facteur de transcription JUN. Cette région active la transcription chez les levures et les mammifères. Ce même domaine est exposé à la

phosphorylation *in vivo*, ce qui est cru comme régulateur de l'activité de BRCA2. Une indication supplémentaire de l'activité transcriptionnelle est que BRCA2 est co-immunoprécipitée avec le cofacteur de transcription P/CAF (p300/cBP-associated factor), une protéine ayant une activité histone-acétylase⁵. Etant donné que plusieurs facteurs de transcription ont aussi une activité histone-acétylase (GCN5, CBP/p300, TAFII250, SRC-1), il a été suggéré que la modification de la chromatine par histone-acétylation est une régulation des facteurs de transcription.

7-2-1 BRCA2 et dégâts d'ADN

La preuve impliquant BRCA2 dans la voie de réparation de l'ADN a été définie par *Connor et al. (1997)* et *Patel et al. (1998)*. En utilisant des souris ayant subi un raccourcissement du BRCA2 qui va donner un transcrit de BRCA2 plus long. Ils ont constaté que ces souris avaient un tiers de la taille des souris de génotype sauvage, sont plus sensibles aux radiations ionisantes et avaient une plus courte durée de vie, quant aux souris qui arrivent au stade adulte, elles développent des lymphomes du thymus.

Patel et al ont trouvé un ensemble d'anormalités spontanées dans les BRCA2Tr/Tr cellules, avec des cassures de la chromatine et formation de triradials et de quadriradials. Ces anormalités résultent d'un déficit dans l'échange de chromatine pendant la recombinaison de la mitose. Les triradials (formant Y, chromosome à trois bras), reflétant une fausse séparation après échange et les quadriradials (forme de star, chromosome à quatre bras), résultat d'un échange aberrant entre les chromosomes. Ces anormalités sont associées

⁵ Activité régulatrice de la transcription.

avec des taux élevés de p53 et p21. Des anomalies similaires sont observées dans les embryons Rad51-null (Lim and Hasty 1996).

Les sites de liaison entre BRCA2 et RAD51 ont été localisés, les mutants BRCA2 et RAD51 présentent la même hypersensibilité envers les radiations ionisantes comme si les deux protéines ont les mêmes fonctions dans la réparation d'ADN. D'après ces résultats, BRCA2 et hRAD51 sont impliqués dans le maintien de la différenciation appropriée des chromosomes ainsi que leur réparation.

7-2-2 BRCA 2 et amplification du centrosome

Les lignées cellulaires déficitaires en BRCA2 ainsi que les fibroblastes embryonnaires en culture des souris présentent une certaine aneuploidie et une amplification du centrosome, et toutes les tumeurs BRCA2 mutantes chez les humains et les souris présentent une amplification du centrosome (*Tutt et al., 1999 and Yu et al., 2000*). L'amplification résulte d'un effet direct sur la duplication du centrosome tôt dans la phase S et l'arrêt de la division cellulaire dans une forme d'échec de cytokinèse⁶.

7-2-3 BRCA2 dans la RH

Des progrès considérables ont été effectués pour élucider le rôle de BRCA2 dans la réparation de l'ADN ainsi que les mécanismes par lesquels la perte de sa fonction cause l'instabilité du génome. Les cellules homozygotes de souris par des mutations de BRCA2 sont plus sensibles à la mitomycine C (MMC), un phénotype associé à une recombinaison homologue anormale [39] et [40]. La MMC induit des ponts inter-brins qui sont normalement réparés par la

⁶ Division cytoplasmique

recombinaison homologue impliquant une conversion de gènes des brins frères [43]. Ils ont suggéré que BRCA2 est importante pour la réparation des DSBs par la conversion des gènes.

Davies et al. [44] ont suggéré que les BCR repeats de BRCA2 peuvent avoir un rôle dans le contrôle de la fonction de RAD51. Ils ont produit des peptides BRC-repeats synthétiques et démontré que la liaison de ces peptides à RAD51 prévient la formation d'un filament nucléoprotéique RAD51-ADN. Ce qui suggère un rôle de BRCA2 dans la modification de l'activité de liaison de RAD51 à l'ADN, probablement en empêchant la formation de complexes multimériques RAD51. Il est possible que la liaison BRCA2-RAD51 mette RAD51 dans un état inactif, en prévenant des interactions indésirables avec le noyau. Ce qui maintient RAD51 dans un état où il est prêt pour se déplacer vers les sites des dommages d'ADN, où l'activation ultérieure permet la réparation par conversion de gènes [44]. Ce modèle correspond parfaitement avec l'observation que les cellules humaine et murines déficientes en BRCA2 échouent à développer les foyers nucléaires de RAD51 après induction par des dommages d'ADN.

7-2-4 Fanconi anaemia, BRCA1 et BRCA2

Certaines données imprévisibles et informatives sur le rôle des gènes BRCA dans la réparation de l'ADN humain proviennent des études sur Fanconi anaemia (FA), un trouble compliqué caractérisé par des anomalies congénitales, échec de la progression de la moelle osseuse et la susceptibilité au cancer. FA est un trouble hérité de façon récessive qui peut résulter d'une mutation dans au moins huit gènes individuels, ils codent diverses protéines dont plusieurs interagissent avec un nouveau complexe cellulaire qui est impliqué

dans la maintenance de la stabilité du génome. Les conséquences cellulaires d'homozygotie dans les BRCA2 mutants, dont l'instabilité spontanée du chromosome et l'hypersensibilité aux agents qui engendrent les ponts inter-brins sont similaires à ceux observés dans les cellules dérivées des patients à FA. Chose qui a incité les auteurs à déterminer la séquence du gène BRCA2 chez les patients à FA : un patient a été trouvé portant deux mutations incomplètes dans BRCA2 qui étaient typiques à ceux qui causaient la susceptibilité au cancer de sein dans les hétérozygotes.

Ce n'est pas le premier lien qui a été observé entre FA et la susceptibilité au cancer du sein, une autre protéine FA- complementation-group, FANCD2, peut interagir et se trouver à côté de BRCA1. En plus, FANCD2 et BRCA1 peuvent être phosphorylées par ATM, ce qui est démontré impliqué dans la susceptibilité au cancer du sein. Il apparaît que les voies impliquées dans FA et la susceptibilité au cancer du sein sont reliées à plusieurs niveaux.

Planche 2

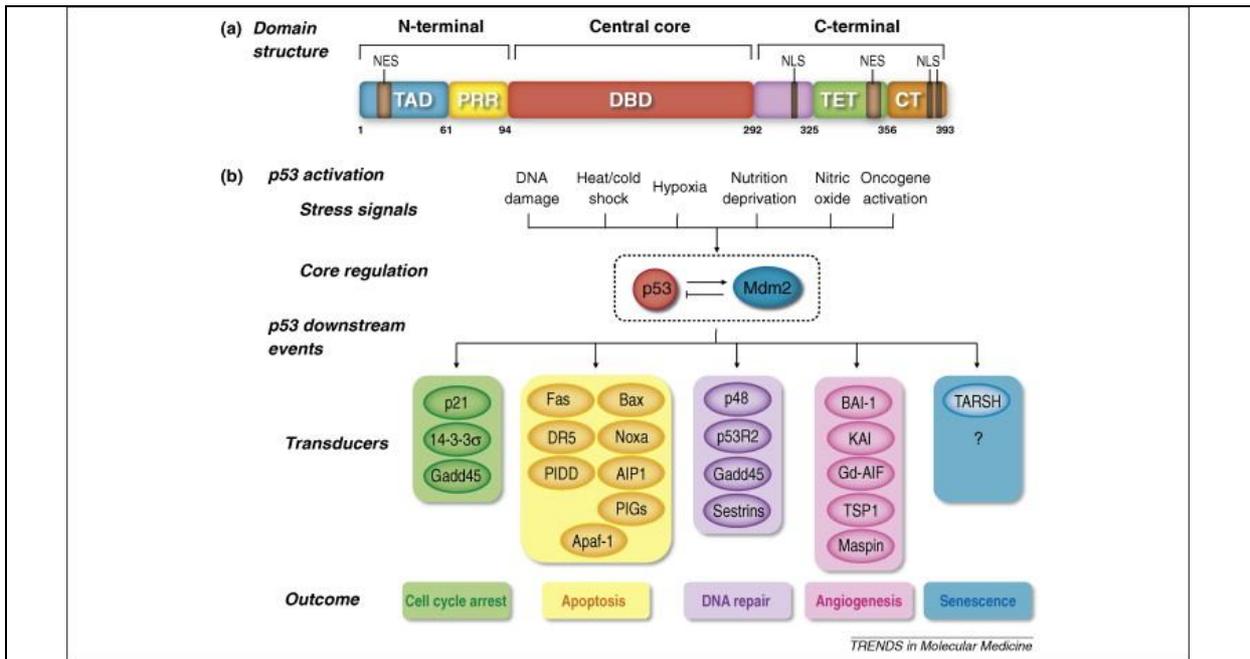


Figure 4 : Structure de la protéine P53 [27]

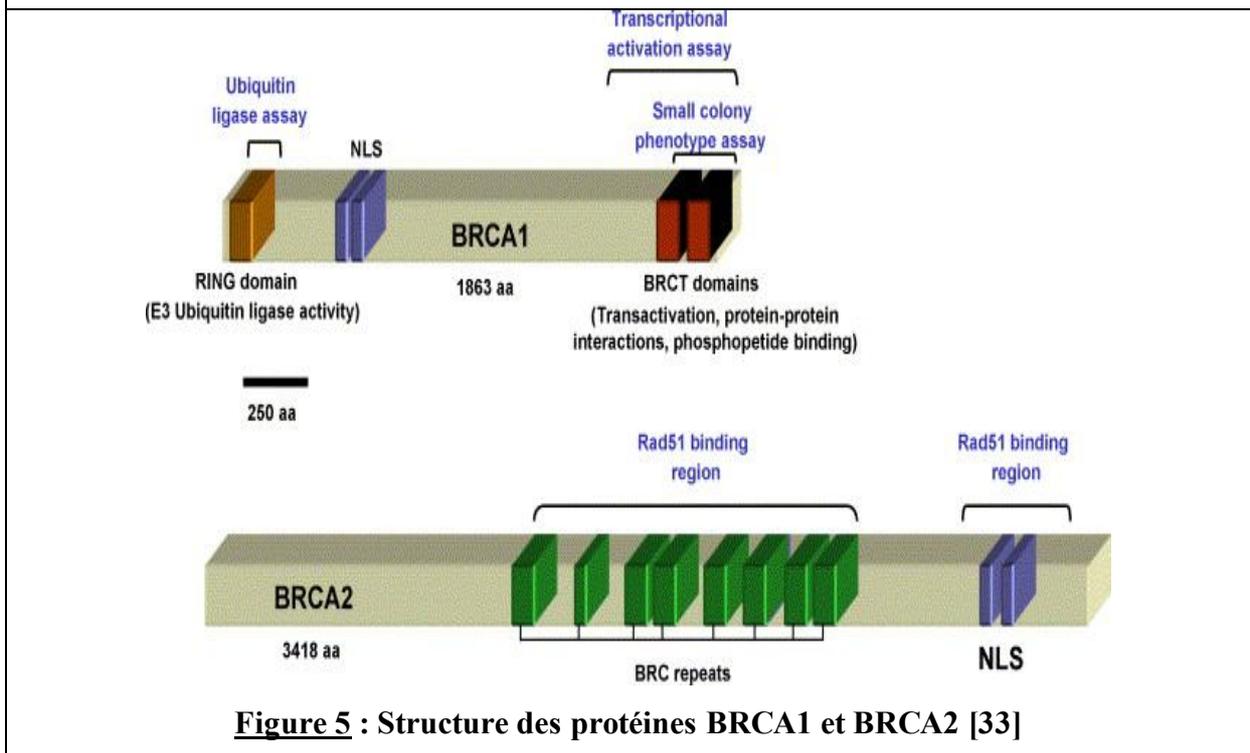


Figure 5 : Structure des protéines BRCA1 et BRCA2 [33]

Planche 3

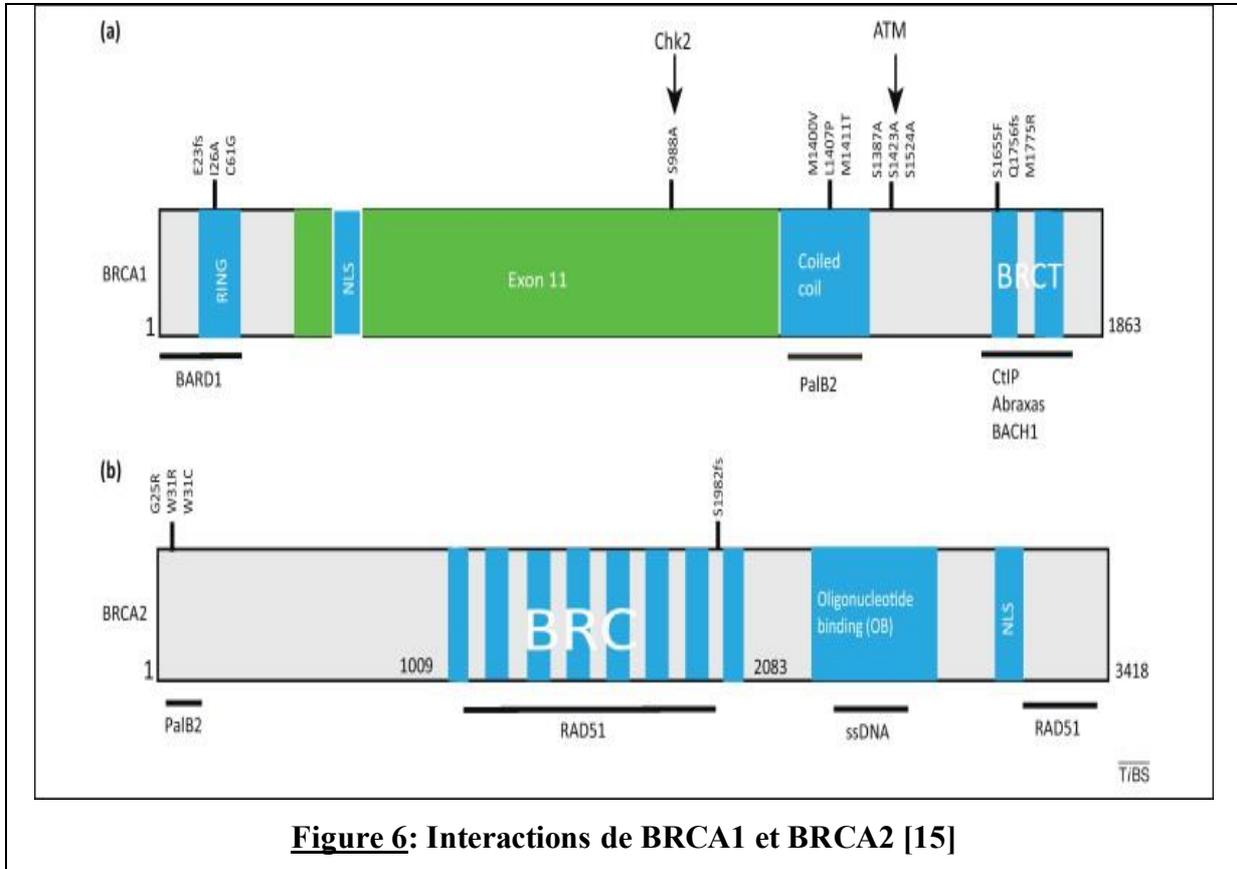


Figure 6: Interactions de BRCA1 et BRCA2 [15]



Matériels et méthodes

Introduction

Dans le cadre de l'étude de ces marqueurs génétiques, et, dans le cadre de ma thèse de fin d'études de pharmacie, j'ai intégré un projet fédérateur, dont l'intérêt principal est la détection de mutations des gènes suppresseurs de tumeur P53, BRCA1, BRCA2, et la détection d'amplification de l'oncogène Her2/neu. Le but étant de comparer le génotypage par PCR, séquençage partiel et séquençage intégral avec le génotypage rapide par PCR en temps réel. Ce, afin d'obtenir des résultats génétiques et épidémiologiques sur les marqueurs génétiques du cancer au Maroc, ainsi que d'initier le diagnostique moléculaire du cancer en laboratoire d'analyse clinique.

Initialement, nous avons préparé une banque de sang collecté au centre d'Oncologie du 16 novembre et du centre d'Oncologie Nakhil, du 20/05/2013 au 15/10/2013, à partir de 200 patientes et patients, atteints de cancer du sein, dont 44 contrôles négatifs, volontaires et consentant, avec leurs dossiers cliniques ainsi que leurs antécédents médicaux référés par leurs médecins traitant dans le cadre d'une collaboration scientifique.

La banque de sang, les consentements éclairés ainsi que les informations cliniques concernant les patients et les contrôles négatifs, ont été archivés et numérisés en banque de données. Nous avons également développé une application informatique nommée Moroccan Cancer Data Base MCDB afin d'exploiter les informations de cette banque de données numérisée.

Par la suite, nous avons préparé une banque d'ADN et procédé, après analyse des séquences et conception d'amorces, à l'amplification par PCR et au séquençage de nos marqueurs génétiques.

Les premières séquences obtenues et qui concernent les exons 19 et 20 de BRCA2 constituent les résultats de ma thèse de fin d'études.

1) Application informatique :

1-1) Matériel :

Nous avons utilisé le langage Visual Basic pour développer une application informatique, visant à organiser et faciliter l'exploitation de la base de données de patients recueillie. Cette base de données, constituée à partir de 156 patients et de 44 contrôles, est validée par leur consentement éclairé et leur questionnaire dûment rempli.

Les tables, gérées par le Système de Gestion de Bases de Données SQL, contiennent tous les champs cités sur le questionnaire (Voir annexe N°1 et 2) :

- a) La date du prélèvement ;
- b) Le code du prélèvement ;
- c) Le nom et prénom du sujet ;
- d) Le sexe ;
- e) L'âge ;
- f) La situation familiale ;
- g) La ville ;
- h) Age de la première menstruation ;
- i) Age de la première grossesse ;
- j) Nombre de grossesses ;
- k) Age de la ménopause ;

- l) Date du Diagnostique ;
- m) Age au Diagnostique ;
- n) Histologie ;
- o) Grade ;
- p) Taille de la tumeur ;
- q) Stade TNM ;
- r) Nodule ;
- s) Récepteurs hormonaux ;
- t) Bilatéralité ;
- u) Pronostic ;
- v) Herceptest ;
- w) Cas familiaux de cancer du sein;
- x) Cas familiaux de cancers autres que celui du sein ;
- y) Nom du médecin.

1-2) Réalisation :

Comptes d'utilisateurs :

L'application permet la gestion des comptes d'utilisateurs. Chaque médecin a son propre compte sécurisé par un mot de passe afin de consulter la liste de ses patients. Le chercheur, quant à lui, il a une visibilité sur tous les patients.



Figure 7 : Capture d'écran de l'interface Authentification

Après l'authentification, l'utilisateur accède au menu principal :

- a) Saisie des patients ;
- b) Consultation des fiches des patients ;
- c) Liens utiles.

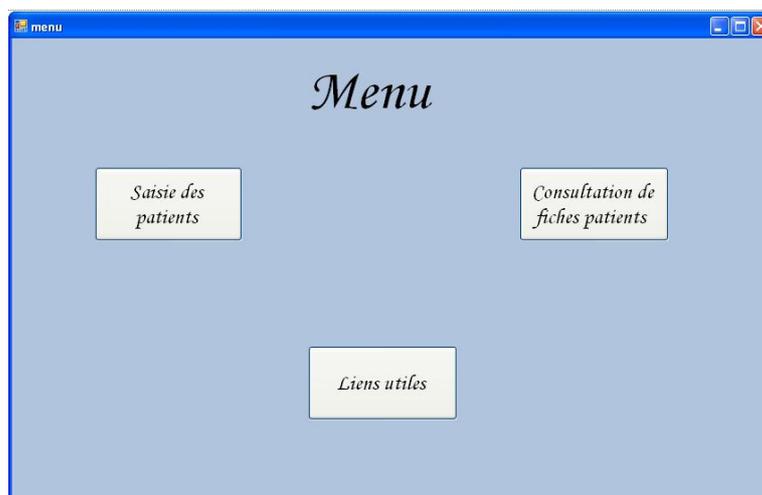


Figure 8: Capture d'écran de l'interface Menu

Formulaire de saisie :

L'interface de saisie permet d'archiver les renseignements sur les patients comme présentés sur le questionnaire (Voir annexe N°1 et 2) :

The screenshot shows a web application window titled "Patient (Exécution) - Microsoft Visual Studio". The main heading is "Saisie des patients". The form is organized into several sections:

- Code:** A text input field.
- Informations générales:** Includes fields for "Nom et prénom", "Sexe" (radio buttons for M and F), "Age", "Ville", and "Situation familiale".
- Grossesse:** Includes fields for "Age de la première menstruation", "Grossesse" (radio buttons for Oui and Non), "Age de la première Grossesse", and "Nombre de grossesses".
- Ménopause:** Includes "Ménopause" (radio buttons for Oui and Non) and "Age de la ménopause".
- Diagnostique:** A large section with multiple fields: "Date du diagnostique", "Age au diagnostique", "Histologie", "Grade", "Taille de la tumeur", "Stade TNM", "Nodule", "Récepteur Oestrogénique", "Récepteur Progestéronique", "Bilatéralité" (radio buttons for Oui and Non), "Pronostic", and "Herceptest".
- Cas familiaux:** Includes "Cas familiaux du cancer du sein" and "Cas familiaux d'autres cancer", both with text input fields.
- Top right:** Fields for "Date du prélèvement", "Nom du médecin traitant" (a dropdown menu showing "Dr. Benabid"), "Nom du chercheur", and "Nom de l'étudiant chercheur".
- Buttons:** "Contact" and "Enregistrer" buttons are located on the right side of the form.

Figure 9: Capture d'écran de l'interface Saisie des patients

Formulaire de recherche :

Le formulaire Recherche permet de lister les enregistrements suivant les mêmes critères de saisie.

The screenshot shows a web browser window with the title 'Reche (Exécution) - Microsoft Visual Studio en ligne - Google Chrome'. The main content is a search form titled 'Recherche'. The form includes the following fields and sections:

- Code**: A single text input field.
- Date du prélèvement**: Two text input fields with 'Entre' and 'Et' labels.
- Nom du médecin traitant**: A dropdown menu showing 'Dr. Benabid'.
- Informations générales**: A section containing:
 - Sexe**: Text input with 'ex: FM'.
 - Situation familiale**: Text input.
 - Age**: Two text input fields with 'Entre' and 'Et' labels, 'ex: 20'.
 - Ville**: Text input.
- Diagnostic**: A section containing:
 - Date du diagnostique**: Two text input fields with 'Entre' and 'Et' labels, 'ex: 20'.
 - Age au diagnostique**: Two text input fields with 'Entre' and 'Et' labels, 'ex: 20'.
 - Histologie**: Text input.
 - Grade**: Text input.
 - Taille de la tumeur**: Two text input fields with 'Entre' and 'Et' labels, 'En mm ex: 5'.
 - Stade TNM**: Text input.
 - Nodule**: Text input.
 - Récepteur Oestrogénique**: Text input.
 - Récepteur Progestéronique**: Text input.
 - Bilatéralité**: Text input.
 - Pronostic**: Text input.
 - Herceptest**: Text input.
- Grossesse**: A section containing:
 - Age de la première menstruation**: Two text input fields with 'Entre' and 'Et' labels, 'ex: 20'.
 - Grossesses**: Text input.
 - Age de la première Grossesse**: Two text input fields with 'Entre' and 'Et' labels, 'ex: 20'.
 - Nombre de grossesses**: Two text input fields with 'Entre' and 'Et' labels, 'ex: 2'.
- Ménopause**: A section containing:
 - Ménopause**: Text input.
 - Age de la ménopause**: Two text input fields with 'Entre' and 'Et' labels, 'ex: 20'.
- Cas familiaux de cancer du sein**: A section containing:
 - Cas familiaux du cancer du sein**: Text input with 'ex: O/N'.
- Cas familiaux d'autres cancers**: A section containing:
 - Cas familiaux d'autres cancer**: Text input with 'ex: O/N'.
- Lancer la recherche**: A button at the bottom right.

Figure 10: Capture d'écran de l'interface Recherche

Liens utiles :

Le bouton liens utiles permet d'ouvrir des pages web tels que:

- a) « Genbank » pour consulter les séquences des gènes BRCA1/2, P53 et Her2 ;
- b) « The TP53 website » pour consulter les mutations de P53 impliquées dans le cancer du sein ;
- c) Les bases de données des mutations de P53, BRCA1 et BRCA2 ;

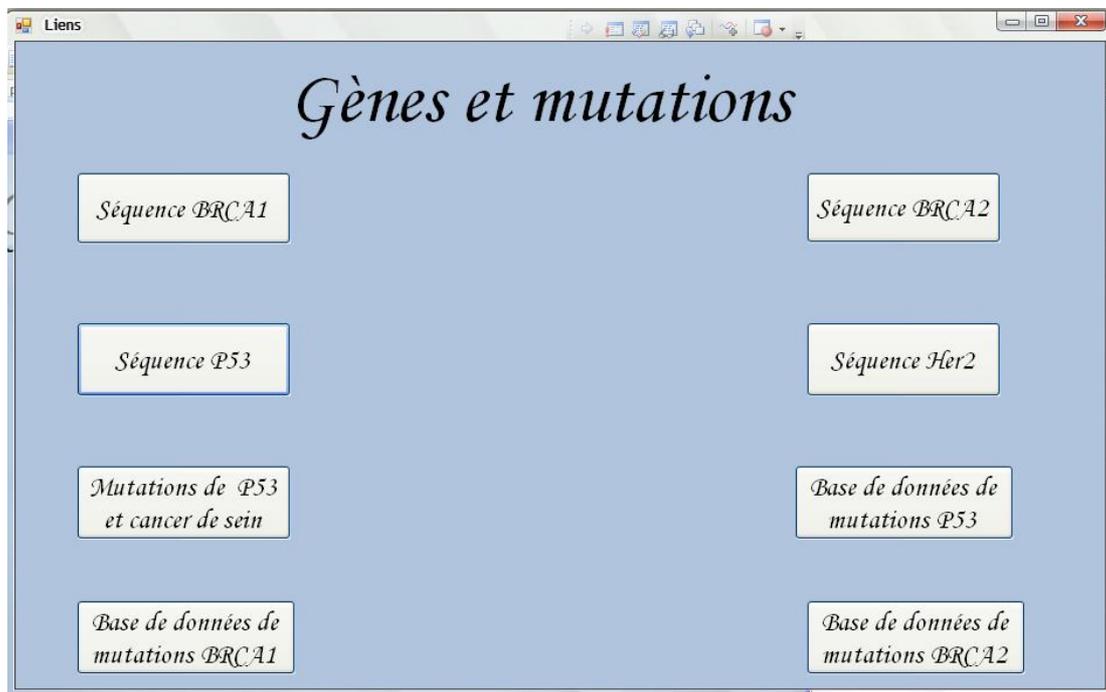


Figure 11: Capture d'écran de l'interface Liens Utiles

2) Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN est une technique qui isole de l'ADN à partir d'une cellule en quantité et en qualité suffisante pour permettre son analyse. Afin d'obtenir des acides nucléiques hautement purifiés exempts de tout contaminant visible, des méthodes d'extraction adéquates devraient être appliquées et les contaminants susceptibles d'inhiber la réaction PCR doivent être évités.

Classiquement, l'extraction de l'ADN débute par la destruction des cellules pour libérer l'ADN en utilisant : un détergent pour dissoudre les lipides des membranes cellulaires, une enzyme qui hydrolyse les protéines, et des agents de chélation qui capturent les ions pour faciliter leur élimination ultérieure. Ensuite, le couple phénol-chloroforme permet de précipiter les protéines, l'ADN reste en solution dans la phase aqueuse qui est récupérée par centrifugation. Enfin, l'alcool pur est ajouté à la phase aqueuse pour précipiter l'ADN sous forme d'une pelote récupérée par centrifugation. L'ADN obtenu est lavé à l'alcool à plusieurs reprises pour solubiliser toute impureté indésirable.[51]

D'autres techniques d'extraction s'ajoutent à la méthode classique :

- La technologie des billes magnétiques :

Après digestion enzymatique et solubilisation des lipides dans une solution spécifique, l'ADN chargé négativement est mis en contact avec des billes magnétiques chargées positivement afin qu'il s'accroche à celles-ci. La solution est éliminée alors que les billes sont maintenues à l'aide d'un aimant. Une autre solution de composition différente est ensuite ajoutée aux billes afin de neutraliser leur charge. L'ADN est alors libéré dans cette seconde solution.[51]

- Les cartes FTA® :

Une carte de papier Whatman FTA® est imprégnée d'un traitement chimique qui permet, lorsqu'un échantillon est déposé sur celle-ci, la destruction cellulaire et l'immobilisation de l'ADN dans la carte. Pour récupérer l'ADN, la zone correspondante de la carte est prélevée à l'aide d'un emporte-pièce et lavée dans une solution spécifique.[51]

Quantification de l'ADN :

L'ADN, peut être mesuré directement dans des solutions aqueuses sous forme diluée ou non diluée en mesurant l'absorption A en lumière ultraviolette (mais aussi dans le spectre visible). La concentration d'acides nucléiques est généralement déterminée par une mesure effectuée à 260 nm contre un échantillon appelé « blanc ». L'interférence par des contaminants se reconnaît par calcul d'un « ratio ». Les protéines absorbant à 280 nm, le ratio A260/A280 est utilisé pour estimer la pureté de l'acide nucléique. L'ADN pur devrait avoir un ratio d'environ 1,8. L'absorption à 230 nm reflète la contamination de l'échantillon par des substances telles que les hydrates de carbone, les peptides, les phénols ou les composés aromatiques. Dans le cas d'échantillons purs, le ratio A260/A230 devrait être d'environ 2,2.

Une méthode alternative, en l'occurrence, la méthode de la plaque d'agarose au bromure d'éthidium, est utile lorsqu'on ne dispose que de faibles quantités d'acide nucléique. La quantité d'acide nucléique peut être estimée par comparaison à une gamme de concentrations en utilisant l'intensité de la fluorescence émise par le bromure d'éthidium lorsque celui-ci est irradié par la lumière UV. [52]

2-1 Matériel :

Nous avons réalisé l'extraction d'ADN en utilisant le PureLink Genomic DNA Kits (Invitrogen®), de 156 échantillons de sang total de patients atteints de cancer du sein, ainsi que de 44 échantillons de sang total de contrôles négatifs. Le sang était prélevé sur tube EDTA.



Figure 12: Banque de sang recueillie

2-2 Principe :

Le PureLink™ Genomic DNA Kits se base sur la liaison sélective de l'ADN à la membrane en présence de sels chaotropiques. Le lysat est préparé à partir de tissus, de cellules ou de sang. Les cellules ou tissus sont digérés avec la Protéinase K à 55°C en utilisant un tampon de digestion optimisé pour aider à la dénaturation protéique et l'activité de la protéinase K.

L'excès d'ARN est éliminé par digestion avec l'RNase A qui est essentielle à la liaison des échantillons à la membrane de silice. L'éthanol, ainsi qu'un tampon de liaison sont ajoutés au lysat pour permettre une liaison optimale à la PureLink™ Spin Column. L'ADN se lie à la membrane de la colonne, les impuretés sont éliminées par lavage avec les tampons de lavage et l'ADN est élué dans des tampons hyposalés d'éluion.

2-3 Les avantages:

Les avantages de PureLink™ Genomic DNA Kits sont :

- Une purification rapide et efficace de l'ADN génomique à partir d'une variété d'échantillons tels que : les cellules et tissus de mammifères, le sang, les queues de rats, les bactéries, les levures...
- Une lyse simple de cellules et tissus à l'aide de la protéinase K sans avoir recours à une lyse mécanique.
- Une contamination minimale par l'ARN.
- Une fiabilité de l'ADN obtenu pour PCR, enzymes de restriction et Southern blotting.

2-4 Les étapes :

Etape	Procédure
Préparation des lysates	Les protéines sont dénaturées par la protéinase K à l'aide d'un tampon de digestion, l'ARN est dégradé à l'aide de l'RNase. L'éthanol, ainsi qu'un tampon de liaison facilitent la liaison de l'ADN à la membrane.
Liaison de l'ADN	L'ADN se lie à la membrane de la colonne. La colonne est centrifugée.
Lavage de l'ADN	La colonne est lavée par les tampons de lavage mélangés à l'éthanol pour la débarrasser des débris cellulaires après centrifugation.
Elution de l'ADN	L'ADN est élué à l'aide des tampons d'éluion après centrifugation.

2-5 Les étapes de la technique du PureLink™ Genomic DNA Kits :

Étape	Procédure
Préparation des lysates	<ol style="list-style-type: none"> 1) Préparer le bain Marie à 55°C. 2) Dans un tube de microcentrifugation, ajouter 200 µL de sang total + 20 µL de protéinase K + 20 µL de RNase A. 3) Vortexer pendant 5 à 10 secondes et incuber à la température ambiante pendant 2 minutes. 4) Ajouter 200 µL de PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer + vortex. 5) Incuber à 55°C pendant 10 minutes. 6) Ajouter 200 µL de l'éthanol 96-100% + vortex. (L'éthanol empêche les pigments de se coller à la membrane).
Liaison de l'ADN	<ol style="list-style-type: none"> 7) Ajouter le lysat obtenu à la colonne et centrifuger à 10 000*g pendant 1 minute. 8) Insérer la colonne dans un tube collecteur.
Lavage de l'ADN	<ol style="list-style-type: none"> 9) Ajouter 500 µL du tampon de lavage 1 préparé avec l'éthanol à la colonne. 10) Centrifuger à 10 000*g pendant 1 minute. 11) Insérer la colonne dans un nouveau tube collecteur. 12) Ajouter 500 µL du tampon de lavage 2 préparé avec l'éthanol à la colonne. 13) Centrifuger à la vitesse maximale pendant 3 minutes.
Elution de l'ADN	<ol style="list-style-type: none"> 14) Placer la colonne dans un nouveau tube de microcentrifugation. 15) Ajouter 100 µL du tampon d'élution. 16) Incuber 1 minute et centrifuger la colonne à la vitesse maximale pendant 1 minute. 17) Dans un nouveau tube de microcentrifugation, répétez les étapes 14,15 et 16, centrifuger pendant 1,5 minutes au lieu d'une minute.

Purification Procedure Using Mini Kit

Experimental Overview

Introduction

The flow chart for purifying genomic DNA using the PureLink™ Genomic DNA Mini Kits is shown below.

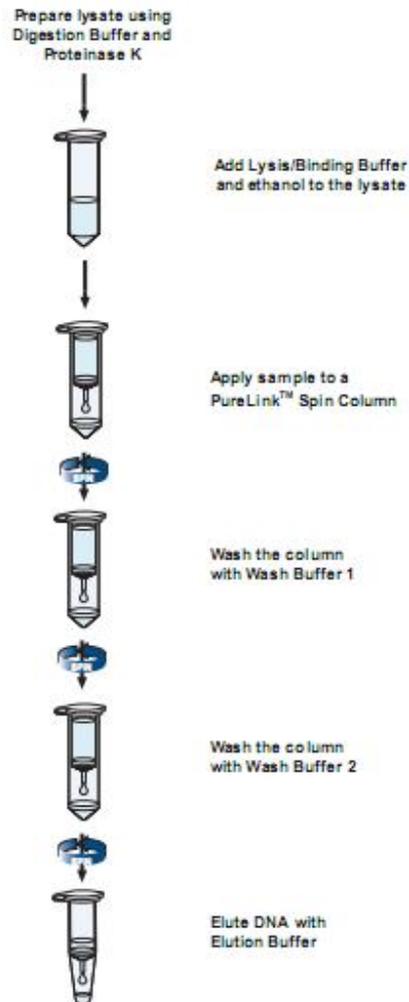


Figure 13 : Procédure d'extraction d'ADN. Source : Manuel du PureLink™ Genomic DNA Kits.

3) Analyse de séquences :

Nous avons jugé indispensable de présenter les séquence d'ADN des exon 19 et 20 de BRCA2 (Source : NCBI), qui représentent les gènes étudiés dans la présente thèse et dont le séquençage constitue le résultat. Les amorces utilisées dans les réactions de PCR sont les suivantes :

AMORCE SENS :

5' AGTACTATATTGTGAAAATATTTTCACTTTTATAACA 3'OH

AMORCE ANTI-SENS :

5' AAAGTCAATTTACTACTCAAATAAAAACAATTTAC 3'OH

H.sapiens brca2 gene exon 19

GenBank: X95169.1

[FASTA Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS X95169 1155 bp DNA linear PRI 14-NOV-2006
DEFINITION H.sapiens brca2 gene exon 19.
ACCESSION X95169
VERSION X95169.1 GI:1171545
KEYWORDS brca2 gene.
SOURCE Homo sapiens (human)
ORGANISM [Homo sapiens](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;
Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE 1
AUTHORS Wooster,R., Bignell,G., Lancaster,J., Swift,S., Seal,S.,
Mangion,J., Collins,N., Gregory,S., Gumbs,C., Micklem,G.,
Barfoot,R., Hamoudi,R., Patel,S., Rice,C., Biggs,P., Hashim,Y.,
Smith,A., Connor,F., Arason,A., Gudmundsson,J., Ficenc,D.,

Kelsell,D., Ford,D., Tonin,P., Bishop,D.T., Spurr,N.K.,
Ponder,B.A.J., Eeles,R., Peto,J., Devilee,P., Cornelisse,C.,
Lynch,H., Narod,S., Lenoir,G., Egilsson,V., Barkadottir,R.B.,
Easton,D.F., Bentley,D.R., Futreal,P.A., Ashworth,A. and
Stratton,M.R.

TITLE Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2
JOURNAL Nature 378 (6559), 789-792 (1995)
PUBMED [8524414](#)
REMARK Erratum:[Nature 1996 Feb 22;379(6567):749]
REFERENCE 2 (bases 1 to 1155)
AUTHORS Wooster,R.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (15-JAN-1996) R. Wooster, Institute of Cancer
Research,

Haddow Labs, 15 Cotswold Rd, Sutton, Surrey, SM2 5NG, UK

FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1155
/organism="Homo sapiens"
/mol_type="genomic DNA"
/db_xref="taxon:[9606](#)"
/chromosome="13"
/map="13q"
[gene](#) 500..655
/gene="brca2"
[exon](#) 500..655
/gene="brca2"
/note="label:ex19"
/number=19

ORIGIN

```
1 cttaacacca tgccaggtag cttagtaagt gttcgaatgaa tatttgcttt ttgtattagc
61 cataatcatt ctcaggctgc tttgtcattt acttgttcca caaattctta gcttccaaaa
121 ttttggatgat acctcatttc ctattctctc tagttgcctt tgtccatgta gattttttga
181 ggaagcttgg gtaaataagt gtattttaaa ctattatggt taaatcgaag ttccttttat
241 ctgttttcta atagaaacat ttaaataagca ttaagaactt gtagcagtat aaacaatatg
301 tttgagaagt actatattgt gaaaatattt tcacttttat acagtttttt acttatttac
361 tgtcttacta atcttcctaa gactttttta agtgaatatt ttaaggcag ttctagaaga
421 atgaaaactc ttatgatatc tgtaatagaa ttgaatacat atttaactac taaatcaata
481 tattttattaa tttgtccaga tttctgctaa cagtactcgg cctgctcgct ggtataccaa
541 acttggatc tttcctgacc ctagaccttt tcctctgccc ttatcatcgc ttttcagtga
```

601 tggaggaaat gttggttgtg ttgatgtaat tattcaaaga gcatacccta tacaggtatg
661 atgtattctt gaaacttacc atatatttct ttcttttgat acaattaatt tgtttgttg
721 tttgagatgg agtttcggtc tcttgcccag gctggagtgc aatggcgtga tcttggttca
781 ctgcagcctc ccacctcccg ggttcaagtg attctcctgc ctcagcctct caagtagctg
841 agccaccaca cctggctaata tttgtatttt tggtagagaa ggggtttcat catgttggtc
901 aggctgatct cgaactcctg acctcaggtg atccactaat ctcagcctcc caaagttctg
961 ggattacaga tgtgagccac tgtgcctggc ctgatacaat taacttgaat gttatatatg
1021 tgactttttt ggtgtgtgta acacattatt acagtggatg gagaagacat catctggatt
1081 atacatattt cgcaatgaaa gagaggaaga aaaggaagca gcaaaatgat tggaggccca
1141 acaaaagaga ctaga

H.sapiens brca2 gene exon 20

GenBank: X95170.1

[FASTA Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS X95170 1145 bp DNA linear PRI 14-NOV-2006

DEFINITION H.sapiens brca2 gene exon 20.

ACCESSION X95170

VERSION X95170.1 GI:1171547

KEYWORDS brca2 gene.

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM [Homo sapiens](#)

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;

Euteleostomi;

Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;

Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1

AUTHORS Wooster,R., Bignell,G., Lancaster,J., Swift,S., Seal,S., Mangion,J., Collins,N., Gregory,S., Gumbs,C., Micklem,G., Barfoot,R., Hamoudi,R., Patel,S., Rice,C., Biggs,P., Hashim,Y., Smith,A., Connor,F., Arason,A., Gudmundsson,J., Ficenec,D., Kelsell,D., Ford,D., Tonin,P., Bishop,D.T., Spurr,N.K., Ponder,B.A.J., Eeles,R., Peto,J., Devilee,P., Cornelisse,C., Lynch,H., Narod,S., Lenoir,G., Egilsson,V., Barkadottir,R.B., Easton,D.F., Bentley,D.R., Futreal,P.A., Ashworth,A. and Stratton,M.R.

TITLE Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2

JOURNAL Nature 378 (6559), 789-792 (1995)

PUBMED [8524414](#)

REMARK Erratum:[Nature 1996 Feb 22;379(6567):749]

REFERENCE 2 (bases 1 to 1145)

AUTHORS Wooster,R.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (15-JAN-1996) R. Wooster, Institute of Cancer Research,

Haddow Labs, 15 Cotswold Rd, Sutton, Surrey, SM2 5NG, UK

FEATURES Location/Qualifiers

```

source      1..1145
            /organism="Homo sapiens"
            /mol_type="genomic DNA"
            /db_xref="taxon:9606"
            /chromosome="13"
            /map="13q"
gene        501..645
            /gene="brca2"
exon        501..645
            /gene="brca2"
            /note="label:ex20"
            /number=20

```

ORIGIN

```

1  ctgaccctag accttttctt ctgcccttat catcgctttt cagtgatgga ggaaatggtg
61  gttgtggtga tgtaattatt caaagagcat accctataca ggtatgatgt attcttgaaa
121 cttaccatat atttctttct tttgatacaa ttaatttggt tgtttgtttg agatggagtt
181 tcgggtctctt gcccaggctg gagtgcaatg gcgtgatcct ggttcactgc agcctcccac
241 ctcccggggt caagtgattc tcctgcctca gcctctcaag tagctgagcc accacacctg
301 gctaattttg tatttttggg agagaagggg tttcatcatg ttggtcaggc tgatctcgaa
361 ctctgacct caggtgatcc actaatctca gcctcccaaa gttctgggat tacagatgtg
421 agccactgtg cctggcctga tacaattaac ttgaatgtta tatatgtgac ttttttggtg
481 tgtgtaacac attattacag tggatggaga agacatcatc tggattatac atatttcgca
541 atgaaagaga ggaagaaaag gaagcagcaa aatatgtgga ggccaacaa aagagactag
601 aagccttatt cactaaaatt caggaggaat ttgaagaaca tgaaggtaaa attagttata
661 tggtagacat tgttatttct aatatgagaa caaagtctta gagactttga atttaacatt
721 tttaatgagt aaattgtttt tattttgagt agtaaattga ctttatTTTT tagtatctag
781 ggtattcttt tttggtgtta gacaaagaat agcaacaagg gacagaaata tcaggtctaa
841 gccatttgta atatttttcc tgaattctta cctatatgat gtggcttttg catttttgtc
901 atggtagtta ttagctttca tgtgttatta tgcctggaac taggacctat tgtggtgtca
961 attttaatat taaaaatcat ggtgttttga tgtttatatg acataaattt tattttttcg
1021 tatctccctt ttggtgtgct tgaagatttt atgtttttct gcatttcctc atgatttata
1081 tagatgtaac atgttctata ggacatgtaa tttacatgtc ctatagaact ataagttaca
1141 tgtcc

```

4) Mutations de BRCA1/BRCA2 :

Les mutations de BRCA1 et BRCA2 ont fait l'objet de plusieurs études chez des patients atteints de cancer du sein issus de différentes populations.

Au Maroc, la première étude [19] ayant reporté des mutations a été menée en 2011 à l'Institut National d'Oncologie de Rabat. L'étude a porté sur cinq femmes saines issues de familles ayant des antécédents de cancer du sein. Des mutations sur les exons 2 et 11 de BRCA1 et sur l'exon 11 de BRCA2 ont été détectées chez trois femmes asymptomatiques.

La deuxième étude [16] en 2012 au centre d'Oncologie Ibn Rochd de Casablanca, portant sur les exons 5, 11 et 17 de BRCA1 et les exons 11 et 14 de BRCA2 a détecté neuf mutations dans les exons cités chez une population de 40 patientes atteintes de cancer du sein.

La plus récente étude [5] menée à l'hôpital militaire de Rabat en 2013, a étudié uniquement les mutations de BRCA1 sur les exons 11, 16 et 18 chez 121 patientes. Il est à noter que ces études ont procédé au séquençage complet des gènes étudiés.

Les deux dernières études ont relevé certaines mutations en commun avec les populations algériennes et tunisiennes.

Ceci dit, nous avons jugé nécessaire de présenter les résultats d'analyses de mutations de BRCA1/2 d'autres populations voisines du Maroc en raison de la proximité géographique et l'histoire du flux de la migration (tableau 1), ainsi que de présenter une figure de mutations des deux gènes positionnées sur leurs exons (figure 14).

Dans le cas de notre étude, nous avons ciblé les exons 19 et 20 de BRCA2.

Tableau 4 : Mutations de BRCA1 et BRCA2 de la littérature chez différentes populations

Population	BRCA1	BRCA2
Marocains	Exon 2 [19] Exon 5 [16] Exon 11 [5] [19] [16] Exon 16 [5] Exon 17 [16] Exon 18 [5]	Exon 11 [19] [16] Exon 14 [16]
Espagnols	Exon 3-5 [9] Exon 7[6] Exon 8 [7] Exon 11[8] Exon 20[7]	Exon 3[7] Exon 10[7] Exon 11[7] Exon 18[7] Exon 23[7] Exon 25[7]
Portugais	Exon 11[45] Exon 13 [46]	Exon 3 [20]
Algériens	Exon 2[24] Exon 8[24]	Exon 9[10] Exon 11[10] Exon 21[10]
Tunisiens	Exon 5 [14] Exon 11 [14] Exon 20[14]	
Egyptiens	Exon 2[25] Exon 8[25] Exon 13[25] Exon 22[25]	Exon 9[25]
Italiens	Exon 7[31] Exon 8 [28] Exon 11[31] Exon 13[31] Exon 14[31] [38] [28] Exon 17[31] Exon 20 [38] [28]	Exon 10 [28] Exon 11[31] [28] Exon 16[31] Exon 18[31]
Grecques	Exon 11 [21] Exon 20 [22] [21]	Exon 11 [21]
Turcs	Exon 11[23] Exon 17 [23] Exon 20 [23]	Exon 10 [23] Exon 11[23] Exon 20 [23]
Juifs Ashkenazes	Exon 2 [47] Exon 20 [47]	Exon 11 [47]

Allemands	Exon 2[41] [18] Exon 5[41] Exon 7[41] Exon 9[41] Exon 10[41] [17] Exon 11[41] Exon 13[41] Exon 14[41] Exon 15[17] Exon 20[17] [18]	Exon 11[17] Exon 15[18] Exon 16[18] Exon 22[18] Exon 27[18]
Iraniens	Exon 2[42] Exon 11[42]	Exon 11[42] Exon 17[42] Exon 18[42] Exon 23[42]

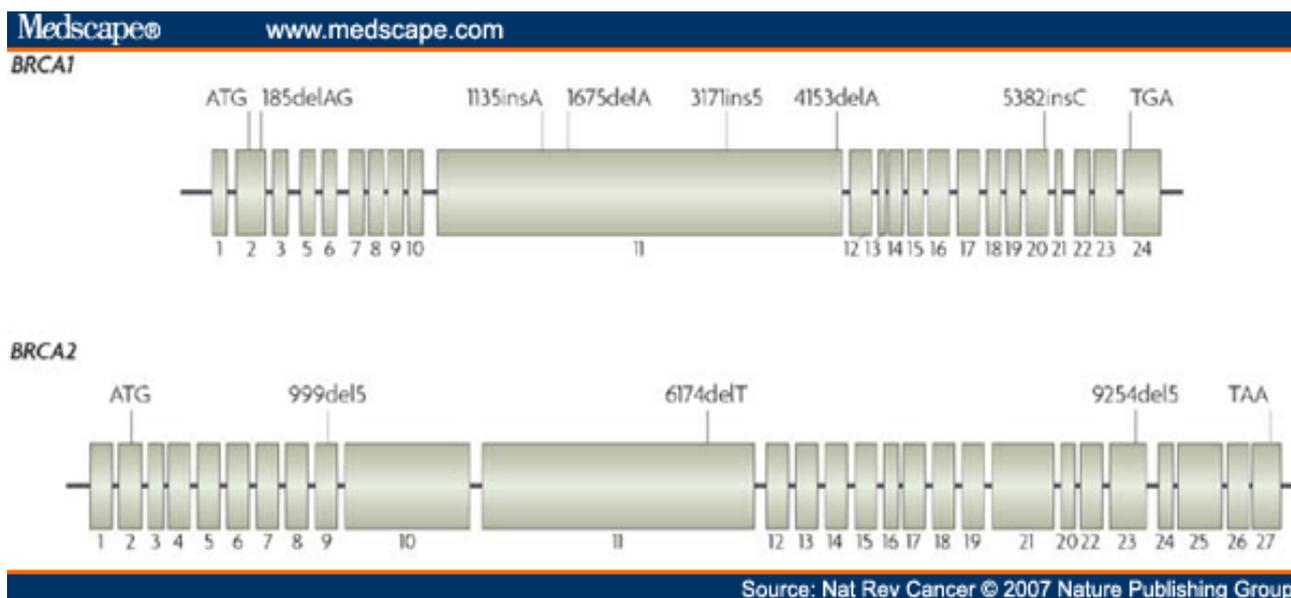


Figure 14 : Position des mutations de BRCA1 et BRCA2 sur les exons. Source : Nat Rev Cancer© 2007 Nature Publishing Group

Après avoir extrait l'ADN et analysé les séquences de nos gènes pour concevoir les amorces et cibler les exons à amplifier, on a procédé à la PCR et ensuite au séquençage.

5) Polymerase Chain Reaction (PCR) :

La PCR permet d'amplifier une quantité d'ADN de manière très importante et moins lourde que le clonage. Elle nécessite la présence d'une paire de séquences de nucléotides appelées amorces, chaque amorce reconnaît une séquence d'ADN sur chaque brin, limitant ainsi le segment d'ADN à amplifier. Une amorce se positionne à l'extrémité du brin sens (5'-3'), l'autre se positionne à l'extrémité du brin anti-sens (3'-5').

Elle se déroule en trois étapes, représentant un cycle :

- La dénaturation et la séparation des deux brins par la chaleur, la température est calculée en fonction de la teneur en paires G-C.
- L'hybridation de chaque brin par une amorce spécifique tout en baissant la température.
- La synthèse des nouveaux brins par une ADN polymérase, en augmentant la température.

La technique est rendue plus rapide en utilisant une ADN polymérase résistante à la chaleur, appelée Taq polymérase, extraite d'une bactérie thermo-résistante « *thermus aquaticus* ». Ainsi, on introduit tous les éléments nécessaires au début du cycle sans aucun risque de dénaturation, à savoir la Taq polymérase, les désoxyribonucléotides, le fragment à amplifier et les amorces l'encadrant.

A la fin de chaque cycle d'une durée de 2 à 3 minutes, la quantité d'ADN est multipliée par deux, donc de manière exponentielle à la fin de l'ensemble des cycles. Au bout de n cycles, on obtient théoriquement 2^n exemplaires du fragment d'ADN dont les extrémités sont définies par les amorces.

Limites de la PCR :

La sensibilité de la PCR la rend parfois délicate à réaliser et à interpréter du fait des risques de contamination, de la possible dégradation des acides nucléiques (en particulier de l'ARN) ainsi que la présence d'inhibiteurs de la PCR dans certains prélèvements.

PCR en temps réel : RT-PCR :

La PCR en temps réel repose sur la détection et la quantification d'un fluorochrome pendant l'amplification de la séquence cible. La fluorescence est donc proportionnelle à la quantité de produits d'amplification.

Il existe 2 systèmes de détection : détection par des agents intercalant et détection par des sondes. Un agent intercalant est une molécule capable de s'insérer entre les bases appariées d'un acide nucléique. A l'image du bromure d'éthidium en PCR conventionnelle, l'intercalant le plus utilisé en PCR en temps réel est le SYBR Green. Son émission de fluorescence augmente lorsque qu'il est lié à l'ADN double brin.

La spécificité de ce système repose exclusivement sur ses amorces. A la fin de PCR, une courbe de fusion est réalisée afin de vérifier le nombre de produits amplifiés. La courbe de fusion est réalisée en soumettant les produits d'amplification à une température progressant par palier tout en mesurant

l'intensité de fluorescence. La courbe correspond à la variation de la fluorescence en fonction de la température.

La détection basée sur des sondes s'appuie sur 4 technologies sondes : hydrolyse de sondes (Taqman), hybridation de 2 sondes avec émission de fluorescence par transfert d'énergie (FRET : fluorescence resonance energy transfer), balises moléculaires (Molecular Beacons) et amorces scorpion.

La technologie Taqman est basée sur l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase qui permet d'hydrolyser la sonde lorsqu'elle est hybridée à sa séquence cible sur l'amplicon durant l'étape d'hybridation/extension de la PCR. Les sondes Taqman sont des oligonucléotides marqués en extrémité 5' par un fluorochrome émetteur (reporter) et en extrémité 3' par fluorochrome suppresseur (quencher) qui inhibe l'émission du fluorochrome émetteur lorsqu'ils sont à proximité l'un de l'autre. Lorsque la sonde est hybridée sur sa cible elle est hydrolysée par l'ADN polymérase lors de l'élongation, le fluorochrome émetteur est alors séparé du fluorochrome suppresseur et émet une fluorescence proportionnelle à la quantité d'ADN double brin néosynthétisé.

En suivant la fluorescence au cours du temps de la PCR en temps réel émise par le SYBR Green ou par la sonde Taqman, on observe 3 phases :

- La phase de bruit de fond où la fluorescence proportionnelle au fragment amplifié est insuffisante ;
- La phase exponentielle où le nombre d'amplicon double à chaque cycle;
- La phase de plateau où les différents composants de la PCR deviennent limitant.

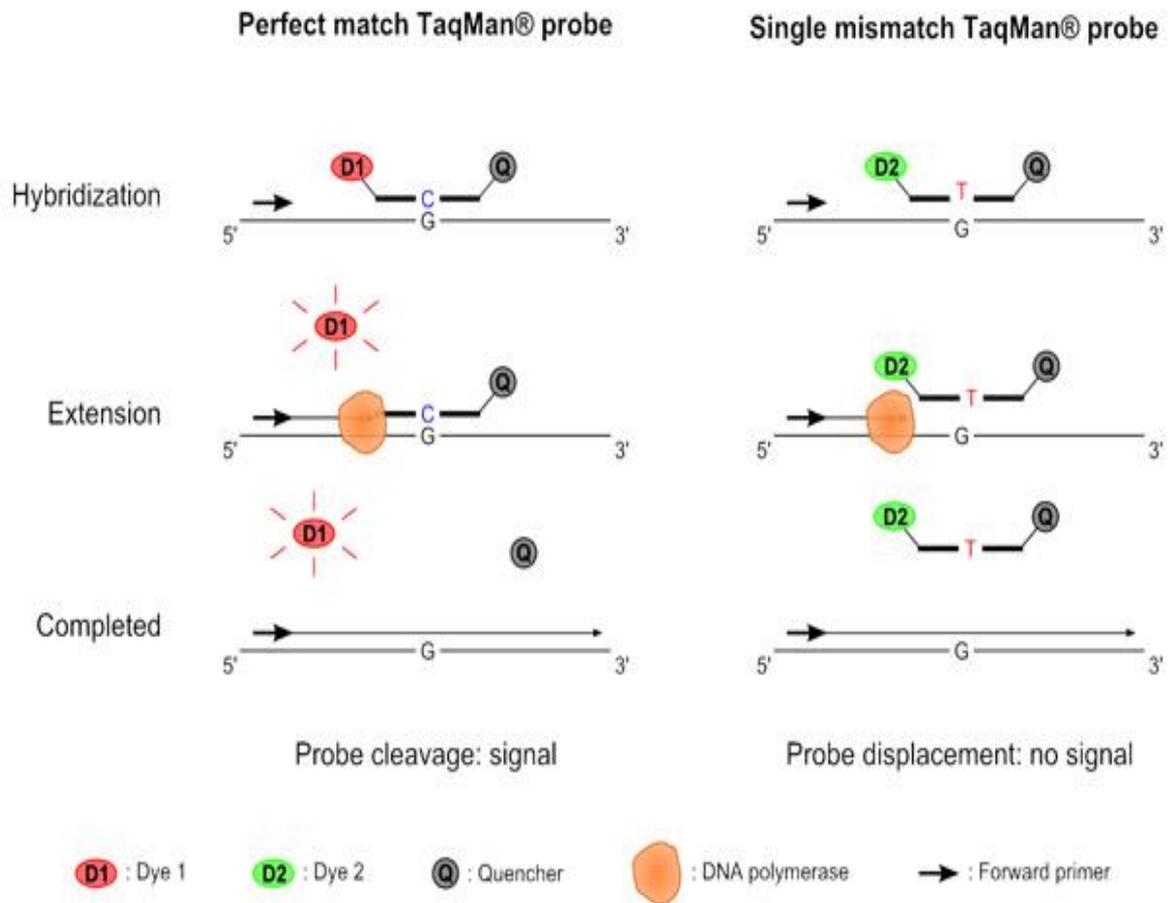


Figure 15: Schéma de la PCR en temps réel [58]

Les réactions de PCR ont été effectuées au sein du Centre National de Recherche Scientifique et Technique de Rabat en suivant le protocole suivant :

5-1 Le protocole expérimental :

Les réactions PCR sont réalisées dans un volume final de 30 μ l en présence de 3,4 μ l d'ADN génomique de façon qu'on ait 100 ng/ μ l d'ADN par échantillon, les autres réactifs utilisés sont listés dans le tableau suivant :

Tableau 5 : Volumes utilisés pour le mix de la réaction de PCR par échantillon

Elément	Volume
10* PCR Buffer (invitrogen®)	3 μ l
dNTP (invitrogen®)	3 μ l
MgCl ₂ (invitrogen®)	1,5 μ l
Amorce sens	1,5 μ l
Amorce anti-sens	1,5 μ l
Taq Polymérase Platinum (invitrogen®)	0,25 μ l
Eau	q.s.p 30 μ l

L'amplification a été effectuée à l'aide de l'appareil « Veriti® 96 well Thermal cycler, Applied Biosystems » en appliquant le programme suivant: une étape de pré-dénaturation est réalisée pendant 4 min à 96°C, suivie d'une série de 35 cycles constitués d'une phase de dénaturation d'une durée de 10 sec à 96°C, d'une phase d'hybridation des amorces avec la séquence cible d'une durée de 40 sec à 53°C. La durée de la phase d'élongation est de 2 minutes à 72°C.



Figure 16 : Appareil Veriti® 96 well Thermal cycler, Applied Biosystems

5-2 Gel d'électrophorèse :

Les produits PCR sont séparés par électrophorèse en utilisant un gel contenant 1 % d'agarose. La migration des produits s'effectue en présence de tampon Tris Acetate EDTA à un voltage de 120 V pendant 30 minutes. Une échelle de poids moléculaire invitrogen® migrant en parallèle permet de déterminer la taille des acides nucléiques. La visualisation se fait grâce au bromure d'éthidium (BET) Sigma® intercalant des acides nucléiques qui fluoresce sous un rayonnement ultraviolet. Le BET est additionné au volume de 2 μ l.

6) Séquençage :

Le séquençage a pour objectif de déterminer la disposition des nucléotides au sein d'un fragment. Il consiste à synthétiser le brin complémentaire de notre fragment simple brin grâce à l'ADN polymérase et une amorce fluorescente pour initier la synthèse. La méthode Sanger présentée ci-dessous est la plus utilisée.

Deux types de nucléotides triphosphates sont insérés dans le milieu : les désoxynucléotides : dGTP, dATP, dCTP, dTTP et les didésoxynucléotides (Hydroxyle 3' manquant) : ddGTP, ddATP, ddCTP, ddTTP. On dispose de quatre tubes, chacun contenant une base donnée. Lorsque l'ADN polymérase va intégrer ce dernier type, la synthèse va s'arrêter. On obtient alors un mélange de séquences de tailles différentes en fonction du point d'arrêt et terminées par l'une des quatre bases ddXTP utilisées.

Il suffit ensuite de faire migrer ces séquences dans un gel de polyacrylamide dont les puits correspondent aux quatre tubes contenant les quatre bases. On lit l'audiogramme du bas vers le haut dans le sens 5' → 3' pour le brin nouvellement synthétisé et on déduit par complémentarité la séquence de notre fragment (Figure 17).

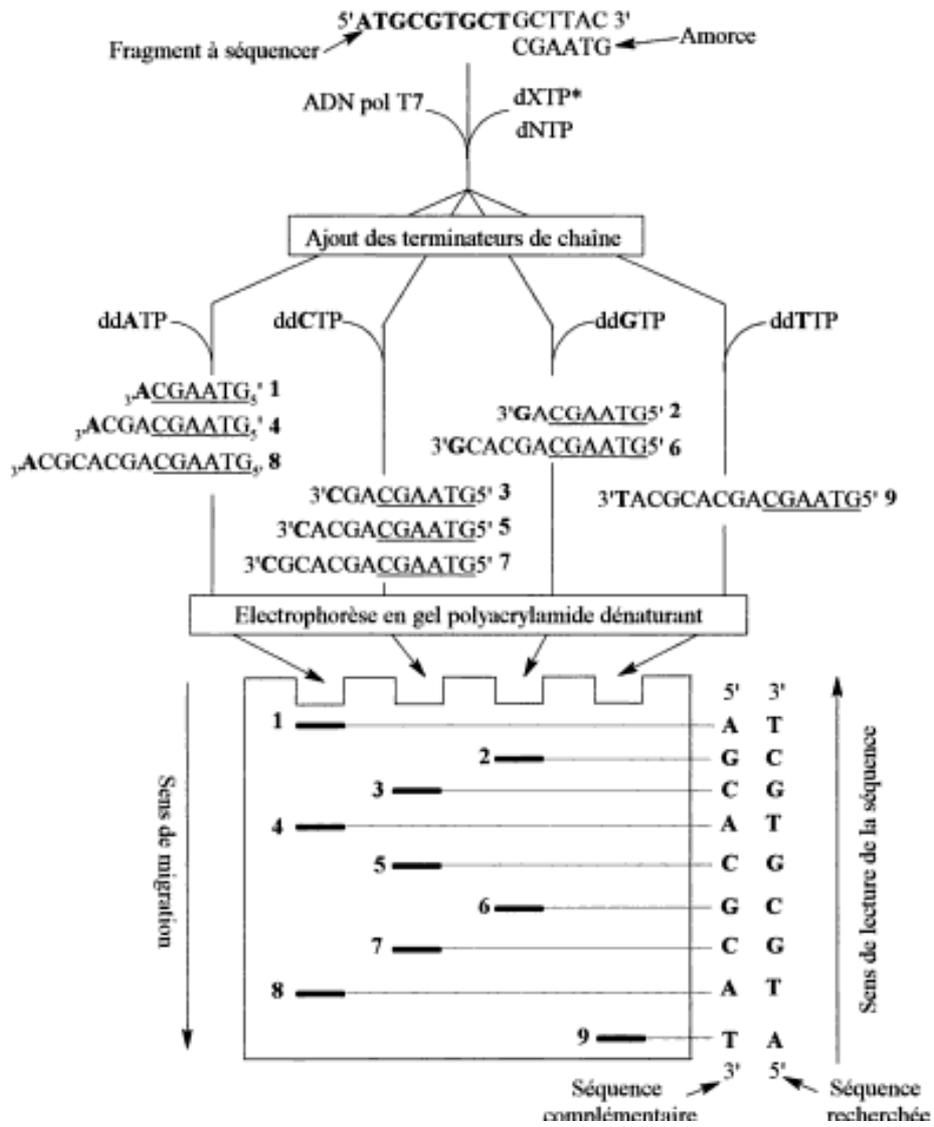


Figure 17: Schéma de la méthode Sanger de séquençage [53]

Le séquençage a été effectué au sein du Centre National de Recherche Scientifique et Technique de Rabat en suivant le protocole suivant :

6-1 Le protocole expérimental :

Instrument utilisé : *ABI 3130xl* Genetic Analyzer (séquenceur 16 capillaires) société Applied Biosystems.

Chimie utilisé : Technologie des ddNTPs (méthode de sanger) société Applied Biosystems.

Etapes de réalisation :

- 1) Purification des produits PCR (EXOSAP) (voir détail) ;
- 2) Réaction de séquence avec le kit BigDye v3.1 (voir détail) ;
- 3) Purification de la Réaction de séquence (voir détail) ;
- 4) Passage dans le ABI 3130 xl en utilisant le logiciel data collection v3.0 (Applied biosystems) ;
- 5) Les résultats sont analysés avec le logiciel : sequencing analysis v 5.3.1 (Applied biosystems).

6-1-1 Purification des Produits PCR

Principe

La purification des produits PCR a pour but d'enlever les amorces et les nucléotides (dNTPS) non utilisés durant la réaction de PCR.

Réactifs et équipements

- Kit de purification des produits de PCR, **ExoSAP-IT (Affymetrix)** ;
- Plaque de réaction (MicroAmp optical 96) ;

- Thermocycleur ;
- Glace ;
- Micropipettes P2, P10.

Protocole

1. Sortir le kit du congélateur -20°C, et le placer dans la glace pendant toute la durée de la Procédure ;
2. Mélanger dans la plaque de réaction, 5 µl du produit de la réaction de PCR et 2µl de l'ExoSAP-IT, pour un volume final de 7µl ;
3. Incuber la plaque de réaction à 37°C pendant 15 min dans le thermocycleur pour dégarder les amorces et les nucléotides libres ;
4. Incuber la plaque de réaction à 80°C pendant 15min, pour inactiver l'ExoSAP-IT ;
5. Le Produit de PCR est prêt à l'analyse pour le séquençage, ou analyse de SNP ou autres applications.

6-1-2 Réaction de séquence

Réactifs et matériels

- Kit « **BigDye Terminator v3.1 ou v1.1 cycle sequencing** » (Applied Biosystems) stocké à -20°C ;
- Tampon « **Big Dye terminator 5X sequencing buffer** » (Applied Biosystems) ; stocké à +4°C (Réfrigérateur du laboratoire de séquençage) ;
- Une Plaque 96 puits (MicroAmp _Applied Biosystems) ;

- H2O type MiliQ ;
- Vortex ;
- Thermocycleur ;
- Tube eppendorf.

Protocole de préparation de la réaction de séquence d'un volume final de 10 μ l

- Préparer dans un tube eppendorf un mélange réactionnel, par ajout des réactifs un par un tout en respectant la quantité et l'ordre indiqués dans le tableau ci-dessous ;

Tableau 6 : Tableau de mélange réactionnel pour la réaction de séquence.

Mélange réactionnel pour une réaction de séquence	Quantité en μ l
1. BigDye	4 μ l
2. 5X sequencing buffer	2 μ l
3. Primer (0.8 μ mol/ μ l)	4 μ l
4. ADN matrice	0.75-1.5 μ l
5. H2O (MiliQ)	8.5 - 9.25 μ l
Volume final	20 μ l

- Transférer le mélange réactionnel préparé dans une plaque de réaction 96 puits ;
- Charger la plaque dans le thermocycleur pour réaliser la réaction de séquence.

Programme utilisé du thermocycleur

▪ Programmer le thermocycleur à une dénaturation initiale à 96°C pendant 1 minute, ensuite à un cycle dénaturation-hybridation-élongation 25 fois, sous forme d'une dénaturation à 96°C pendant 10 secondes, d'une hybridation à 50°C pendant 5 secondes et d'une élongation à 60°C pendant 4 minutes.

6-1-3 Purification de la réaction de séquence

Principe

La purification de la réaction de séquence a pour but d'éliminer les sels, les ddNTPs, et les dNTPs non incorporés afin d'éviter leur injection dans les capillaires du séquenceur automatique.

Réactifs et matériels

- Sephadex G50 superfine (SIGMA ALDRICH)
- 50 gr de G50 pour 1L d'eau milliQ, solution stockée à +4°C
- Plaque Multiscreen MSHAN45 (Millipore)
- Plaque 96 (MicroAmp, Applied Biosystems)

Protocole

1. Adapter une microplaque à fond filtrant de 0.45 μm (plaque Multiscreen MSHAN45) sur une plaque de récupération à l'aide d'un joint (Adaptateur) ;
2. Distribuer 300 μL de G50 dans chaque puits ;
3. Centrifuger à 1500 g soit 2690 rpm pendant 3 min ;
4. Répéter les étapes 2 et 3 ;

5. Ajouter 20 μ L d'eau miliQ (stérile) sur les produits de la réaction de séquence ;
6. Déposer 30 μ L des produits de la réaction de séquence au milieu des puits ;
7. Placer une plaque ABI comme plaque de récupération sous la plaque Multiscreen ;
8. Centrifuger à 1100g soit 2605 rpm pendant 5min ;
9. Installer les échantillons dans le Séquenceur 3130XL.



Figure 18 : Photo du séquenceur ABI 3130xl Genetic Analyzer Applied Biosystems.



Résultats

1) Application informatique MCDB Explorer 1.0:

1-1) Saisie des patients :

Une fenêtre de confirmation s'affiche avant d'enregistrer la fiche du patient.

The screenshot displays the 'Saisie des patients' (Patient Entry) interface. The main window is titled 'Saisie des patients' and contains several sections for data entry:

- Code:** BCFBS22
- Informations générales:**
 - Nom et prénom: KANZA RAHALI
 - Sexe: M F
 - Age: 55
 - Ville: [empty]
 - Situation familiale: Mariée
- Grossesse:**
 - Age de la première menstruation: 16
 - Grossesse: Oui Non
 - Age de la première grossesse: 27
 - Nombre de grossesses: 5
- Ménopause:**
 - Ménopause: Oui Non
 - Age de la ménopause: 55
- Diagnostique:**
 - Date du diagnostique: 2013
 - Age au diagnostique: 55
 - Histologie: CCI
 - Grade: II
 - Taille de la tumeur: 40
 - Stade TNM: [empty]
 - Nodule: A+
 - Récepteur Oestrogénique: négatifs
 - Récepteur Progestéronique: négatifs
 - Bilatéralité: Oui Non
 - Pronostic: mauvais
 - Herceptest: positif
- Cas familiaux:**
 - Cas familiaux du cancer du sein: Non
 - Cas familiaux d'autres cancer: Non
- Top Right:**
 - Date du prélèvement: 04/06/2013
 - Nom du médecin traitant: Dr. Benabid
 - Nom du chercheur: Pr. Alami Ouafia
 - Nom de l'étudiant chercheur: Rafahi Kanza

A confirmation dialog box titled 'Thèse' is overlaid on the 'Grade' field, displaying the message 'Patient enregistré' and an 'OK' button.

Figure 19 : Capture d'écran de l'interface validation de saisie

1-2) Chercher un patient :

Les résultats de la recherche s'affichent suivant les critères remplis dans le formulaire recherche, la table de résultats comprend tous les renseignements du patient. L'utilisateur a également la possibilité de modifier les informations des patients.

Recherche

Code

Date du prélèvement Entre 20/4/13 Et 30/12/13

Nom du médecin traitant Dr. Benabid

Informations générales

Sexe F ex: FM

Situation familiale

Age Entre 23 Et 80 ex: 20

Ville

Diagnostique

Date du diagnostic Entre Et ex: 20

Age au diagnostic Entre Et ex: 20

Histologie CCI

Grade III ex: II

Taille de la tumeur Entre Et En mm ex: 5

Stade TNM

Nodule

Récepteur Oestrogénique po

Récepteur Progestéronique po

Bilatéralité N

Pronostic

Herceptest pos

Grossesse

Age de la première menstruation Entre 12 Et 17 ex: 20

Grossesses 0

Age de la première Grossesse Entre Et ex: 20

Nombre de grossesses Entre Et ex: 2

Ménopause

Ménopause

Age de la ménopause Entre Et ex: 20

Cas familiaux de cancer du sein

Cas familiaux du cancer du sein o ex: O/N

Cas familiaux d'autres cancer

Cas familiaux d'autres cancer n ex: O/N

Lancer la recherche

Figure 20 : Capture d'écran de l'interface Recherche

Résultat de recherche

Résultat de recherche

Code patient	Date du prélèvement	Nom patient	Sexe	Age	Situation familiale	Ville	Age de la première menstruation	Grossesse	Age de la première grossesse	Nombre de grossesses	Ménopause	Age de la ménopause	Date du diagnostic	Age au diagnostic	Histologie
BCFBS22	04/06/2013	KANZA RAH...	F	20	Mariée	Errachidia	16	Oui	27	5	Oui	55	2013	55	CCI
BCFBS23	04/06/2013	KANZA RAH...	F	82	Veuve	Rabat	10	Oui	20	5	Oui	50	2009	72	CCI
BCFBS24	06/06/2013	KANZA RAH...	F	73	Divorcée	RABAT	13	Oui	39	2	Oui	45	1999	69	CCI
BCFBS41	19/06/2013	KANZA RAH...	F	54	Mariée	Salé	11	Oui	29	2	Oui	49	1995	46	CCI
BCFBS44	19/06/2013	KANZA RAH...	F	52	Mariée	Tanger	14	Oui	20	2	Oui	48	2009	48	CCI
BCFBS49	24/06/2013	KANZA RAH...	F	63	Mariée	Kénitra	10	Oui	40	2	Oui	47	1997	47	CCI
BCFBS52	25/06/2013	KANZA RAH...	F	60	Veuve	Oujda	10	Oui	0	9	Oui	48	2013	60	CCI
BCFBS7	23/05/2013	KANZA RAH...	F	48	Mariée	Marakech	13	Oui	28	5	Oui	43	2008	43	CCI
BCMBS29	13/06/2013	KANZA RAH...	M	58	Marié	Agadir	0		0	0		0	2012	57	CCI

Confirmer la modification

Figure 21 : Capture d'écran de l'interface Résultat de recherche

2) Nanodrop :

Après l'extraction de l'ADN, nous avons mesuré la concentration, l'absorbance à 280, à 260 ainsi que les rapports 260/280 et 260/230 de nos échantillons d'ADN à l'aide du nanodrop 8000 Thermo Scientific®.

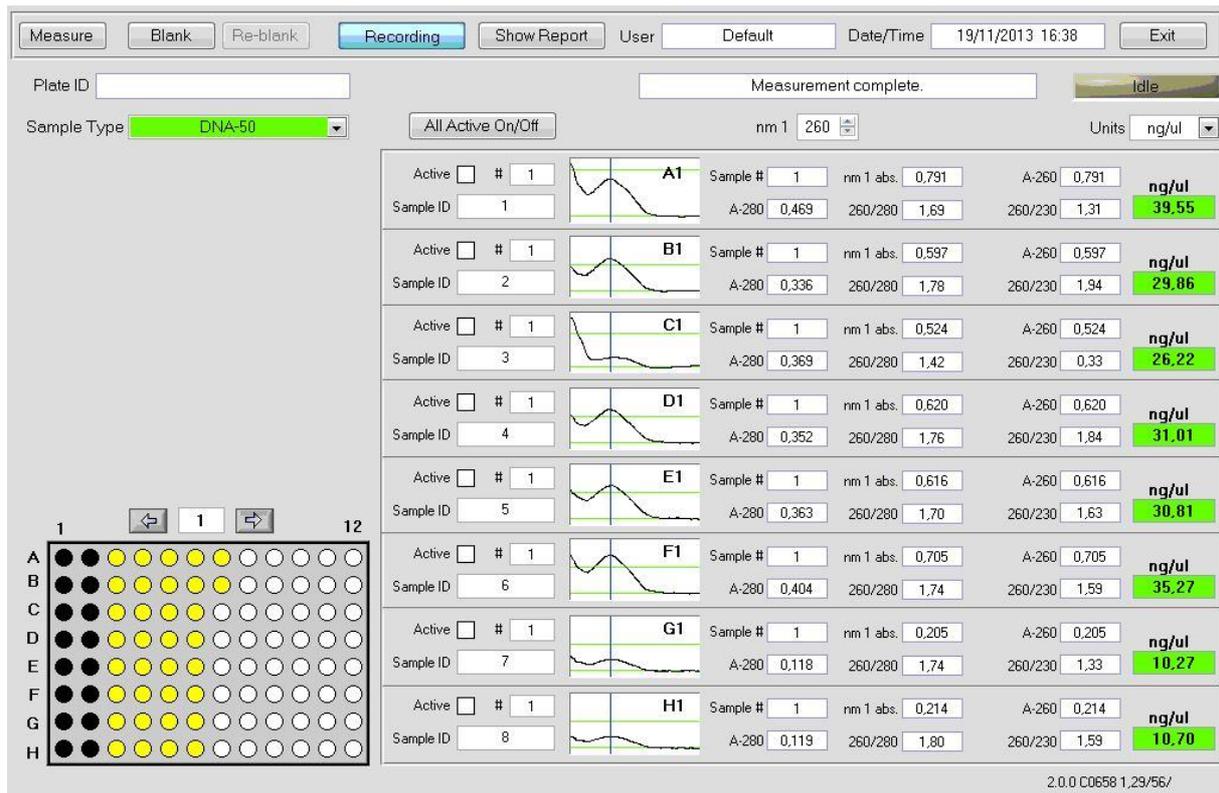


Figure 22 : Exemple de résultat de quantification au Nanodrop

3) Gel d'électrophorèse :

Les résultats de la séparation des produits de PCR sur gel d'électrophorèse sont représentés ci-dessous :

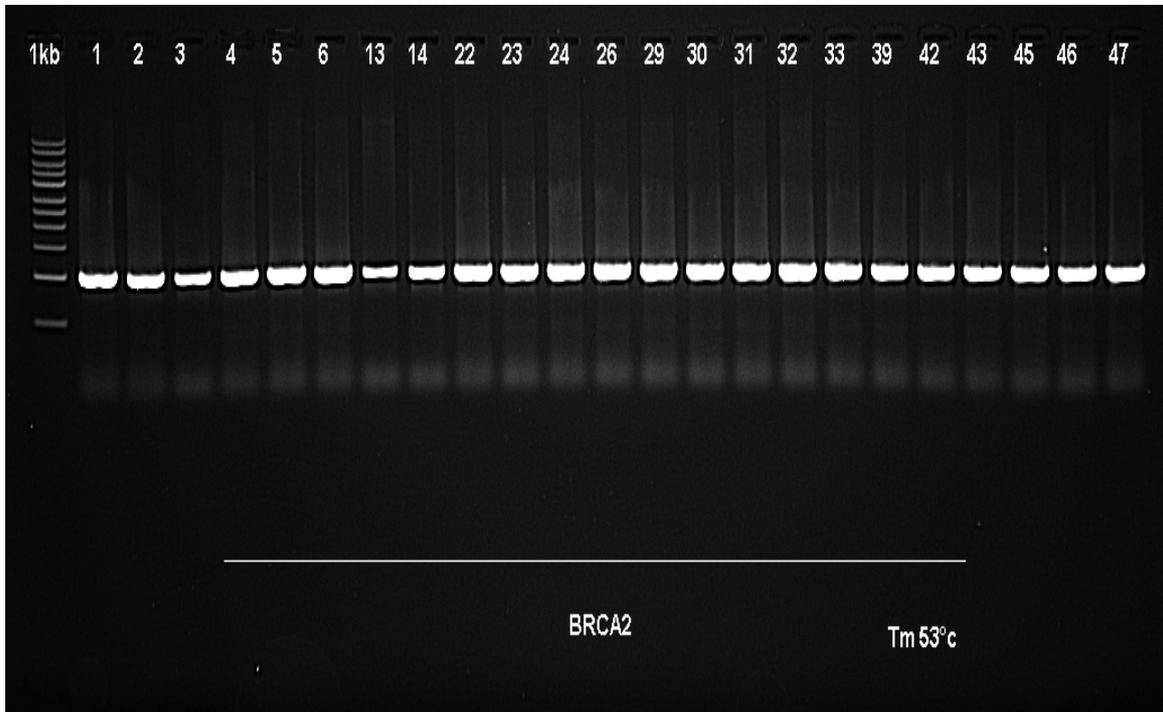


Figure 23 : Photo du gel d'électrophorèse (1)

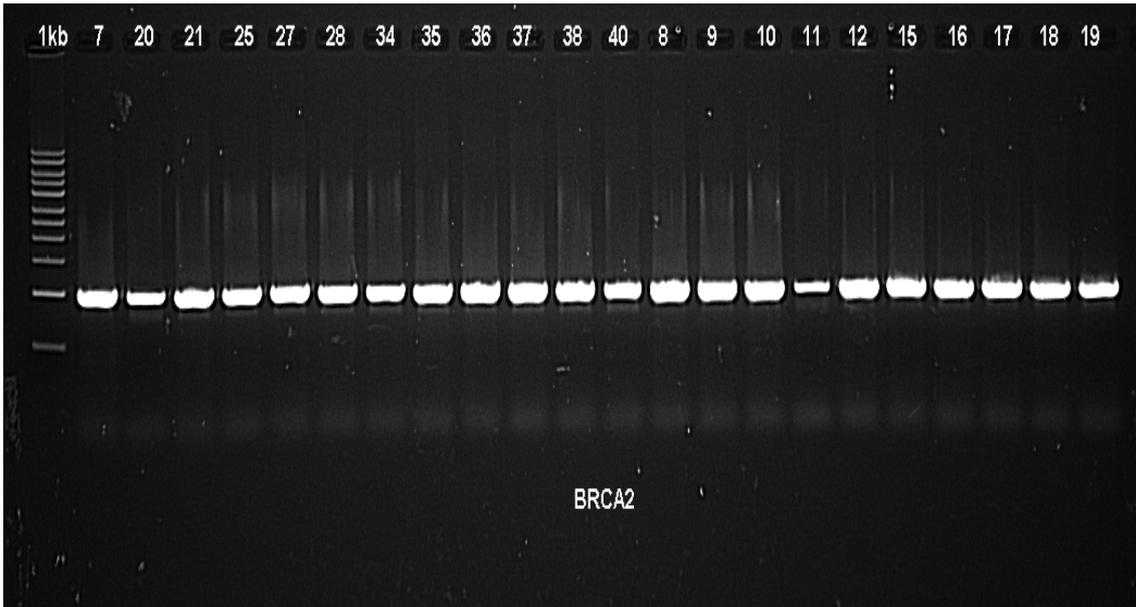


Figure 24 : Photo du gel d'électrophorèse (2)

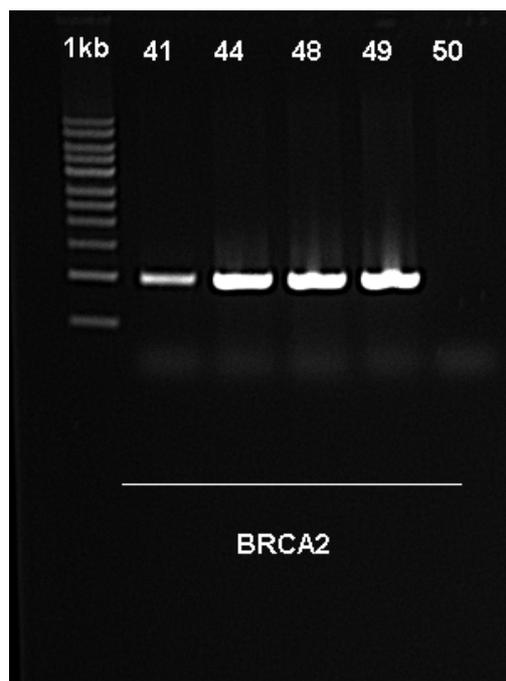


Figure 25 : Photo du gel d'électrophorèse (3)

4) Résultats de séquençage

4-1) Séquences obtenues :

Les séquences obtenues ont été visualisées à l'aide du logiciel Sequence Scanner (Applied Biosystems) :

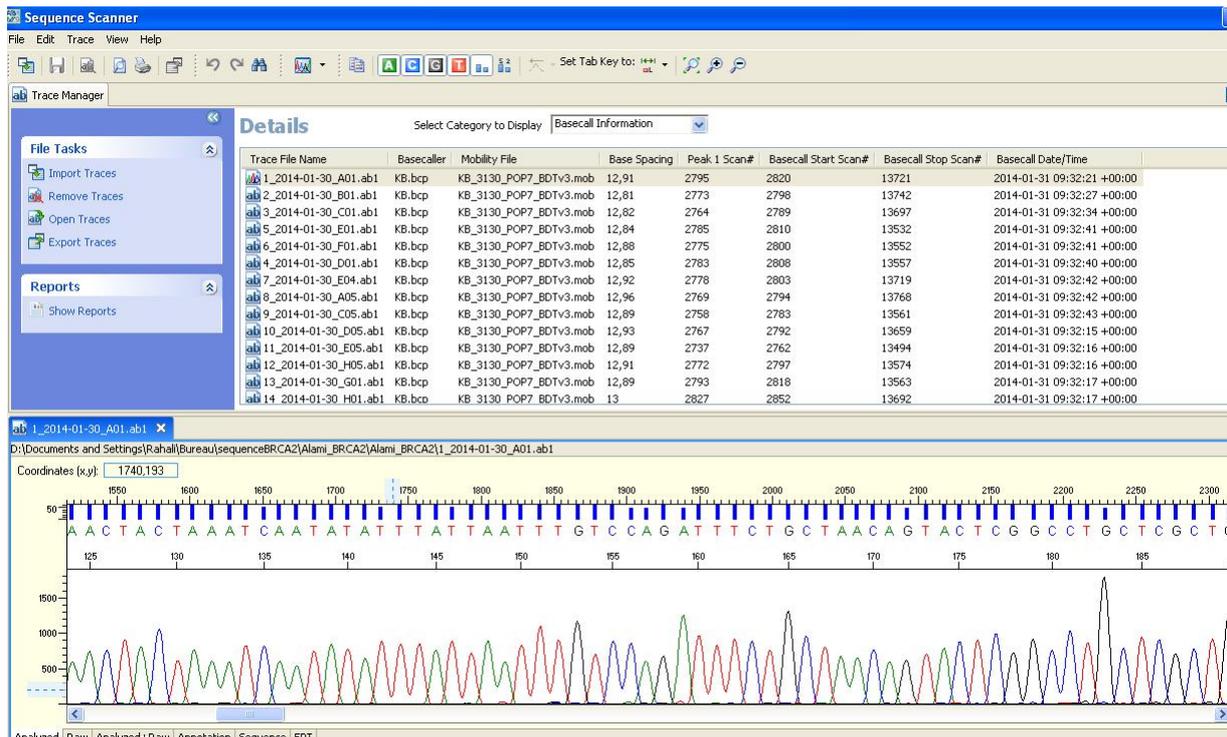


Figure 26 : Exemple de résultat de séquence d'un échantillon visualisé par le logiciel Sequence Scanner v. 1.0

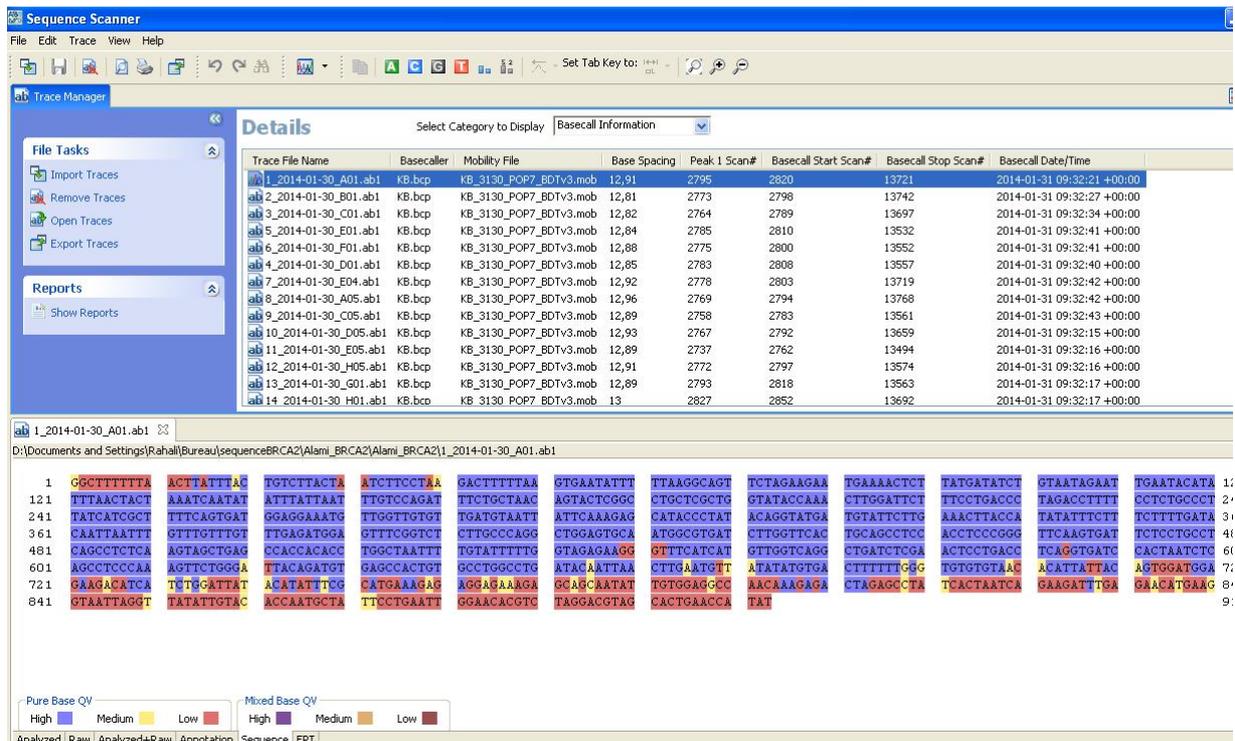


Figure 27 : Exemple de résultat de séquence d'un échantillon visualisé par le logiciel Sequence Scanner v. 1.0

4-2) BLAST sur NCBI :

Dans le cadre de l'analyse des séquences obtenues, nous avons réalisé un blast sur NCBI [60] de chaque échantillon. L'échantillon 1 est donné ci-dessous comme exemple :

Homo sapiens chromosome 13, GRCh38 Primary Assembly

Sequence ID: [ref|NC_000013.11|](#) Length: 114364328 Number of Matches: 1

Related Information

[PubChem BioAssay](#)-bioactivity screening

Range 1: 32370247 to 32371147 [GenBankGraphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1459 bits(790)	0.0	872/906(96%)	28/906(3%)	Plus/Plus
Query 4	TTTTTTAACTTATTTACTGTCTTACTAATCTTCCTAAGACTTTTT-AAGTGAATATTTTT			62
Sbjct 32370247 32370305	TTTTTT-ACTTATTTACTGTCTTACTAATCTTCCTAAGACTTTTTAAAGTGAATATTTTT			
Query 63	AAGGCAGTTCTAGAAGAATGAAAACCTTTATGATATCTGTAATAGAATTGAATACATATT			122
Sbjct 32370306 32370365	AAGGCAGTTCTAGAAGAATGAAAACCTTTATGATATCTGTAATAGAATTGAATACATATT			
Query 123	TAACTACTAAATCAATATATTTATTAATTTGTCCAGATTTCTGCTAACAGTACTCGGCCT			182
Sbjct 32370366 32370425	TAACTACTAAATCAATATATTTATTAATTTGTCCAGATTTCTGCTAACAGTACTCGGCCT			
Query 183	GCTCGCTGGTATACCAAACCTGGATTCTTTCCCTGACCCTAGACCTTTTCCTCTGCCCTTA			242
Sbjct 32370426 32370485	GCTCGCTGGTATACCAAACCTGGATTCTTTCCCTGACCCTAGACCTTTTCCTCTGCCCTTA			

Query 243 TCATCGCTTTTCAGTGATGGAGGAAATGTTGGTTGTGTTGATGTAATTATTCAAAGAGCA 302
 |||

Sbjct 32370486 TCATCGCTTTTCAGTGATGGAGGAAATGTTGGTTGTGTTGATGTAATTATTCAAAGAGCA
 32370545

Query 303 TACCCTATACAGGTATGATGTATTCTTGAAACTTACCATATATTTCTTTCTTTTGATACA 362
 |||

Sbjct 32370546 TACCCTATACAGGTATGATGTATTCTTGAAACTTACCATATATTTCTTTCTTTTGATACA
 32370605

Query 363 ATTAAtttgtttgtttgtttgagatggagtctcggtctcttgcccaggctggagtgcaat 422
 |||

Sbjct 32370606 ATTAATTTGTTTGTGTTGTTGAGATGGAGTTTCGGTCTCTTGCCCAGGCTGGAGTGCAAT
 32370665

Query 423 ggcgtgatcttggttactgcagcctccacctcccgggttcaagtgattctcctgcctca 482
 |||

Sbjct 32370666 GGC GTGATCTTGGTTCACTGCAGCCTCCACC TCCCGGTTCAAGTGATTCTCCTGCCTCA
 32370725

Query 483 gcctctcaagtagctgagccacca cacctggctaattttgtat ttttggtagagaa-ggg 541
 |||

Sbjct 32370726 GCCTCTCAAGTAGCTGAGCCACCACACCTGGCTAATTTTGTATTTTGGTAGAGAAGGGG
 32370785

Query 542 tttcatcatgttggtcaggctgatctcgaactcctgacctcaggatccactaatctca 601
 |||

Sbjct 32370786 TTTCATCATGTTGGTCAGGCTGATCTCGAAC TCTGACCTCAGGTGATCCACTAATCTCA
 32370845

Query 602 gcctcccaaagtctctgggat tacagatgtgagccactgtgcctggccTGATACAATTAAC 661
 |||

Sbjct 32370846 GCCTCCCAAAGTTCTGGGATTACAGATGTGAGCCACTGTGCCTGGCTGATACAATTAAC
 32370905

Query 662 TTGAATGTTATATATGTGACTTTTTTGGGTGTGTGTAACACATTATTACAGTGGATGGAG 721
 |||

Sbjct 32370906 TTGAATGTTATATATGTGACTTTTTT-GGTGTGTGTAACACATTATTACAGTGGATGGAG
 32370964

4-3) Alignement sur CLC Sequence Viewer (Qiagen):

A l'aide du logiciel CLC Sequence Viewer (Qiagen), nous avons aligné toutes nos séquences.



Figure 28 : Capture d'écran de l'alignement des séquences par le logiciel CLC Sequence Viewer (Qiagen)

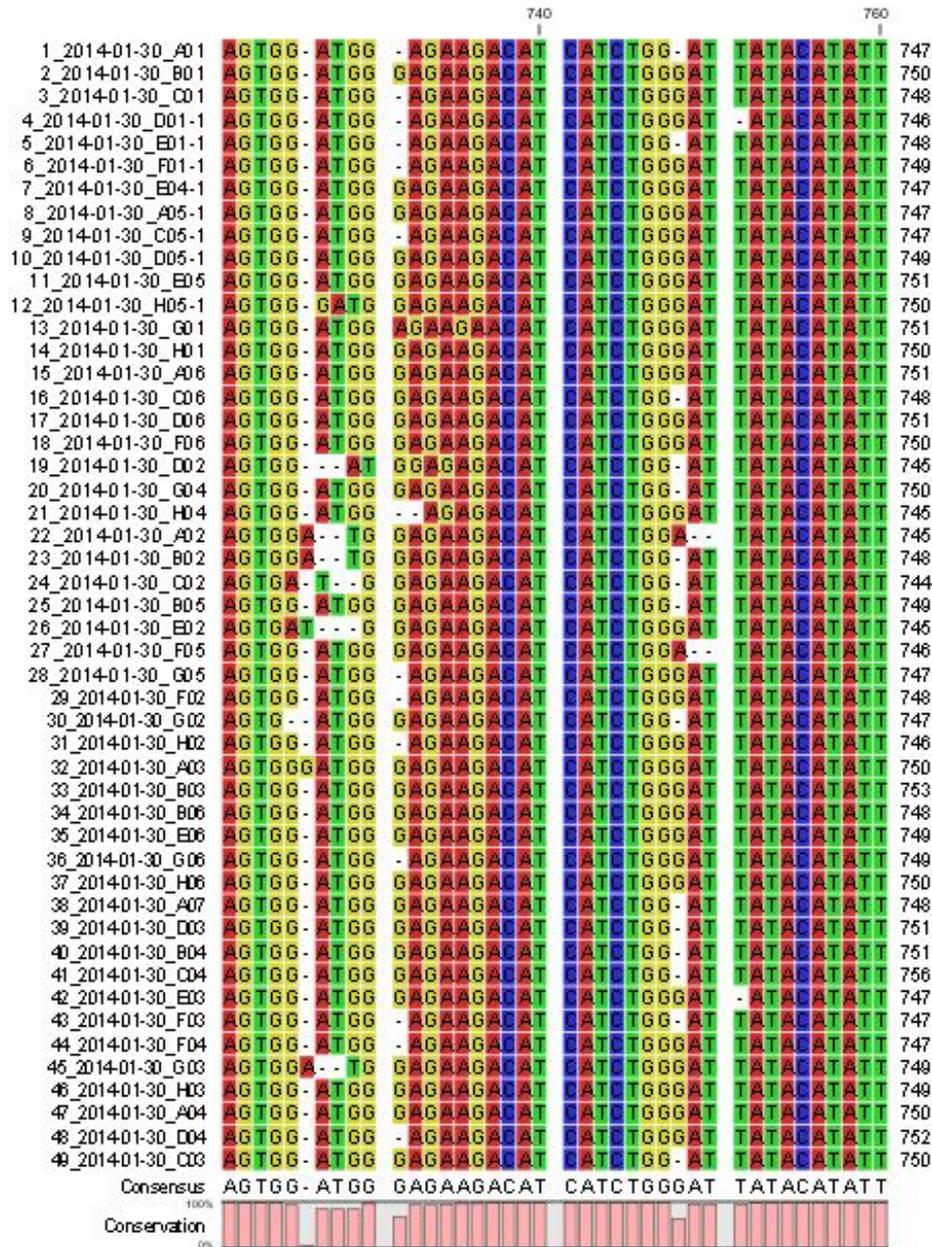


Figure 29 : Capture d'écran de l'alignement des séquences par le logiciel CLC Sequence Viewer (Qiagen)



Discussion

Notre étude a pour objectif de détecter les mutations du gène suppresseur de tumeur BRCA2, impliqué dans le cancer du sein, pour ce faire, nous avons procédé à l'amplification des exons ciblés par PCR et ensuite séquencé la zone étudiée.

Les 200 échantillons sanguins dont 44 contrôles négatifs, prélevés sur tube EDTA ont été collectés au centre d'Oncologie du 16 novembre et du centre d'Oncologie Nakhil, chez des patients atteints de cancer du sein masculin et féminin. Chaque échantillon est muni d'un questionnaire et d'un consentement éclairé signé par le patient, le médecin et le directeur du projet. La présente base de données de patients est gérée par le SGBD SQL Server et exploitée à l'aide d'une application informatique développée à l'aide du logiciel Visual Basic.

Après extraction de l'ADN des échantillons sanguins en utilisant le PureLink Genomic DNA Kits (Invitrogen®) et quantification de l'ADN extrait à l'aide du nanodrop 8000 Thermo Scientific®, nous avons effectué le choix de 50 échantillons dont 37 patients et 13 contrôles négatifs, en vue de détecter les mutations de BRCA2 dans une zone ciblée.

L'analyse de séquence du gène BRCA2 sur Genbank nous a permis de cibler les exons 19 et 20 du même gène, ainsi que de choisir les amorces correspondantes. Nous avons procédé à l'amplification par PCR des deux exons à l'aide des amorces suivantes :

AMORCE SENS :

5' AGTACTATATTGTGAAAATATTTTCACTTTTATACA 3'OH

AMORCE ANTI-SENS :

5' AAAGTCAATTTACTACTCAAATAAAAACAATTTAC 3'OH

Nous avons ensuite procédé au séquençage dans les deux sens du fragment amplifié dans le but de détecter d'éventuelles mutations.

Les mutations de BRCA2 renseignées sur ' The Universal Mutation Database' incluent généralement des codons stop prématurés, des faux sens ou des isosémantiques [54]. Particulièrement, un grand nombre d'études sur les marqueurs génétiques du cancer du sein chez la population asiatique ont révélé une fréquence de mutations de BRCA2 plus grande que celle de BRCA1 à l'exception de la population Indienne et Pakistanaise. (*Haeyoung Kim and Doo Ho Choi, Décembre 2013* [4]).

Une étude portant sur les mutations de BRCA2 a démontré que les porteurs de ses mutations développent typiquement le cancer du sein du type luminal B vu précédemment (*Raphael J et al. Janvier 2014*) [1]

A l'instar du cancer du sein, les mutations de BRCA2 peuvent être utilisées pour identifier les hommes ayant un risque élevé de cancer de prostate (*Bancroft EK et al. Janvier 2014*) [2]. De façon générale, les porteurs de mutations BRCA de sexe masculin sont prédisposés à un grand risque de cancer de sein, de prostate, de pancréas et d'estomac, comparé à la population générale (*Plevová P, Hladíková A. 2012*)[11].

Les séquences obtenues dans le cadre de notre étude sont alignées à l'aide du logiciel CLC Sequence Viewer (Qiagen), elles révèlent certaines variations introniques et exoniques, qui seront ensuite confirmées et feront sujet de prochaines publications scientifiques.

L'application informatique développée nous permet, à partir des questionnaires portant les renseignements cliniques des patients, d'exploiter de façon rapide et ciblée notre base de données. Les résultats du séquençage des exons 19 et 20 ainsi que les renseignements cliniques de chaque patient nous aidera à interpréter nos résultats.



*Conclusion
et perspectives*

Une étude portant sur les trois gènes suppresseurs de tumeur BRCA1, BRCA2 et P53 (*Daphne SC Lee et al. Avril 2012*) [12], a détecté quatre mutations de P53 chez des patients ayant des antécédents familiaux et testés négatifs pour les mutations de BRCA1 et BRCA2. (*Bakker JL et al. Janvier 2014*) [3] ont détecté récemment une nouvelle mutation sur l'intron 1 de BRCA1 chez une famille Japonnaise présentant un FAS. D'où l'intérêt d'effectuer un séquençage complet sur tout le gène ainsi que sur BRCA1 et P53.

L'objectif de notre étude était de détecter les mutations dans les exons 19 et 20 de BRCA2. Les résultats du séquençage après amplification du fragment en question par PCR seront confirmées et feront sujets de prochaines publications scientifiques.

L'objectif global du projet, à long terme, est de détecter les mutations des trois marqueurs génétiques du cancer du sein BRCA1, BRCA2 et P53 ainsi que de détecter l'amplification de l'oncogène Her2. Le séquençage de certains exons de BRCA1 et de P53 est en cours de réalisation au sein du CNRST Rabat. Prochainement, un séquençage complet sera effectué pour couvrir toutes les régions – introniques et exoniques - des trois gènes. Ensuite, la détection des mutations confirmées par séquençage sera effectuée par RT-PCR afin d'instaurer une technique rapide de détection de mutations.



Résumés

RESUME

Titre: Détection des altérations génétiques par PCR/Séquençage du gène suppresseur de tumeur BRCA2 dans des cas de cancer du sein masculin et féminin au Maroc

Autour: Rahali Kanza

Mots clés: Cancer du sein – Mutations – PCR/séquençage – BRCA2.

Dans le cadre de ma thèse, j'ai intégré un projet fédérateur, dont l'intérêt principal est la détection de mutations des gènes suppresseurs de tumeur P53, BRCA1, BRCA2, et la détection d'amplification de l'oncogène Her2/neu. Le but étant de comparer le génotypage par PCR, séquençage partiel et séquençage intégral avec le génotypage rapide par PCR en temps réel. Ce, afin d'initier le diagnostic moléculaire du cancer.

Nous avons préparé une banque de sang à partir de 200 patientes et patients, atteints de cancer du sein, dont 44 contrôles négatifs, préparé une banque d'ADN à l'aide du PureLink Genomic DNA Kits (Invitrogen®), et procédé, après analyse des séquences et conception d'amorces, à l'amplification par PCR à l'aide de l'appareil Veriti® Applied Biosystems et au séquençage des marqueurs génétiques à l'aide de l'appareil ABI 3130 genetic analyzer.

Nous avons également développé une application informatique nommée MCDB à l'aide du logiciel Visual Basic afin d'exploiter les informations de cette banque de données constituée de consentements éclairés et d'informations cliniques.

Les premières séquences obtenues concernant les exons 19-20 de BRCA2 constituent les résultats de ma thèse. L'analyse des régions exoniques et introniques séquencées, a été effectuée en utilisant les logiciels Sequence Scanner (Applied Biosystems) et CLC Sequence Viewer (Qiagen). Cette analyse a montré la présence de mutations au niveau intronique et exonique qui constituent des variantes d'épissage alternatif de la région 19-20 de BRCA2.

L'analyse comparative complète des différents marqueurs et de tous les échantillons donnera en perspective la confirmation de l'implication de ces mutations dans le déclenchement et/ou l'agressivité du cancer du sein des échantillons étudiés.

ABSTRACT

Title: Detection of genetic alterations using PCR and sequencing in tumor suppressor gene BRCA2 in some cases of male and female cancer patients in Morocco

Author: RAHALI Kanza

Keywords: Breast Cancer – Mutations - PCR/sequencing - BRCA2

We aim to detect mutations in the tumor suppressor gene BRCA2, as well as to create a Moroccan breast cancer database archived and scanned, a blood, DNA and genes bank and to develop an application in order to explore the database.

The main objective is to analyze via PCR/sequencing and RT-PCR mutations of the tumor suppressor genes BRCA1, BRCA2 and P53, and to detect via RT-PCR the amplification of the oncogene Erb2 (Her2/neu), the metastatic marker. We aim to compare the two techniques in order to implement the molecular analysis of the breast cancer genetic markers as a quick and efficient routine.

We collected 200 blood samples from breast cancer male and female patients, including 44 negative controls validated by questionnaires and written consents. We used the software Visual Basic to develop the application MCDB. DNA extraction was performed using PureLink Genomic DNA Kits (Invitrogen®). We analyzed the sequences on NCBI Genbank to conceive the primers for PCR, sequencing and RT-PCR. PCR was performed using the Veriti® Applied Biosystems thermocycler and the sequencing using ABI 3130 genetic analyzer.

The first results on exons 19-20 of BRCA2 are the results of my doctoral thesis. The sequence analysis is performed using the softwares Sequence Scanner (Applied Biosystems) and CLC Sequence Viewer (Qiagen). It revealed some variants of this region that will be confirmed and published in articles.

The complete comparative analysis of genetic markers and of all the samples will confirm the role of these mutations in the aggressive character of breast cancer.

ملخص

العنوان: التنقيب عن التغيرات الجينية بتقنية PCR / تسلسل للجين اللاغي للأورام BRCA 2 عند بعض الحالات من مرضى ومريضات سرطان الثدي في المغرب

من طرف: الرحالي كنزة

الكلمات الأساسية: سرطان الثدي - طفرات - PCR / تسلسل - BRCA 2.

يحتل سرطان الثدي المرتبة الأولى عند النساء في المغرب. تعتبر حالاته المتزايدة من أهم مشاكل الصحة العمومية. يعتبر الفحص الطبي أهم تقنية للكشف، في حين يساعد الفحص الجزيئي على الكشف المبكر له. في هذا الإطار نسعى إلى التنقيب عن التغيرات الجينية للجين ب.ر.س.أ. 2 إلى جانب تكوين قاعدة بيانات مغربية عن هذا المرض، بالإضافة إلى تكوين بنك للدم، للحمض النووي و الجينات المميزة له، و كذا إلى إنجاز تطبيق معلوماتي يساعد على استغلال هذه المعلومات المكونة لقاعدة البيانات.

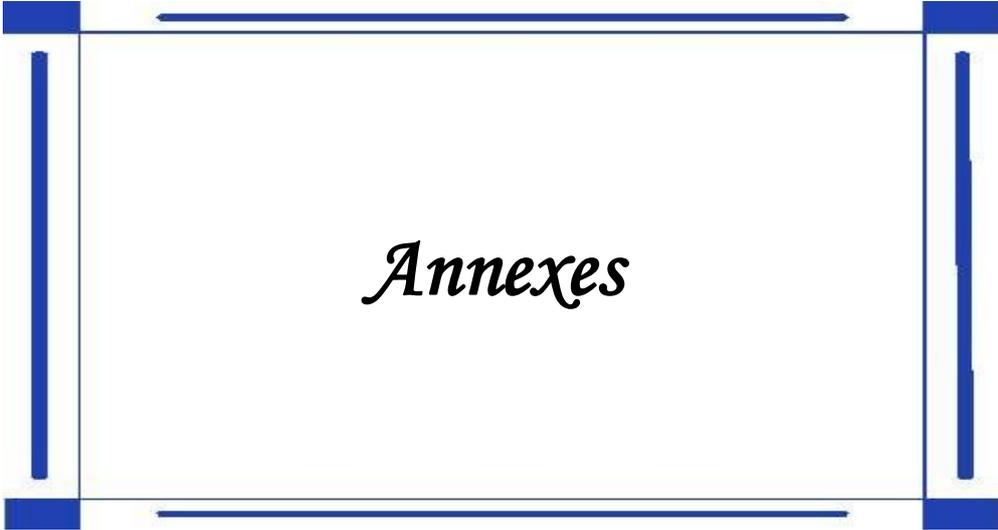
نهدف إلى استخدام تقنية ب.س.ر./تسلسل و ب.س.ر-رت من أجل الكشف عن التغيرات الجينية للجينات اللاغية للأورام ب.ر.س.أ. 1، ب.ر.س.أ. 2 و ب 53 ومن أجل الكشف عن تضخيم ه.ي.ر. 2 المسؤول عن انتشار الأورام باستعمال ب.س.ر-رت. الهدف هو مقارنة هاتين التقنيتين من أجل تفعيل الفحص الجزيئي لسرطان الثدي كوتيرة سريعة للكشف المبكر له.

قمنا بتحصيل 200 عينة دم لمرضى و مريضات سرطان الثدي بما فيهم 44 حالة معافاة، مصحوبة بوثيقة الموافقة الخطية و لائحة المعلومات عن المريض. استعملنا تطبيق فيزوال باسيك لتطوير التطبيق المعلوماتي. استخلص الحمض النووي تم ببيور لينك جينوميك د.ن.أ. و دراسة التسلسلات على جين بنك و طفراتهم مكنتنا من بلورة الأمورسات اللازمة لل ب.س.ر.

تمت الب.س.ر. بجهاز فيرايتي أبلويد بيوسيستم و تم التسلسل بجهاز أ.ب.ي 3130 جينيتيك أناليزر.

تمثل النتائج الأولى فيما يخص تسلسل الأكرونات 19 و 20 لب.ر.س.أ. 2 نتائج الأطروحة. درسنا التسلسل عن طريق تطبيقي سيكونس سكانر (أبلويد بيوسيستم) و س.ل.س سيكونس فيور (كياجين) وكشفت هذه الدراسة عن تغيرات على مستوى الإكرونات و الأنترونات في المنطقة المدروسة.

عما قريب، سوف تؤكد الدراسة الشاملة لكل العينات المحصلة دور هذه الطفرات في الطابع العدواني لسرطان الثدي.



Annexes

Annexe 1 : Consentement éclairé :



FACULTE DE MEDECINE
ET DE PHARMACIE DE RABAT



جامعة محمد الخامس السويسي
Université Mohammed V - Souissi



LABORATOIRES DE BIOCHIMIE,
CHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Consentement éclairé aux Biobanque & Gènebanque Au profit de La recherche sur les Marqueurs Génétiques du Cancer Destiné au prélèvement de sang &/ou de tissus

Référence échantillon :

Nom du Chercheur Responsable du Projet de Recherche :

Université / Faculté / Centre de Recherche / Laboratoires :

Numéro de téléphone &/ou email :

Nom du médecin référent : Service et Hôpital :

Numéro de téléphone &/ou email :

Vous avez été informé(e) de l'existence d'un projet de recherche étudiant les Marqueurs Génétiques du Cancer du sein et d'autres types de cancers. L'étude génétique en cours consiste à analyser les mutations génétiques impliquées dans l'oncogenèse. L'étude est effectuée au Maroc, dans les laboratoires de Biochimie & Biologie Moléculaire de la FMPR & le CRECET.

Si vous acceptez de participer à cette recherche, il vous sera demandé :

1) Une prise de sang et de tissus pour étudier l'ADN

La signature de ce consentement éclairé signifie que vous acceptez de participer à cette étude, et que vous nous donnez l'autorisation d'analyses comparatives de votre séquence génétique. L'ADN sera stocké dans un laboratoire à la FMPR et ne sera utilisé que dans le cadre de cette étude génétique sur les mutations impliqués dans la survenue du cancer. Ces prélèvements seront stockés de façon prolongée.

Risques et bénéfices

L'étude génétique nécessite une prise de sang. Plusieurs études génétiques vont être effectuées sur ce prélèvement d'ADN. Les risques potentiels de cette étude sont liés à cette prise de sang avec risque classique de douleur à la prise de sang, et la constitution éventuelle d'un hématome. Cette étude génétique est dans un but de recherche, il n'y a pas de bénéfices directs attendus. Il n'y a pas de répercussion attendue sur votre assurance individuelle. Cette étude permettra de mieux comprendre les mécanismes génétiques du cancer. Il n'y a pas de bénéfice direct pour vous, comme ce prélèvement n'a de but & ne sera utile qu'à la recherche scientifique.

Confidentialité

Toutes les données individuelles d'identification sont tenues confidentielles. Ces données individuelles et les échantillons d'ADN confiés seront utilisés uniquement au sein de la recherche du cancer, les échantillons sont anonymisés et les données nominatives ne sortent pas de la banque d'ADN.

Droit de refuser

Le choix de participer ou non à l'étude vous est propre. Si vous choisissez de ne pas y participer, la prise en charge médicale ne sera en rien modifiée.

Demande d'informations complémentaires

Vous pouvez contacter directement le chercheur en charge de la recherche pour toutes questions, en joignant le Pr. Alami-Ouahabi Naïma (naima.alami@gmail.com).

Confirmation de participation à cette étude

J'ai lu et compris les éléments de ce consentement éclairé. J'en ai une copie en garde. Je comprends que je ne participe à cette étude que si je le souhaite, et que ma prise en charge médicale ne sera pas affectée. Je ne recevrai pas de résultats personnalisés de cette recherche. Je comprends que la prise de sang et de tissus effectuée ne sera utilisée que pour l'étude des gènes potentiellement responsables du cancer.

Pour le Médecin référent : J'ai discuté avec le patient des procédures décrites ci-dessus et des risques inhérents. J'atteste que le document a été bien compris du patient, et qu'il donne un consentement libre et éclairé.

Signature du Médecin référent

Date

Ma signature ci-dessous indique que j'ai obtenu une réponse satisfaisante à toutes mes questions. Je souhaite participer à ce projet de recherche.

Une photocopie du consentement signé m'a été donnée.

Signature & / ou empreinte digitale du patient

Date

Signature du responsable du projet de recherche

Date



Bibliographie

- [1] **Raphael J et al.** *Should BRCA2 mutation carriers avoid neoadjuvant chemotherapy? Med Oncol.* 2014 Mar;31(3):850.
- [2] **Bancroft EK et al.** *Targeted Prostate Cancer Screening in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers: Results from the Initial Screening Round of the IMPACT Study. Eur Urol.* 2014 Jan 15. pii: S0302-2838(14)00004-9.
- [3] **Bakker JL et al.** *A Novel Splice Site Mutation in the Non-coding Region of BRCA2: Implications for Fanconi Anemia and Familial Breast Cancer Diagnostics. Hum Mutat.* 2014 Jan 6.
- [4] **Haeyoung Kim and Doo Ho Choi.** *Distribution of BRCA1 and BRCA2 mutations in Asian Patients with Breast cancer. J Breast Cancer.* 2013 December; 16(4): 357–365
- [5] **Abdelilah Laraqui et al.** *Mutation Screening of the BRCA1 Gene in Early Onset and Familial Breast/Ovarian Cancer in Moroccan Population. Int J Med Sci.* 2013; 10(1): 60–67
- [6] **Gutiérrez-Enríquez S et al.** *About 1% of the breast and ovarian Spanish families testing negative for BRCA1 and BRCA2 are carriers of RAD51D pathogenic variants. Int J Cancer.* 2013 Oct 15. doi: 10.1002/ijc.28540.
- [7] **Pilar Blay et al.** *Mutational analysis of BRCA1 and BRCA2 in hereditary breast and ovarian cancer families from Asturias (Northern Spain). BMC Cancer.* 2013; 13: 243

- [8] **JOSEFA SALGADO et al.** *A novel BRCA1 mutation in a patient with breast and ovarian cancer: A case report. Oncol Lett.* 2013 September; 6(3): 725–727.
- [9] **Palanca S et al.** *The deletion of exons 3-5 of BRCA1 is the first founder rearrangement identified in breast and/or ovarian cancer Spanish families. Fam Cancer.* 2013 Mar;12(1):119-23.
- [10] **Bensam M. et al.** *Detection of New Point Mutations of BRCA1 and BRCA2 in Breast Cancer Patients. Biochem Genet.* 2013 Jul 23.
- [11] **Plevová P, Hladíková A.** *Genetic counselling in male carriers of BRCA1 and BRCA2 gene mutations. Klin Onkol.* 2012;25 Suppl:S67-73.
- [12] **Daphne SC Lee et al.** *Comparable frequency of BRCA1, BRCA2 and P53 germline mutations in a multi-ethnic Asian cohort suggests TP53 screening should be offered together with BRCA1/2 screening to early onset breast cancer patients. Breast Cancer Res.* 2012; 14(2): R66.
- [13] **S. Solyom et al.** *Breast cancer-associated Abraxas mutation disrupts nuclear localization and DNA damage response functions. Sci. Transl. Med., 4 (2012), p. 122ra23*
- [14] **Wijden Mahfoudh et al.** *Hereditary breast cancer in Middle Eastern and North African (MENA) populations: identification of novel, recurrent and founder BRCA1 mutations in the Tunisian population. Mol Biol Rep.* 2012 February; 39(2): 1037–1046

- [15] **Mischa L. Li et al.** *Links between genome integrity and BRCA1 tumor suppression. Trends in Biochemical Sciences. Volume 37, Issue 10, October 2012, Pages 418–424*
- [16] **Tazzite A et al.** *BRCA1 and BRCA2 germline mutations in Moroccan breast/ovarian cancer families: Novel mutations and unclassified variants. Gynecol Oncol. 2012 Jun;125(3):687-92.*
- [17] **Franziska Pern et al.** *Mutation analysis of BRCA1, BRCA2, PALB2 and BRD7 in a Hospital-Based Series of German Patients with Triple-Negative Breast Cancer. PLoS One. 2012; 7(10): e47993.*
- [18] **S. M. Schneegans et al.** *Validation of three BRCA1/2 mutation-carrier probability models Myriad, BRCAPRO and BOADICEA in a population-based series of 183 German families. Fam Cancer. 2012 June; 11(2): 181–188.*
- [19] **FATIMA ZAHRA LAARABI et al.** *Genetic testing and first presymptomatic diagnosis in Moroccan families at high risk for breast/ovarian cancer. Oncol Lett. 2011 March; 2(2): 389–393. Published online 2011 January 21.*
- [20] **Peixoto A et al.** *International distribution and age estimation of the Portuguese BRCA2 c.156_157insAlu founder mutation. Breast Cancer Res Treat. 2011 Jun;127(3):671-9*

- [21] Chrissovaladis Koumpis et al. *Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in unselected breast cancer patients from Greece. Hered Cancer Clin Pract.* 2011; 9(1): 10
- [22] **Panagiotis A. Vorkas et al.** *Mutation scanning of exon 20 of the BRCA1 gene by high-resolution melting curve analysis. Clinical Biochemistry* 43 (2010) 178–185
- [23] **Esra Manguoglu et al.** *Germline mutations of BRCA1 and BRCA2 genes in Turkish breast, ovarian, and prostate cancer patients. Cancer Genetics and Cytogenetics* 203 (2010) 230-237
- [24] **Cherbal F et al.** *BRCA1 and BRCA2 germline mutations screening in Algerian breast/ovarian cancer families. Dis Markers.* 2010;28(6):377-84.
- [25] **Safinaz S Ibrahim et al.** *Presymptomatic breast cancer in Egypt: role of BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes mutations detection. J Exp Clin Cancer Res.* 2010; 29(1): 82.
- [26] **J. Nikkila et al.** *Familial breast cancer screening reveals an alteration in the RAP80 UIM domain that impairs DNA damage response function. Oncogene,* 28 (2009), pp. 1843–1852
- [27] **Joana D. Amaral et al.** *p53 and the regulation of hepatocyte apoptosis: implications for disease pathogenesis. Trends Mol Med.* 2009 Nov;15(11):531-41

- [28] **Stefania Tommasi et al.** *Molecular and in silico analysis of BRCA1 and BRCA2 variants.* *Mutation Research* 644 (2008) 64–70
- [29] **M. Martin et al.** *Randomized phase 3 trial of fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide alone or followed by paclitaxel for early breast cancer.* *J Natl Cancer Inst*, 100 (2008), pp. 805–814
- [30] **P. Fumoleau, M. Campone, B. Coudert et al.** *Cancer du sein et ciblage des récepteurs ErbB (HER).* *Bull Cancer*, 94 (2008), pp. 147–170 [Thérapeutiques ciblées : malades sélectionnés, Formation SFC]
- [31] **Antonino Musolino et al.** *BRCA mutations, molecular markers, and clinical variables in early-onset breast cancer: A population-based study.* *The Breast* (2007) 16, 280–292
- [32] **H. Erkko et al.** *A recurrent mutation in PALB2 in Finnish cancer families.* *Nature*, 446 (2007), pp. 316–319
- [33] **Marcelo A. Carvalho et al.** *Functional assays for BRCA1 and BRCA2.* *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Volume 39, Issue 2, 2007, Pages 298–310
- [34] **N. Rahman et al.** *PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene.* *Nat. Genet.*, 39 (2007), pp. 165–167
- [35] **S. Seal et al.** *Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles.* *Nat. Genet.*, 38 (2006), pp. 1239–1241

- [36] **A. Citri, Y. Yarden.** *EGF-ERBB signalling: towards the systems level. Nat Rev Mol Cell Biol, 7 (2006), pp. 505–516*
- [37] **M. Schmidt et al.** *Long-term prognostic significance of HER-2/neu in untreated node-negative breast cancer depends on the method of testing. Breast Cancer Res, 7 (2005), pp. R256–R266*
- [38] **S. Tommasi et al.** *BRCA1 mutations and polymorphisms in a hospital-based consecutive series of breast cancer patients from Apulia, Italy. Mutation Research 578 (2005) 395–405*
- [39] **H. Nishikawa et al.** *Mass spectrometric and mutational analyses reveal Lys-6-linked polyubiquitin chains catalyzed by BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase. J. Biol. Chem., 279 (2004), pp. 3916–3924*
- [40] **J.R. Morris, E. Solomon.** *BRCA1: BARD1 induces the formation of conjugated ubiquitin structures, dependent on K6 of ubiquitin, in cells during DNA replication and repair Hum. Mol. Genet., 13 (2004), pp. 807–817*
- [41] **Vera Balz et al.** *Analysis of BRCA1, TP53, and TSG101 germline mutations in German breast and/or ovarian cancer families. Cancer Genetics and Cytogenetics 138 (2002) 120–127.*
- [42] Vahid R Yassaee **et al.** *Novel mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes in Iranian women with early-onset breast cancer. Breast Cancer Res. 2002; 4(4): R6.*

- [43] **F.E Kleiman, J.L Manley.** *The BARD1-CstF-50 interaction links mRNA 3' end formation to DNA damage and tumor suppression. Cell, 104 (2001), pp. 743–753*
- [44] **A.A. Davies et al.** *Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. Mol. Cell, 7 (2001), pp. 273–282*
- [45] **Soares R et al.** *Analysis of mutations in the BRCA1 gene in patients with cancer of the breast and/or the ovary in Portugal. Acta Med Port. 2000 Sep-Dec;13(5-6):273-6.*
- [46] **The BRCA1 Exon 13 Duplication Screening Group.** *The exon 13 duplication in the BRCA1 gene is a founder mutation present in geographically diverse populations. The BRCA1 Exon 13 Duplication Screening Group. Am J Hum Genet. 2000 July; 67(1): 207–212.*
- [47] **Roxana Moslehi et al.** *BRCA1 and BRCA2 Mutation Analysis of 208 Ashkenazi Jewish Women with Ovarian Cancer. AJHG, Volume 66, Issue 4, April 2000, Pages 1259–1272*
- [48] **C.M. Perou et al.** *Molecular portraits of human breast tumours. Nature, 406 (2000), pp. 747–752*
- [49] **F.E Kleiman, J.L Manley.** *Functional interaction of BRCA1-associated BARD1 with polyadenylation factor CstF-50. Science, 285 (1999), pp. 1576–1579*

- [50] **L. Savelyeva, A et al.** *An interstitial tandem duplication of 9p-23-24 coexists with a mutation in the BRCA2 gene in the germ line of three brothers with breast cancer. Cancer Res., 58 (1998), pp. 863–866*
- [51] http://www.bibliomer.com/documents/fiches/fiche_ensavoirplus_lien_extraction_ADN_vf.pdf
- [52] <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20FR/Module%2004.pdf>
- [53] Travaux dirigés de biochimie, de biologie moléculaire et de bio-informatique, p :198 Par Gérard Coutouly, Emile Klein, Eric Barbieri, Mostafa Kriat
- [54] <http://www.umd.be/BRCA2/>
- [55] <http://www.umd.be/BRCA1/>
- [56] <http://jeanzin.fr/ecorevo/sciences/originvi.htm>
- [57] http://fr.maieutapedia.org/wiki/Puce_%C3%A0_ADN
- [58] http://www.applied-maths.com/Taqman-based_SNP_genotyping
- [59] <http://mmas.research.nmsu.edu/content/abi-dna-sequencing-service>
- [60] http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=OGP_9606_9558

Serment de Galien

Je jure en présence des maîtres de cette faculté :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

- D'exercer ma profession avec conscience, dans l'intérêt de la santé public, sans jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

- D'être fidèle dans l'exercice de la pharmacie à la législation en vigueur, aux règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

- De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession, de ne jamais consentir à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

- Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses, que je sois méprisé de mes confrères si je manquais à mes engagements.

جامعة محمد الخامس
كلية الطب والصيدلة
- الرباط -

قسم الصيدلي

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

وَأَعِزَّ بِاللَّهِ الْعِظَمِ

- ◀ أن أراقب الله في مهنتي
- ◀ أن أبجل أساتذتي الذين تعلمت على أيديهم مبادئ مهنتي وأعترف لهم بالجميل وأبقى دوما وفيا لتعاليمهم.
- ◀ أن أزاول مهنتي بوازع من ضميري لما فيه صالح الصحة العمومية، وأن لا أقصر أبدا في مسؤوليتي وواجباتي تجاه المريض وكرامته الإنسانية.
- ◀ أن ألتزم أثناء ممارستي للصيدلة بالقوانين المعمول بها وبأدب السلوك والشرف، وكذا بالاستقامة والترفع.
- ◀ أن لا أفشي الأسرار التي قد تعهد إلى أو التي قد أطلع عليها أثناء القيام بمهامي، وأن لا أوافق على استعمال معلوماتي لإفساد الأخلاق أو تشجيع الأعمال الإجرامية.
- ◀ لأحضى بتقدير الناس إن أنا تقيدت بعهودي، أو أحتقر من طرف زملائي إن أنا لم أف بالتزاماتي.

"والله على ما أقول شهيد"

**التنقيب عن التغيرات الجينية بتقنية PCR / تسلسل
للجين اللاغي للأورام BRCA 2
عند بعض الحالات من مرضى ومريضات سرطان الثدي في المغرب**

أطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم :

من طرفه

الآنسة: كنزة الرحالي

المزودة في: 05 شتمبر 1988 بالرباط

لنيل شهادة الدكتوراه في الصيدلة

الكلمات الأساسية: سرطان الثدي - طفرات - PCR / تسلسل - BRCA 2.

تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة

رئيس

السيد: العياشي الشبراوي

أستاذ في الكيمياء الإحيائية

مشرف

السيدة: نعيمة العلمي الوهابي

أستاذة في الكيمياء الإحيائية والبيولوجيا الجزيئية

أعضاء

السيد: عمر الشقيري

أستاذ في علم الأنسجة والأجنة والصبغيات

السيد: عز الدين الإبراهيمي

أستاذ في البيوتكنولوجيا الطبية