

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université de Blida 1**  
*Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie*  
*Département de Biologie et de Physiologie Cellulaire*



**Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master 2**

**Domaine : Science de la Nature et de la Vie**

**Option: *Biosignalisation Cellulaire, Moléculaire et Génétique des cancers***

Par :

**Otmane telba Sarra**

Contribution à la recherche des mutations de type  
BRCA dans des cas de cancer du sein en Algérie

**Soutenue publiquement le 30 octobre 2014 devant le jury :**

<b>Mme OUARAB S.</b>	<b>Maitre Assistante (A) à l'USDB</b>	<b>Présidente</b>
<b>Mme SAADI L.</b>	<b>MCA à l'USTHB</b>	<b>Promotrice</b>
<b>Mme ABDELOUAHAB A</b>	<b>Dr. Au CHU Mustapha Pacha</b>	<b>Co- promotrice</b>
<b>Mme HANNACHI L.</b>	<b>Pr. Au CHU Mustapha Pacha</b>	<b>Examinatrice</b>

**Promotion 2013/2014**

# Remerciements

Je remercie tout d'abord Dieu tout puissant pour m'avoir donné la volonté et le courage d'accomplir ce travail et de m'avoir indiqué la bonne voie.

Mes sincères remerciements vont à Mme **ABDELOUAHAB A**, Docteur sénologue au Centre Pierre et Marie Curie à l'hôpital Mustapha Bacha Alger, à qui je dois d'avoir pu réaliser ce travail. Après m'avoir aimablement accueillie dans son équipe et de m'avoir proposé ce sujet de recherche. Je la remercie de m'avoir guidé et orienté tout le long de mon mémoire, avec sa rigueur scientifique, son enthousiasme positif, sa compétence et son esprit critique qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

Je tiens à remercier à Mme **UHRHAMMER N**, d'avoir répondu présent à chaque fois que je l'ai sollicité.

Je témoigne ma profonde et ma respectueuse gratitude à Mme **SAADI L**, Maître de conférences à la faculté des sciences biologiques de l'USTHB, pour sa bienveillance à mon égard, ses précieux conseils, ses encouragements et sa disponibilité ainsi que pour l'attention et l'intérêt qu'elle a porté à mes travaux.

Je remercie Mme **OUARAB S**, Maître Assistante à l'USDB, pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury.

J'exprime mes vifs remerciements à Mme le professeur **HANNACHI L**, qui m'a fait l'honneur d'évaluer et de juger ce modeste travail.

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont également à l'encontre de toute personne qui a participé de près ou de loin directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

J'exprime toute ma reconnaissance et ma tendresse à ma chère maman. Je la remercie pour ces conseils bienveillants, pour ces infatigables dévouements, pour leur disponibilité et leur soutien moral.

Je remercie plus que quiconque mes frères et sœurs, mes amis qui ont su me soutenir et m'encourager durant la réalisation de ce mémoire.

Sarra.

# Dédicaces

Je dédie ce travail :

## **À ma chère famille**

Qu'ils trouvent ici toute ma gratitude

Pour leur soutien tout au long de

Mes études et grâce à qui

J'en suis arrivée là aujourd'hui

Que Dieu vous garde

## **À tous mes amis sans exception**

Pour leur écoute et leurs encouragements très précieux

Pour leur présence et leur soutien

## **A tous ceux que j'aime**

## Résumé

---

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme. Parmi l'ensemble des cas de cancers du sein, il est considéré qu'environ 10% ont une composante héréditaire associée à un risque très élevé de développer la maladie. Deux gènes majeurs de prédisposition au cancer du sein ont été mis en évidence, *BRCA1* et *BRCA2*. Les estimations du risque des porteuses de mutations *BRCA1* ou *BRCA2* de développer un cancer du sein à l'âge de 70 ans varient de 40 à 85%. (Antoniou *et al.*, 2003)

Le travail que nous avons mené avec Dr Amina ABDELOUAHAB au niveau de l'unité de sénologie du centre de santé Larbi TEBESSI a concerné 32 sujets présentant une histoire familiale et un risque élevé de développer un cancer du sein, il avait pour but de collecter des données afin d'établir une relation entre les mutations des gènes *BRCA1* et *BRCA2* et le risque de développement d'un cancer du sein.

L'étude réalisée a permis de constater que les femmes atteintes d'un cancer du sein (8 patientes sur 32), étaient toutes porteuses d'une mutation du gène *BRCA1* ou *BRCA2*, aussi, elle a permis d'identifier une mutation du gène *BRCA2* chez trois sujets de sexe masculin non porteurs d'un cancer (cas apparentés) et une mutation du gène *BRCA1* chez deux femmes non porteuses de cancer (cas apparentés).

Les résultats obtenus montrent clairement que le cancer du sein héréditaire chez la population étudiée était dû à une mutation du gène *BRCA1* ou *BRCA2*, ils nous ont aussi permis d'identifier les sujets à haut risque de développer un cancer du sein, ce qui permettra d'optimiser leur prise en charge à moyen et long terme.

**Mots clés :** Cancer du sein, Héréditaire, Mutation, BRCA1, BRCA2.

## LISTE DES ABREVIATIONS UTILISÉES DANS LE TEXTE

<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique
<b>Acide</b>	DésoxyriboNucléique
<b>ATM</b>	Ataxia Telangiectasia Mutated
<b>EDTA</b>	Ethylène Diamine Tétra-Acétate
<b>ddNTP</b>	3'-didésoxynucléotide-5'-triphosphate
<b>dNTP</b>	désoxynucléotide-5'-triphosphate
<b>kD</b>	kilodalton
<b>kb</b>	kilobase
<b>NLS</b>	Nuclear Localization Sequences
<b>NHEJ</b>	Non Homologous End Joining
<b>PRC</b>	Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérisation en chaîne
<b>RH</b>	Recombinaison Homologous
<b>TP</b>	Tumor protéin
<b>TP 53</b>	tumor protein 53
<b>PTEN</b>	phosphatase and tensin homolog
<b>BRC</b>	breast cancer
<b>MER</b>	meiotic recombination homolog
<b>EDTA</b>	ethylene diamine tetra acetique

## LISTE DES FIGURES

		<b>Page</b>
<b>Figure 1</b>	schéma d'une coupe sagittale représentant l'anatomie du sein normal (Gauthier. 2012)	3
<b>Figure 2</b>	répartition du taux d'incidence standardisé du cancer du sein dans le monde. (Mahnane <i>et al.</i> , 2012)	5
<b>Figure 3</b>	Gènes de susceptibilité au cancer du sein. . (Balmain <i>et al.</i> , 2003)	7
<b>Figure 4</b>	Risque en fonction de l'âge de cancer du sein chez les porteuses de mutations des genes BRCA. (Antoniou <i>et al.</i> , 2003)	7
<b>Figure 5</b>	Structure des gènes BRCA (Kerr <i>et al.</i> , 2001)	8
<b>Figure 6</b>	Représentation schématique de la séquence primaire de BRCA1 (Mark. 2005)	9
<b>Figure 7</b>	Représentation schématique de la séquence primaire de BRCA2 et ses principaux partenaires d'interactions. (Mark. 2005)	10
<b>Figure 8</b>	Instabilité chromosomique due à des réparations de bris d'ADN double brins inappropriées (Venkitaraman <i>et al.</i> , 2002)	11
<b>Figure 9</b>	Fonction de la protéine BRCA1 en réponse aux dommages à l'ADN. (Yoshida., 2004)	11
<b>Figure 10</b>	Un possible modèle de l'implication de BRCA1 et BRCA2 dans la réparation de l'ADN. (Welch <i>et al.</i> , 2000)	14
<b>Figure 11</b>	<b>Les étapes de la réaction de la PCR</b>	20
<b>Figure 12</b>	Résultats du teste génétique	25
<b>Figure 13</b>	Identification des mutations BRCA chez les cas index et les cas apparentés	25
<b>Figure 14</b>	Répartition des types de cancer chez les cas index	26
<b>Figure 15</b>	Répartition des mutations BRCA selon l'âge des individus	26

<b>Figure 16</b>	Répartition des mutations BRCA selon le sexe	27
<b>Figure 17</b>	Répartitions des mutations selon le gène BRCA1/2 et le sexe	27

## LISTE DES TABLEAUX

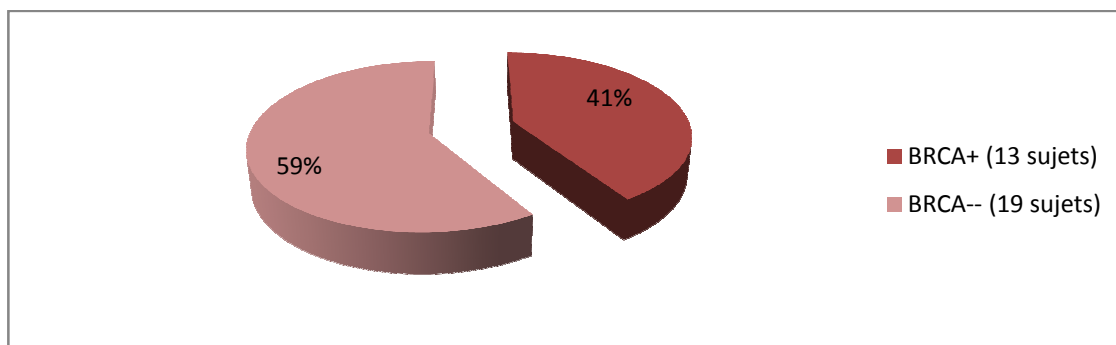
		<b>Page</b>
<b>Tableau 1</b>	<b>Composants de la réaction de séquence</b>	23
<b>Tableau 2</b>	<b>Conditions de la réaction de séquence</b>	23



### IV-1 Résultats de l'analyse moléculaire du gène

Notre travail a porté sur un effectif de 32 sujets, présentant une histoire familiale et un risque élevé de développer un cancer du sein, (8) d'entre eux sont déjà atteints d'un cancer du sein (cas index), et (24) autres apparentés. Nous avons analysé par PCR puis séquençage direct les deux gènes BRCA 1 et BRCA 2. L'étude génétique a été réalisée au niveau du Laboratoire de Diagnostic Génétique et Moléculaire du Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France. L'âge moyen des sujets participant à l'étude était de 47 ans, les prélèvements ont été effectués sur une période de 5 mois (du 19 Mars au 19 Juillet 2014).

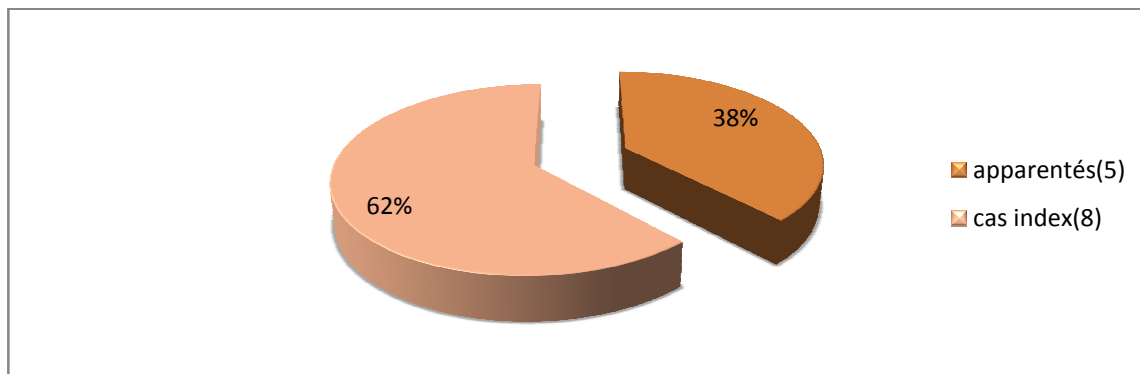
#### IV-1.1 Résultats des tests génétiques



**Figure 12 :** Résultats du test génétique.

Cette répartition montre que la mutation du gène BRCA a été identifiée chez 41% (13/32 sujets) (BRCA+), et non identifiée dans 59% (19/32 sujets) (BRCA-) (Figure 14).

#### IV-1.2 Identification des mutations BRCA chez les cas index et les cas apparentés



**Figure 13 :** Identification des mutations BRCA chez les cas index et les cas apparentés.

## Résultats et Discussion

Cette distribution montre que la mutation du gène BRCA a été identifiée chez les 8 cas index 8/13 (62%), c'est-à-dire déjà porteurs du cancer du sein, mais aussi chez les 5/13 (38%) apparentés. Cela confirme que la survenue de cancer du sein chez les cas index est due à cette prédisposition, héritée suite à une histoire familiale.

### IV-1.3 Répartition des types de cancer chez les cas index

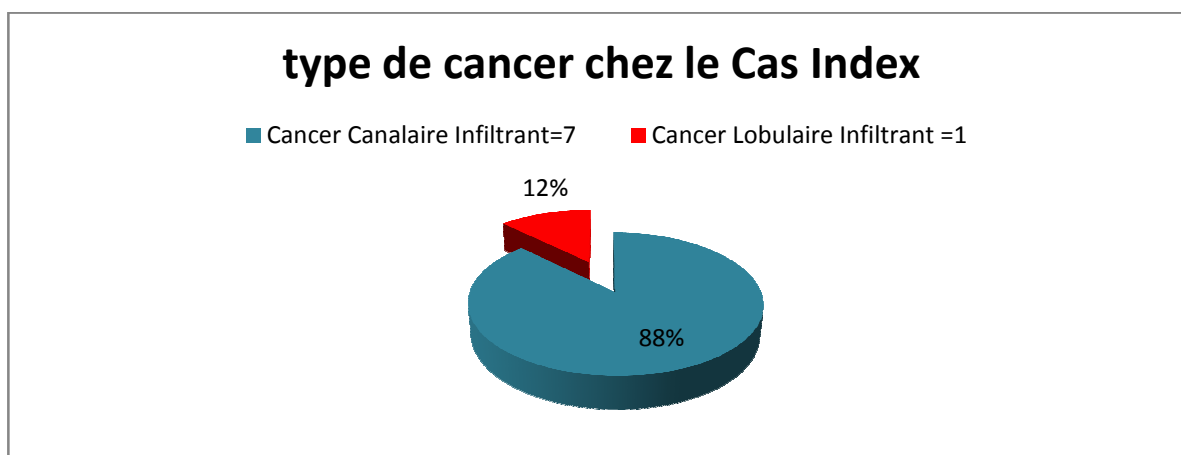


Figure 14 : Répartition des types de cancer chez les cas index.

Les cas index de notre effectif ont présenté une nette prédominance du type histologique du cancer canalaire infiltrant 7/8 (88%), un seul sujet a présenté un cancer lobulaire infiltrant (12%).

### IV-1.4 Répartition des mutations BRCA selon l'âge des individus

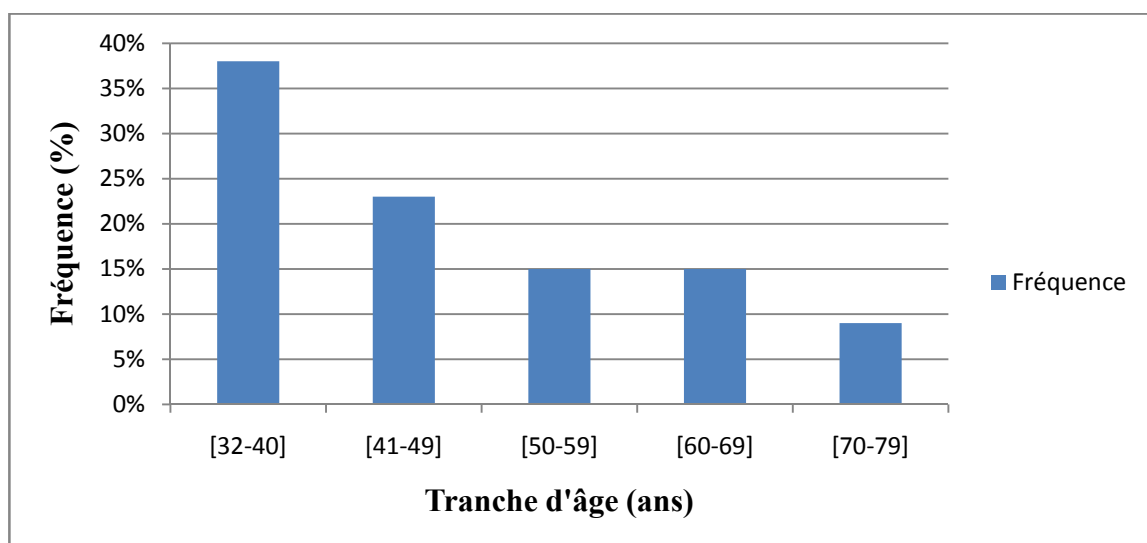
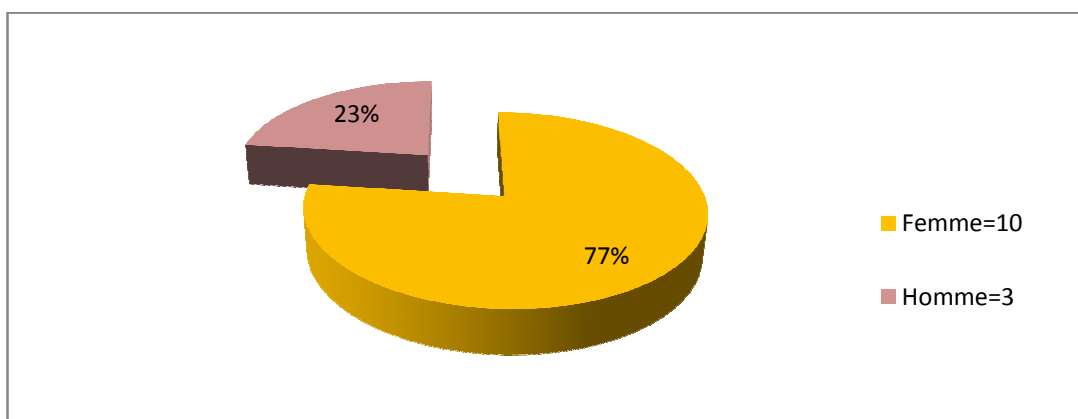


Figure 15 : Répartition des mutations BRCA selon l'âge des individus.

## Résultats et Discussion

Cette analyse montre que la mutation du gène BRCA touche pratiquement tous les âges mais à différentes fréquences. On remarque une nette prédominance à un âge jeune : entre 32-40 ans (38%) et 41-49 ans (23%), par rapport aux sujets plus âgés, entre 50-59 ans (15%), 60-69ans (15%), et 70-79 ans (9%).

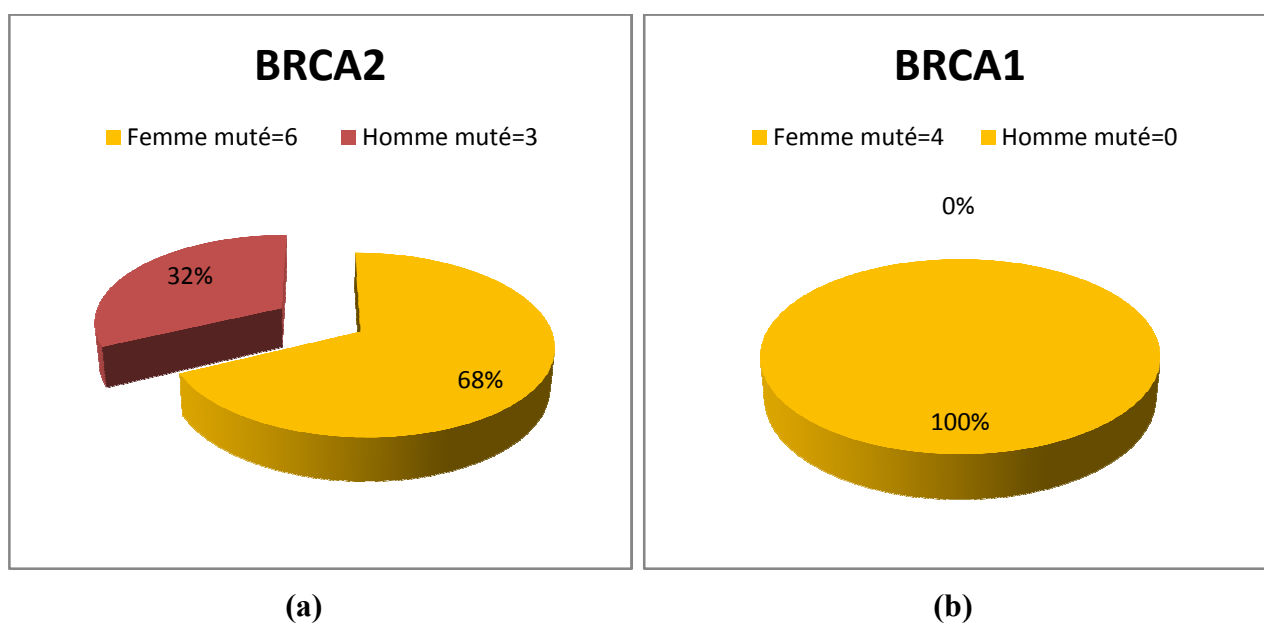
### VI-1.5 Répartition des mutations BRCA selon le sexe



**Figure 16 :** Répartition des mutations BRCA selon le sexe.

Cette répartition montre une nette prédominance des mutations féminines 10/13 sujets (77%), face à 3/13 sujets (23%) hommes.

### IV-1.6 Répartitions des mutations selon le gène BRCA muté et le sexe



**Figure 17:** Répartitions des mutations selon le gène BRCA1/2 et le sexe.

## Résultats et Discussion

---

Ces deux histogrammes nous présentent la répartition des 13 mutations BRCA 1 et 2, selon le sexe féminin et/ou masculin. Cependant, des mutations du gène BRCA 1 ont été identifiées uniquement chez des femmes (100%) (Figure 17b), aucun homme ne portant une mutation du gène BRCA1, contrairement aux mutations du gène BRCA 2. Ce dernier a touché les deux sexes, avec une répartition de 6 femmes (68%) et 3 hommes (32%) (Figure 17a).

### IV-2 DISCUSSION

La présente étude a été faite sur 32 sujets (âge moyen : 47 ans), présentant une histoire familiale et un risque élevé de développer un cancer du sein. Nous avons détecté des mutations du gène BRCA chez 13/32 (41%), avec une nette prédominance féminine, puisque 10/13 sujets (77%) sont des femmes, alors que 3/13 sujets (23%) sont des hommes. En effet, selon **Peto et al.**, 1999, les mutations BRCA1 et BRCA2 sont plus fréquentes chez les femmes présentant au moins une apparentée du premier degré atteint d'un cancer du sein.

Deux types de mutation familiale délétère ont été identifiés, le premier affectant l'exon 10 du gène BRCA 2 (1538 del 4), et le second, affectant l'exon 11 du gène BRCA 1 (917 del TT) (Voir annexe 4 et 5). Ces deux mutations engendrent un codon stop prématuré conduisant à une instabilité génétique, qui accélère l'accumulation de mutations, favorisant ainsi le développement de tumeurs.

Dans les 13 cas mutés 8 (62%) sont déjà atteints d'un cancer du sein (cas index) dont le type histologique prédominant était le carcinome canalaire infiltrant (CCI) 7/8 à (88%), suivi du carcinome lobulaire infiltrant 1/8 (CLI) à (12%).

Nos résultats corroborent avec les données de la littérature. En effet, selon **Abbas et al.**, 2011, les études histologiques ont montré que le type histologique prédominant des tumeurs était le carcinome canalaire infiltrant (CCI) dans 87,8% des cas, suivi du carcinome lobulaire infiltrant (CLI 4,7%). Le reste de notre population étudiée était composée de cas apparentés présentant des antécédents familiaux de cancer du sein et chez qui on a retrouvé leurs gènes BRCA mutés (38%). Ces résultats suggèrent que cette mutation augmentera le risque d'avoir un cancer du sein à 70 ans, de 10% à 45-85%. (**Antoniou et al.**, 2003)

Cependant, nos résultats corroborent avec les conclusions antérieures en ce qui concerne l'estimation du risque tumoral induit par les mutations BRCA qui est définie en termes de pénétrance. La pénétrance se réfère à la probabilité de développer la maladie chez un porteur d'une mutation délétère à un âge donné. Dans le cas de porteurs de mutations appartenant à des familles présentant de multiples cas de cancers du sein, la pénétrance du

## Résultats et Discussion

---

cancer du sein est estimée entre 72% et 87% pour BRCA1 et BRCA2 à 70 ans. Ce risque a aussi été étudié au sein de la population non sélectionnée pour son histoire familiale. Ces estimations du risque sont moins élevées que celles basées sur les études des familles. Toutefois, l'histoire familiale est le principal déterminant du risque de cancer du sein. (Ford *et al.*, 1998, Antoniou *et al.*, 2000).

Plusieurs études ont été réalisées dans le but d'évaluer l'implication des gènes BRCA1 et BRCA2 dans la survenue du cancer du sein familial.

Nos résultats corroborent avec des études effectuées chez 30 familles canadiennes-françaises qui présentaient un risque élevé de développer un cancer du sein, chez qui on retrouvait une mutation BRCA chez 40% d'entre elles. (Oros *et al.*, 2004),

Nos données se rapprochent également des résultats de l'étude de **Hopper** *et al.*, 1999, portant sur une population australienne de 388 femmes atteintes d'un cancer du sein avant 40 ans, la recherche de mutations a été réalisée sur l'exon 11 de BRCA1 et sur les exons 10 et 11 de BRCA2. Ainsi, environ 60% de chaque gène ont été analysés, 18 mutations BRCA1 et BRCA2 ont été détectées, soit 4,6%, et 2,3% se trouvant sur chacun des deux gènes.

En effet, une autre étude menée par le Breast Cancer Linkage Consortium (BCLC), sur 237 familles présentant au moins 4 cas de cancers du sein, a évalué que pour 52% des familles, la maladie était liée à BRCA1, 32 % à BRCA2 et 16% à d'autres gènes. (Ford *et al.*, 1998).

Nos résultats confirment les données obtenues dans une étude quantitative et d'analyse séquentielle du gène BRCA chez des cas familiaux et sporadiques algérois menée par le groupe de **Uhrhammer** *et al.*, 2008. Une fréquence remarquable de 36,4 % de mutation BRCA a été observée dans les cas de cancers familiaux algériens, contre 10,3 % dans les cas familiaux français des cancers du sein. On conclut à une plus grande fréquence de mutations BRCA parmi les cancers du sein de la femme jeune algérienne par rapport à la femme européenne, qui pourrait être expliquée (du moins en partie) par la forte contribution de la génétique révélée par le contexte de la faible incidence de cancer du sein. Ainsi, dans une étude israélienne incluant 60 % de patientes d'origine ashkénaze, et même si les effectifs sont limités pour tirer des conclusions définitives, le taux de mutation BRCA1/2 était plus fréquent dans le sous-groupe des patientes très jeunes (moins de 35 ans). (Paluch-Shimon *et al.*, 2010).

Nos résultats correspondent également aux résultats de l'étude de **Peto** *et al.*, 1999, qui a été menée sur deux groupes de femmes. Dans le premier groupe, 254 femmes âgées de plus de 36 ans, dans le second groupe de femmes diagnostiquées à un âge compris entre 36 ans et

## Résultats et Discussion

---

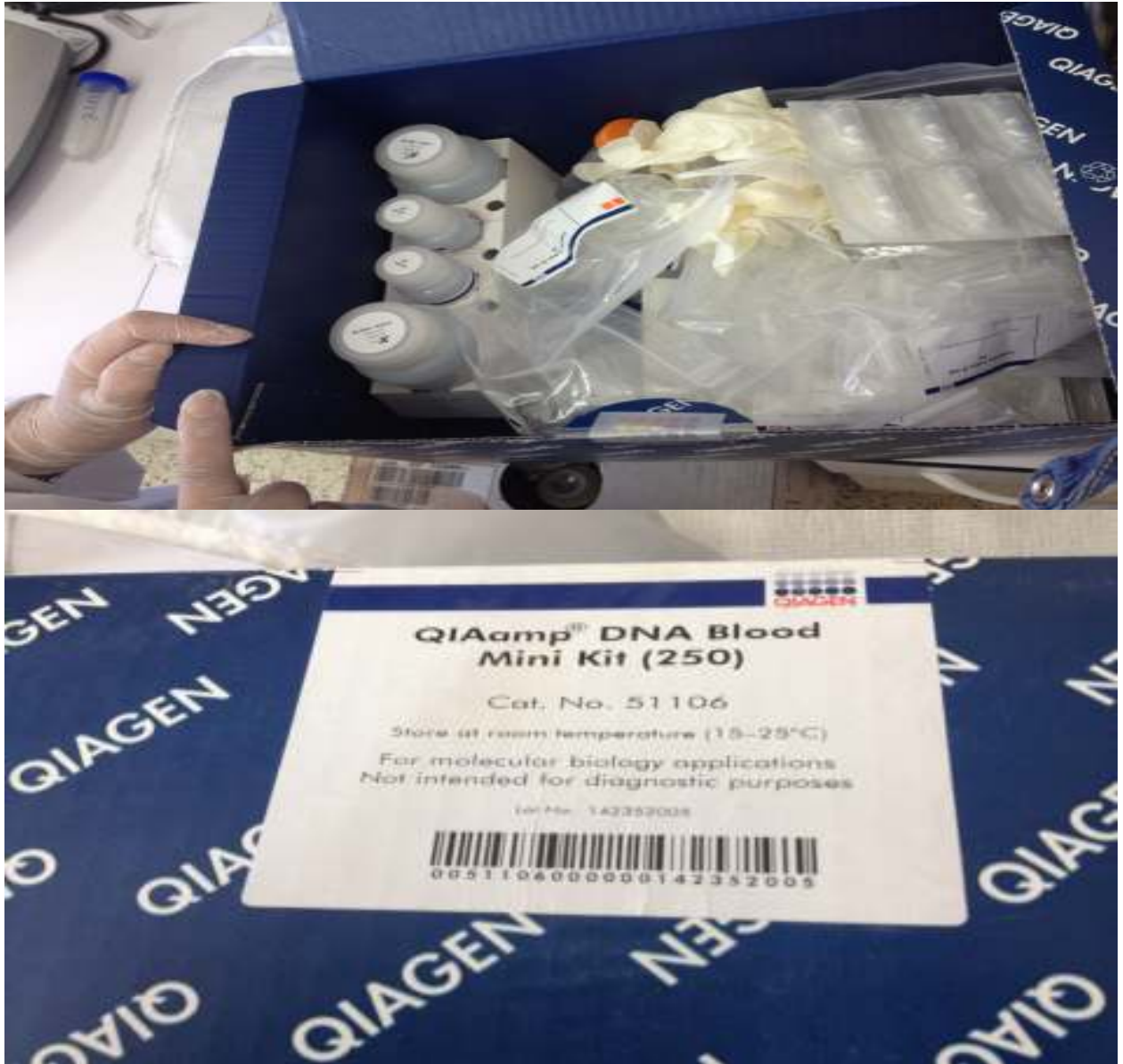
45 ans. Le résultat : 30 femmes porteuses de mutations BRCA1 (2,6%) ou BRCA2 (2,3%) sur 617 femmes atteintes du cancer du sein avant 45 ans, soit 4,9%, ont été mises en évidence. Sur ces 30 porteuses, 20% ont une histoire familiale de cancers du sein ou de l'ovaire chez des parentes du premier degré. Ces résultats sont en accord avec ceux de l'équipe de **Hopper et al.**, 1999). En résumé, nous constatons que l'ensemble des résultats de ces études sont assez similaires.

Des mutations du gène BRCA 1 dans la population étudiée ont également été identifiés, mais uniquement chez des femmes (100%), aucun homme ne portait de mutation du gène BRCA1, contrairement aux mutations du gène BRCA 2, ce dernier a touché les deux sexes, avec une répartition de 6 femmes (68%) et 3 hommes (32%). Ces résultats suggèrent que les phénotypes associés aux mutations des gènes BRCA1 et BRCA2 diffèrent.

En effet, selon **Ford et al.**, 1998, le cancer du sein chez l'homme est plus élevé pour les porteurs de mutations sur BRCA2. Ainsi, nos résultats corroborent avec la population étudiée par le Breast Cancer Linkage Consortium, où la majorité des familles avec un cas ou plus de cancer du sein masculin, le cancer est lié à BRCA2. Par contre, pour les familles avec seulement des cancers du sein féminins, la contribution des gènes BRCA1 et BRCA2 était d'environ 60%. Cette contribution varie selon le nombre de cas de cancers. (Peto *et al.*, 1999; Anglian Breast Cancer Study Group.2000, Hopper *et al.*, 1999).

Nos résultats mettent en évidence l'importance des conseils et tests génétiques pour la population algérienne. En conclusion, nous pouvons dire que dans la population générale, deux gènes majeurs BRCA 1 et BRCA 2 sont impliqués sans la prédisposition au cancer du sein précoce.

**Annexe 3:** QIAamp® DNA Blood Midi Kit, Qiagen, Pays-Bas.





## Annexe 2 : Consentement éclairé.

# مرکز پیار و ماری کوری Centre Pierre & Marie Curie

SERVICE DE CHIRURGIE « B » (SENOLOGIE)  
Professeur Ahmed BENDIB  
Docteur Amina Abdelouahab  
Tél. : 021237432

### Consultation d'oncogénétique

Jour de consultation : le dimanche sur RDV

Jour de prélèvement : le lundi sur RDV

### CONSENTEMENT ECLAIRE

Après avoir été informé(e) par l'équipe du Pr. Ahmed BENDIB,

- J'ai compris qu'il peut exister dans ma famille un risque de prédisposition héréditaire aux cancers du sein et/ou de l'ovaire
- Une analyse génétique m'est proposée à partir d'une prise de sang. Cette analyse repose sur l'étude de mon patrimoine génétique. Elle a pour but de déterminer si un de mes gènes présente une mutation (modification génétique) me rendant particulièrement susceptible au cancer du sein et/ou de l'ovaire.
- J'ai été informé(e) que cette analyse sera effectuée dans le laboratoire agréé du Pr. Y-J. Bignon, et nécessite quelques mois pour être réalisée
- Une fois l'analyse génétique effectuée, je peux refuser que son résultat me soit communiqué, mais je dois alors en informer par écrit le Dr. Amina ABDELOUAHAB
- Si le test ne retrouve pas de mutation, je suis consciente qu'il demeure une possibilité que je sois porteur (se) d'une mutation non encore identifiée, et autorise l'équipe du Pr. Ahmed BENDIB à poursuivre les analyses diagnostiques génétiques en rapport avec le risque de cancer du sein et/ou de l'ovaire
- Si le test retrouve une mutation, c'est à dire si je suis porteur (se) de cette mutation, j'ai compris que le risque d'atteinte mammaire et/ou d'atteinte ovarienne au cours de ma vie est important, et que mes apparentés sont susceptibles d'avoir hérité de cette prédisposition
- Les résultats du diagnostic génétique me concernant, me seront transmis au cours d'une nouvelle consultation d'oncogénétique à moi seul(e) et à aucun autre membre de ma famille. Lors de cette consultation, l'interprétation des résultats me sera expliquée. Ils resteront strictement confidentiels et ne pourront être transmis qu'aux seuls médecins que je désignerai.
- Il m'appartient - si je le souhaite - de communiquer l'information à une ou des personnes de ma famille afin de les prévenir du risque qu'elles encourent et de les informer de la possibilité de réaliser un test
- Si mes gènes présentent des caractéristiques qui apparaissent médicalement essentielles pour un des membres de ma famille, j'autorise l'utilisation de ce résultat
- J'ai compris les recommandations de prise en charge médicale proposées liées au risque héréditaire de cancer du sein et/ou de l'ovaire, qui ne pourront être transmises qu'aux seuls médecins que je désignerai
- Les résultats du diagnostic génétique seront consignés dans mon dossier familial de la consultation d'oncogénétique du Pr. Ahmed BENDIB, et feront l'objet d'un traitement informatique selon les modalités recommandées par la Commission Nationale Informatique et Liberté, mon droit d'accès et de rectification pour les informations me concernant pouvant s'exercer à tout moment
- Cette prise de sang ne pourra être utilisée à d'autres études génétiques sans mon consentement
- J'ai eu la possibilité de poser toutes les questions que je souhaitais, aux médecins de l'équipe du Pr. Ahmed BENDIB, et j'en ai eu des réponses claires.

Ainsi conformément aux dispositions réglementaires, je donne mon accord pour que soit effectué à partir d'une prise de sang, un examen de mes caractéristiques génétiques en rapport avec une prédisposition héréditaire aux cancers du sein et/ou de l'ovaire.

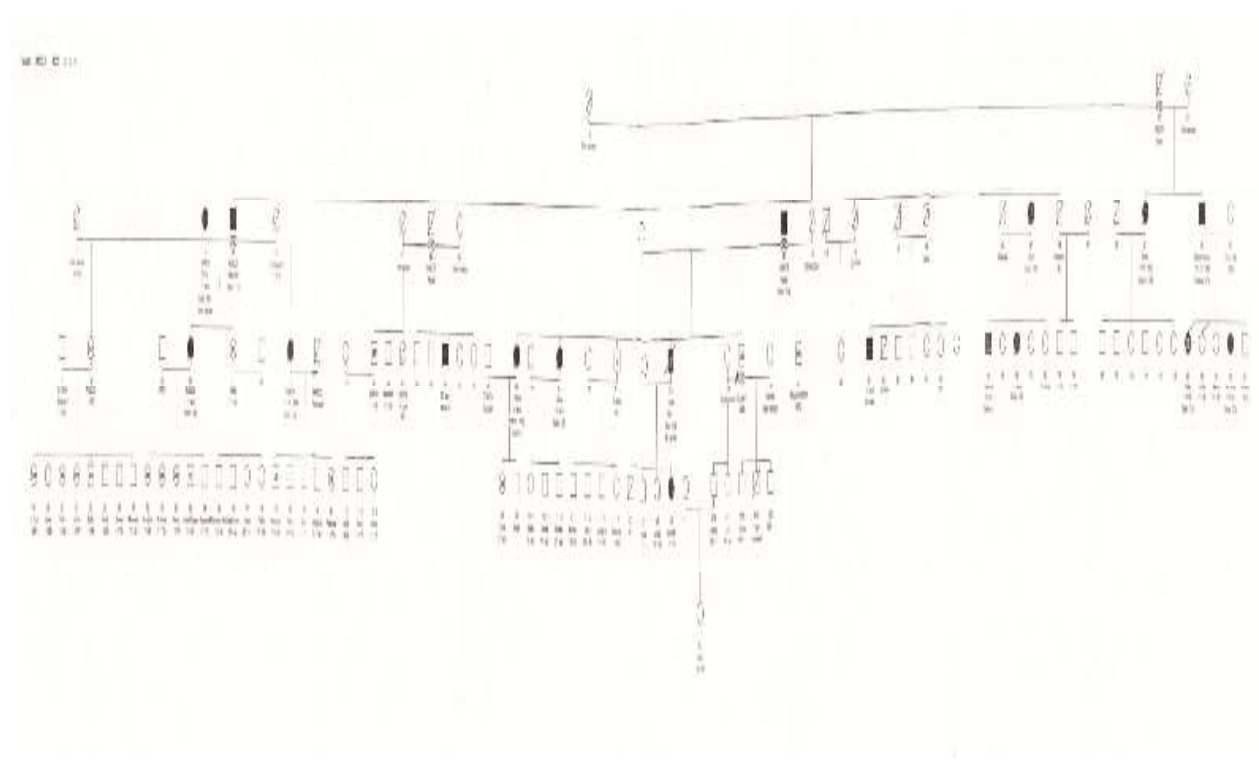
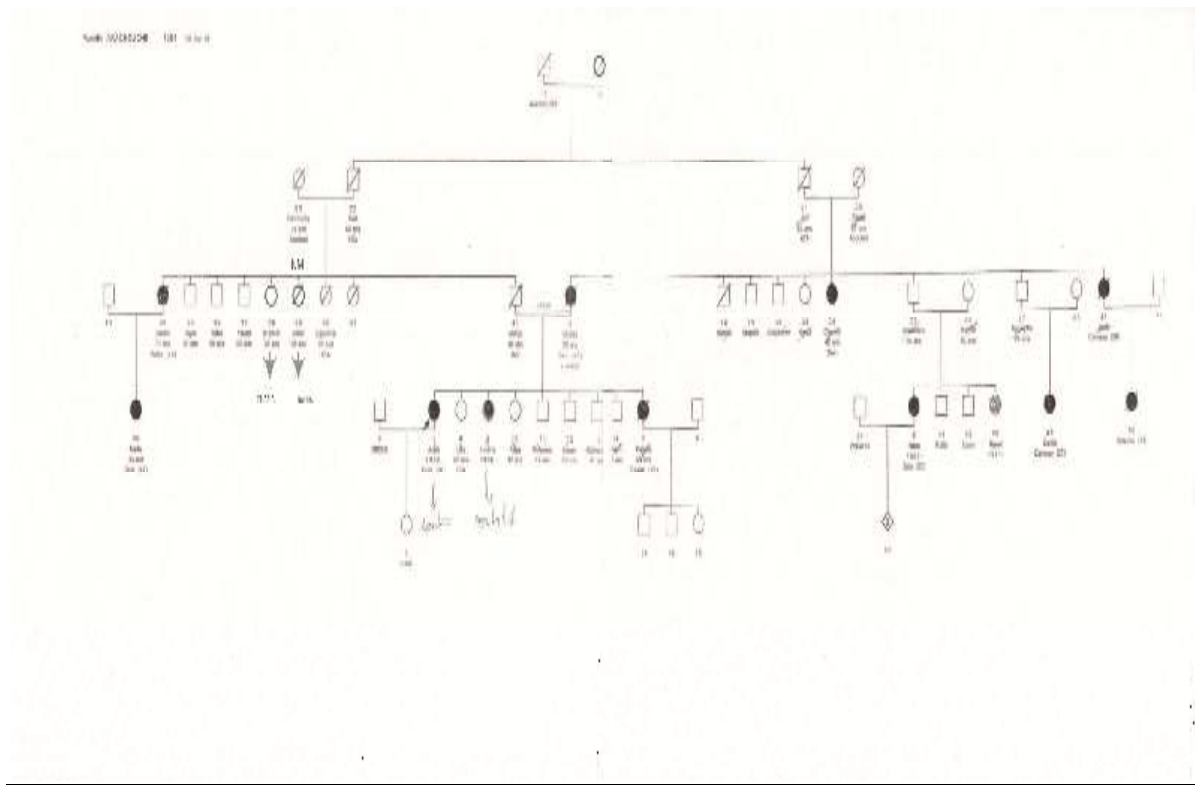
Nom :  
Signature :  
Prénom :  
Date :  
Médecin :

Nom de jeune fille :  
Date de naissance :

Signature :



# Annexe 1 : Arbre généalogique des sujets étudiés



## Annexe 4 : Résultat d'analyse génétique moléculaire individuel

Laboratoire Diagnostic Génétique Et Moléculaire  
N° agrément : 2001/58  
Centre Jean Perrin - BP 392  
63011 CLERMONT-FERRAND - FRANCE  
Pr Yves-Jean BIGNON

Tel : (33)04 73 27 80 30  
Fax : (33)04 73 27 80 43  
e-mail : Yves-Jean.Bignon@sig.fr

### RESULTAT D'ANALYSE GENETIQUE MOLECULAIRE INDIVIDUEL

FAMILLE : ---- N° : 1351

Syndrome familial : Sein

INDIVIDU TESTE : NOM : ..... Prénom : ----  
N° dans arbre généalogique : 01

ANALYSE : Gène étudié : **BRCA1**

Tissu prélevé : Sang ADN

2 prélèvements indépendants : **OUI**

Techniques utilisées : - Séquençage direct

#### RESULTAT FAMILIAL :

Nomenclature de la mutation Familiale <b>917 del TT</b>	Effet sur la protéine : <b>Stop</b> Nucléotide (s) mutée (s) : <b>917</b> Codon impliqué : <b>266</b> Exon impliqué : <b>11(1)</b>
--	---

#### RESULTAT INDIVIDUEL ET INTERPRETATION : -

- **Mutation délétère**

NOM - Prénom du médecin :

A Clermont-Fd le : 29 Sept 2014

Signature



**Pr Y.-J. BIGNON**  
Génédiste Médical, Oncologue Médical  
consultant en Oncogénétique  
Centre J.Perrin - BP 392  
63011 Clermont-Ferrand Cedex 04 France  
N° du Conseil de l'Ordre 02983

## Annexe 5: Résultat d'analyse génétique moléculaire individuel

Laboratoire Diagnostic Génétique et Moléculaire  
N° agrément : 200325  
Centre Jean Perrin - BP 592  
63011 CLERMONT-FERRAND - FRANCE  
Dr Yves-Jean BIGNON

Tel : (33) 04 77 27 80 53  
Fax : (33) 04 77 47 30 46

e-mail : Yves-Jean.Bignon@jeanperrin.fr

### RESULTAT D'ANALYSE GENETIQUE MOLECULAIRE INDIVIDUEL

FAMILLE : ..... N° : **1350**.....

Syndrôme familial : ..... Seul.....

INDIVIDU TESTE : NOM : ..... Prénom : .....

N° dans arbre généalogique : .....60.....

ANALYSE : Gène étudié : **BRCA2**

Tissu prélevé : ..... Sang..... AON

Prélèvement indépendant : **NON**

Techniques utilisées : ..... Séquençage direct.....

#### RESULTAT FAMILIAL :

Nomenclature de la mutation Familiale <b>1538 del 4</b>	Effet sur la protéine : <b>Stop</b> Nombre de (s) motif (s) : <b>4842</b> Codon impliqué : <b>1538</b> Exon impliqué : <b>10</b>
--	---

#### RESULTAT INDIVIDUEL ET INTERPRETATION: -

- Mutation délétère

NOM - Prénom du médecin :

A Clermont-Fd le **28 Sept 2014**

Signature:

**Pr Y.-J. BIGNON**  
Génécien Médical, Oncologue Médical  
consultation d'Onco-génétique  
Centre J Perrin - BP 592  
63011 Clermont-Ferrand Cedex (1) France  
N° du Conseil de l'Ordre 03985

## Conclusion

---

Dans ce travail, nous nous sommes proposé de faire une étude moléculaire sur 32 individus présentant une histoire familiale et un risque élevé de développer un cancer du sein, dont 8 atteints de cancer du sein. Cette étude a montré que les 8 malades étaient porteuses de mutations dont 6 à BRCA2 et 2 à BRCA1, aussi elle a montré que 5 des individus sains testés étaient porteurs d'une mutation de ces gènes dont 3 hommes avec une mutation à BRCA2 et 2 femmes à BRCA1.

Des études antérieures (Uhrhammer *et al.*, 2008) ont corroboré ces résultats, et ont clairement démontré l'implication des mutations des gènes BRCA1 et BRCA2 dans le cancer du sein héréditaire chez la population algérienne.

Durant cette étude, nous avons tenté de définir la composante génétique du cancer du sein héréditaire chez la population algérienne. Pour ce faire, nous avons eu recours à la technique du séquençage direct de l'ADN pour identifier les mutations BRCA1 et BRCA2 chez les patients algériens avec une histoire personnelle et familiale suggérant une prédisposition génétique à un cancer du sein.

Les implications de ces nouvelles conclusions en ce qui concerne les tests génétiques et les conseils sont importantes pour la population algérienne.

Le cancer du sein familial est rare, moins de 10% contre 90% pour le cancer sporadique, par sa faible incidence générale et sa forte incidence familiale, le cancer du sein héréditaire se prête bien au dépistage ciblé, d'où l'intérêt d'une orientation en consultation d'oncogénétique. Cette orientation permettra un diagnostic précoce des cancers du sein héréditaires, ce qui permettra une prise en charge optimale de ces patients.

# Introduction

---

Le cancer du sein est le cancer féminin le plus fréquent, et est considéré comme la première cause de mortalité chez les femmes dans le monde (522 000 décès). 1,7 million de femmes ont un diagnostic de cancer du sein chaque année et en 2012, et 6,3 millions de femmes vivaient avec un cancer du sein diagnostiqué au cours des cinq années précédentes. (GLOBOCAN.2012)

Il représente maintenant un cancer sur quatre chez les femmes selon l'Organisation Mondiale de la Santé. De ce fait il constitue une préoccupation majeure de santé publique dans le monde.

Les cancers du sein sont des maladies multifactorielles résultant d'interaction entre facteurs environnementaux acquis et facteurs génétiques. Les facteurs de risque héréditaires de ce cancer sont les seuls à avoir une valeur prédictive assez forte pour permettre une prise en charge adaptée au risque. Le cancer du sein peut être classé selon trois types sur la base d'antécédents familiaux :

- 70 à 90% des cas surviennent dans un contexte sporadique sans antécédents familiaux
- 10 à 20% sont des cancers qui surviennent avec des agrégations familiales et ne sont pas liés aux gènes BRCA1 et BRCA2
- 5 à 10% des cancers du sein sont héréditaires et surviennent sous une prédisposition génétique. (Antoniou *et al.*, 2002)

La transmission de l'anomalie se fait selon un mode autosomique dominant, une seule copie de la mutation génétique suffit pour exposer un sujet à un risque de cancer et un enfant a un risque sur deux d'hériter de l'anomalie.

Le présent travail est inscrit dans l'annuaire des projets de recherche en Algérie, pour l'identification des mutations des gènes BRCA1 et BRCA2 chez des sujets ayant un lien de parenté direct avec une personne atteinte d'un cancer du sein (lien de 1<sup>ier</sup>/second degrés et appartenant à la même branche parentale).

L'objectif de ce travail est d'obtenir plus d'informations sur la contribution des mutations de BRCA1 et BRCA 2 dans le cancer du sein en Algérie, et ce pour une meilleure compréhension des facteurs de risques génétiques de cette maladie, afin d'optimiser la prise en charge des sujets à haut risque.

### III-1 Matériel d'étude

#### III-1.1 Patients étudiés

Notre travail a porté sur un effectif de 32 sujets, présentant une histoire familiale et un risque élevé de développer un cancer du sein (Voir annexe 1). (8) d'entre eux sont déjà atteints d'un cancer du sein (cas index), et (24) apparentés, Les sujets admis ont été répertoriés au niveau de l'unité de sénologie se trouvant au niveau du centre de santé Larbi Tbessi, Mohamed Belouizdad, Alger, dans le but d'identifier les mutations de type BRCA 1 et BRCA. L'extraction d'ADN a été effectuée au niveau du service sénologie du CPMC de l'hôpital Mustapha Bacha d'Alger et l'étude génétique a été réalisée au niveau du Laboratoire de Diagnostic Génétique et Moléculaire du Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France.

L'âge moyen des sujets participant à l'étude était de 47 ans, les prélèvements ont été effectués sur la période de 5 mois (du 19 Mars au 19 Juillet 2014)

#### III-1-2 Critères d'inclusion

Tous les sujets inclus dans cette étude ont signé un consentement éclairé, conformément à la législation algérienne. (Voir annexe 2)

Les critères de sélection suivis lors de cette étude sont :

- A) Des femmes avec des antécédents familiaux de cancer du sein et/ou de l'ovaire ayant affecté deux ou trois parentes de la même branche parentale
- B) Deux (ou plus) cas de cancer du sein et/ou de l'ovaire affectant des parents au premier degré
- C) Cas de cancer du sein bilatéral
- D) Cancer du sein et/ou de l'ovaire survenu avant l'âge de 40 ans
- E) Parents masculins atteints d'un cancer du sein.

Afin d'avoir un maximum de précision en matière de choix d'orientation en consultation génétique, nous avons eu recours à un système de scoring , qui est le Manchester scoring system , en fonction des scores attribués par paramètre (ci-dessous) , on fait le calcul. si le score est égal à 5 , le sujet est qualifié de sujet à haut risque de porter une mutation, s'il est égal à 3-4, le risque est modéré , s'il est de 1 à 2, le risque est faible .

- cancer du sein avant 30 ans =4
- cancer du sein entre 30 et 39 ans =3
- -Cancer du sein entre 40 et 49 ans =2
- Cancer du sein entre 50 et 70 ans =1

- Cancer du sein chez un homme =4
- Cancer de l'ovaire =3

### III-2 Méthodes moléculaires

#### III-2.1 Extraction de l'ADN génomique

Le principe consiste à extraire de l'ADN à partir des leucocytes de sangs récupérés (10 à 30 ml de sang) sur EDTA, une centrifugation pendant 10 minutes à 2500 tours/mn, puis une étape de lyse des leucocytes, et enfin l'ADN est précipité par l'éthanol absolu à haute force ionique.

#### III-2.2 Mode d'emploi

L'ADN génomique a été extrait à partir d'échantillons de sang entier en utilisant le QIAamp® DNA Blood Midi Kit, Qiagen, Pays-Bas (Voir annexe 3), conformément aux recommandations et protocoles du fabricant. L'ADN fournit peut être utilisé en PCR et donne un rendement consistant et élevé. Le tissu est lysé enzymatiquement, la lyse cellulaire est suivie par la séparation de l'ADN des autres composants cellulaires et sa purification. Le QIAamp DNA mini kit (Qiagen) utilise des colonnes contenant des membranes de silice, qui sont capable de retenir l'ADN de manière spécifique en ajustant le pH et les conditions salines.

#### III-2.3 Protocole d'extraction d'ADN

Les échantillons doivent être portés à température ambiante (15-25°) avant utilisation Prépare un bain-Marie à 70 ° pour l'étape 3. Toutes les centrifugations se font à température ambiante.

- Dans un tube de centrifugeuse, nous avons mit 200 µl Protease (QIAGEN), et ajouter 2ml de sang, agiter brièvement, ajouter 2,4 ml de tampon AL et bien agiter au vortex 3 fois, 5 secondes chaque fois, puis incubé à 70 ° pendant 10 minutes (pour améliorer le rendement)
- Après avoir ajouter 2 ml d'éthanol (96-100%) à l'échantillon, et mélanger au vortex, Prélever et transférer la moitié de la solution obtenue (3,3 ml) vers la colonne du Qiamp midi placée dans un tube de centrifugation de 15 ml. fermer et centrifuger à 3000 rpm pendant 3 minutes.

## Matériels et Méthodes

---

- Retirer la colonne Qiap midi, enlever le filtrat puis replacer la colonne dans le tube de centrifuge de 15 ml .ajouter ce qui reste de la solution (3,3 ml) dans la colonne .fermer et centrifuger à 3000rpm pendant 3 minutes
- Ajouter 2 ml de tampon AW 1, fermer puis centrifuger à 5000rpm pendant une minute
- Ajouter 2 ml de tampon AW 2, fermer puis centrifuger à 5000rpm pendant quinze minutes
- Placer la colonne dans un tube à centrifugation de 15 ml propre, enlever le tube de collection contenant le filtrat et ajouter 300µl de tampon AE ou d'eau distillée portés à température ambiante 15-25°. Fermer et laisser incubé 5 minutes à température ambiante puis centrifuger à 5000 rpm pendant 5 minutes.

### III-2.4 Contrôle de la qualité de l'ADN

Le contrôle de la qualité de l'ADN se fait à l'aide d'un appareil le Nanodrop, qui permet de donner automatiquement la concentration, ainsi que le rapport du D.O 260nm/280 nm.

L'objectif de ce rapport est d'évaluer la qualité de notre échantillon d'ADN, ce rapport doit être compris entre 1,8 et 2. Une valeur inférieure à 1,8 indique une contamination par les phénols ou les protéines, alors qu'une valeur supérieure à 2 témoigne d'une contamination par les sels, dans ce cas un lavage à l'éthanol est nécessaire.

### III-3 Amplification de l'ADN génomique par PCR

#### III-3.1 Principe « Réaction de polymérisation en chaîne »

C'est une technique qui a été mise au point au milieu des années 80, par Kary Mullis (Prix nobel 1993). La PCR a pour but d'obtenir une grande quantité d'une séquence d'ADN connue, par réplication d'un échantillon sélectif de l'ADN. Ce n'est pas une analyse en soi, mais elle permet de mettre à disposition une quantité d'ADN suffisante pour la réalisation ultérieure des analyses nécessaires.

La PCR a ouvert une nouvelle voie dans l'étude et l'analyse des gènes. C'est une méthode d'amplification in vitro d'une séquence spécifique d'ADN. Cette méthode consiste à utiliser une paire d'amorces d'oligonucléotides de synthèse situés de part et d'autre de la séquence à amplifier.



## Matériels et Méthodes

---

Cette réaction nécessite :

- La molécule d'ADN : généralement sous forme de double brin, elle contient le fragment à amplifier.
- Des désoxyribonucléotides triphosphates ( dNTPs: ATP, GTP, CTP, TTP ). Qui sont les éléments de base utilisés par la taq polymérase pour synthétiser les brins d'ADN complémentaires.
- MgCl<sub>2</sub> (Chlorure de magnésium): L'ion Mg<sup>2++</sup> est un cofacteur essentiel de la Taq polymérase, il sert à stabiliser l'hybridation, plus sa concentration est importante plus l'hybridation est facilitée. La concentration du MgCl<sub>2</sub> doit être déterminée à chaque fois qu'un nouveau fragment est à amplifier. On réalise en général, pour optimiser la réaction de PCR, une gamme de MgCl<sub>2</sub>.
- Tampon: qui sert à tamponner le milieu réactionnel afin de garder un niveau optimal pour la Taq polymérase.
- Les amorces (sens et anti-sens) : encadrent la région à amplifier, de sorte que chaque brin nouvellement synthétisé s'étende au-delà de l'amorce sur le brin opposé, ce qui crée sur ces brins de nouveaux sites de fixation d'amorce. Chaque amorce contient 18 à 30 nucléotides, pour assurer la spécificité de l'hybridation. L'amorce ne peut contenir un nombre de nucléotides inférieur à 18, afin qu'il n'y ait pas de sites complémentaires dans les 3 milliards de bases de l'ADN. Leur composition en A, T, G et C doit être équilibrée (40% à 60%), et homogène sur la longueur de l'oligonucléotide. Les amorces sont complémentaires en séquence aux 2 extrémités de la région à amplifier.
- Taq polymérase : est une ADN polymérase thermorésistante extraite de la bactérie *Thermus aquaticus*. Sa température optimale d'action est de 72°C et elle est capable de résister à des passages successifs à 95°C, ce qui a rendu possible l'automatisation de la procédure. Elle présente une activité exonucléasique 5' à 3', c'est-à-dire de la fonction d'édition.
- Adjuvant de type DMSO: il est utilisé pour optimiser la réaction de PCR surtout lorsqu'il s'agit d'une séquence riche en bases GC difficile à dénaturer. Ce réactif améliore la dénaturation de deux brins en facilitant la rupture des liaisons hydrogènes reliant les deux brins de la molécule de l'ADN.
- H<sub>2</sub>O

## Matériels et Méthodes

### III-3.2 Les différentes étapes de la PCR

La réaction de la PCR se déroule en trois étapes (figure 12) :

- Dénaturation des séquences double brin à 94 °C pendant 30 secondes à 1 minute.
- Hybridation : la température est rapidement abaissée à la température optimale d'hybridation des amorces. Les amorces « reconnaissent » leurs séquences complémentaires sur les brins d'ADN cible. Elles s'hybrident chacune à son brin respectif. cette étape dure de 30 secondes à 1 min l'ADN total étant plus long n'aura pas le temps de se réhybrider.
- Extension des amorces : la température est ensuite augmentée à 72°C pendant 1 à 2 minutes, ce qui permet à la Taq polymérase d'ajouter des nucléotides aux amorces hybridées, dans le sens 5' vers 3'. Les nucléotides sont incorporés en fonction de la séquence cible (nucléotide complémentaire).

Enfin, on porte le mélange à 95°C pendant 20 secondes, de façon à ce que les courtes régions d'ADN double brin (un brin initial et un simple brin) se séparent. Ces molécules serviront à leur tour de matrice pour la prochaine synthèse. Ces trois étapes sont répétées plusieurs fois au bout de n cycles pour avoir finalement une quantité d'ADN de 2 n.

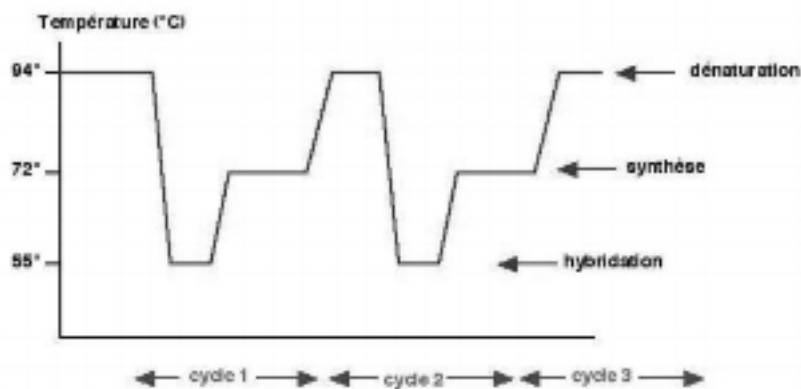


Figure 11: Les étapes de la réaction de la PCR

### III-3.3 Contrôle du produit de la PCR

Une fois la réaction de la PCR terminée, les produits de la PCR sont testés sur un gel d'agarose à 2% (2 g d'agarose dans 100 ml de TBE 1% et BET). Le pourcentage d'agarose varie selon la taille du fragment d'ADN à séparer.

On ajoute 8 µl de chaque produit de PCR à 2 µl de bleu de dépôt (0,25% de xylène de cyanol;0,25% de bleu de bromophénol et 30% de glycérol) qui permettra de suivre la migration. Cette dernière se fait par électrophorèse horizontale dans une cuve contenant le TBE 1X pendant

15 min (250A-160V) la lecture des résultats se fait dans le Gel DOC par le logiciel Quantity One.

### III-4 Séquençage de l'ADN

#### III-4.1 Principe : la méthode de Sanger

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre des nucléotides sur la molécule d'ADN. La méthode utilisée par Sanger en 1977 (prix Nobel de chimie en 1980), repose sur l'utilisation de nucléotides particuliers appelés didésoxyribonucléotides, qui bloquent la synthèse d'ADN par l'ADN polymérase après leur incorporation. Ce blocage est dû à l'impossibilité qu'ont ces nucléotides à former une liaison phosphodiester avec un autre nucléotide en raison de l'absence du groupement hydroxyle sur le carbone 3'.

Depuis 1977, la méthode de séquençage a considérablement évolué grâce à la mise au point de séquenceurs automatiques et de marquage des nucléotides à l'aide de fluorochromes. Elle est devenue aujourd'hui une technique rapide et fiable utilisée fréquemment dans le diagnostic des maladies héréditaires. Le fragment d'ADN à séquencer (il peut s'agir par exemple d'un exon du gène d'intérêt) est obtenu par PCR puis mis en présence d'un milieu réactionnel contenant :

- ✓ Les amorces
- ✓ Les 4 désoxyribonucléotides
- ✓ Les 4 didésoxyribonucléotides (ddA, ddT, ddC, ddG) marqués chacun par un fluorochrome distinct
- ✓ Une ADN polymérase (Taq polymérase)
- ✓ Le Tampon

L'ensemble est soumis à une succession de cycles de polymérisation au cours desquels l'ADN polymérase peut, au niveau de chaque nucléotide de l'ADN matrice, incorporer un désoxyribonucléotide ou un didésoxynucléotide. Dans le cas où elle incorpore un didésoxynucléotide, la synthèse s'arrête. On obtient donc des fragments de différentes tailles qui sont ensuite dénaturés puis migrés par électrophorèse capillaire afin d'être séparés. On peut ainsi reconstituer la séquence en analysant la nature du fluorochrome terminant chacun de ces fragments néosynthétisés, du plus petit au plus grand.

### III-4.2 Séquençage automatique

La détection des fragments par séquençage automatique est basée sur l'analyse des fragments marqués par des molécules fluorescentes (fluorescéine, NBD : 4-chloro-7- nitrobenzo-2oxa-1-diazole, rouge Texas et tétraméthylrhodamine). Les séquenceurs automatiques possèdent un laser infrarouge et un système de filtres tournants permettant à la fois l'excitation et l'émission des longueurs d'ondes des fluorochromes. Cette excitation provoque une émission de lumière à une longueur d'onde dépendant de la nature du fluorochrome porté par les didésoxynucléotides. Cette rotation des filtres est organisée de telle sorte qu'un fluorochrome particulier est détecté spécifiquement lors de chaque balayage par le laser du gel.

Au bout de quatre balayages successifs, un ensemble de données décrivant le contenu de chacune des pistes d'électrophorèse est ainsi obtenu. Dans la stratégie de notre étude, le séquençage automatique s'est avéré le moyen le plus précis et le plus rapide pour la recherche de nouvelles mutations.

### III-4.3 Purification produit PCR

Il est très important de bien purifier les produits PCR en éliminant les amorces et les dNTPs non incorporés lors de la réaction, afin d'obtenir une bonne qualité d'ADN à séquencer. En effet les résultats du séquençage en dépendent.

#### Mode d'emploi

- Mélanger 84µl de « DNA Binding Buffer » avec nos produits PCR.
- Mettre le mélange dans un spine en dessous d'un tube.
- centrifugation 14000tours /1min
- premier lavage : rajouter 200µl de « DNA Wash Buffer »
- deuxième lavage : rajouter 200ul de « DNA Wash Buffer »
- centrifugation 14000tours /1min
- Ajouter 10ul d'H<sub>2</sub>O stérile dans les spines
- Incuber 5 à 10 min à une température ambiante
- Centrifuger 14000tours /1min
- Récupérer les tubes et ajouter 30µl d'H<sub>2</sub>O

### III-4.4 Réaction de séquence

La réaction de séquence est réalisée en utilisant le produit de purification. C'est une amplification asymétrique de l'amplicon déjà purifié avec une seule amorce et les 4 ddNTPs (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) dont chacun est marqué par un fluorochrome émettant une couleur différente lors de l'excitation par le laser. Ainsi chacun de ces ddNTPs va donner de façon aléatoire des fragments de tailles différentes et correspondantes aux 4 couleurs spécifiques.

La réaction de séquence est effectuée par le BigDay Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Inc). Ses constituants sont donnés dans le tableau 1, et ses conditions en tableau 2

**Tableau 1: Composants de la réaction de séquence**

Composant	Concentration	Volume
ADN (Produit PCR)	35ng/ul	3ul
Amorce (sens ou antisens)	1pm/ul	0.2ul
BigDay	-	2ul
Buffer	-	3ul
Eau stérile	-	11.8ul

**Tableau 2: Conditions de la réaction de séquence**

Etape	Température	Temps	
Dénaturation initiale	96	1min	
Dénaturation	96	10sec	27 Cycles
Hybridation	Tm	10sec	
Elongation	60	4min	
Elongation finale	15		

### III-4.5 Purification des produits de réaction de séquence par le Magnésil

Les produits obtenus après une réaction de séquence vont être purifiés par le Magnésil. Les étapes de la purification sont les suivantes :

- Déposer les produits dans une plaque

## Matériels et Méthodes

---

- Ajouter 180 µl de Magnésil tout en agitant
- Incuber 2 min 30 sec à une température ambiante
- Agiter de nouveau
- Incuber 2 min 30 sec
- Mettre la plaque sur la barre magnétique (promega)
- Eliminer le surnageant
- Ajouter 100µl d’Ethanol 90% en agitant
- Incuber 2 min 30 sec
- Agiter de nouveau
- Incuber 2 min 30 sec
- Agiter de nouveau
- Mettre la plaque sur la barre magnétique (promega)
- Eliminer le surnageant
- Ajouter 100µl d’Ethanol 90% en agitant
- Incuber 2 min 30 sec
- Agiter de nouveau
- Incuber 2 min 30 sec
- Agiter de nouveau
- Mettre la plaque sur la barre magnétique et éliminer le surnageant
- Incuber 15min
- Ajouter 20µl de Formamide
- Incuber 5min
- Mettre la plaque sur la barre magnétique (promega)
- Récupérer le surnageant et le mettre dans la plaque du séquenceur et on séquence par un séquenceur capillaire (ABI Prism 3130xl).

### III-4.6 Analyse des séquences

Les résultats obtenus sont traités par deux logiciels : **Amplicon Variant Analyser (AVA)** ; versions 2.3 et 2.5.3 (Roche), et **SeqNext (JSI Medical systems)**

## Références bibliographiques

---

1. **Abbass S., Bennis K., Znati Y., Akasbi J K., El mesbahi., Amarti.** (2011)  
Le profil épidémiologique et biologique du cancer du sein à fès-Boulemane.EMHJ ;17-12
2. **Anglian Breast cancer study group.** (2000)  
Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of breast cancer cases. Anglian Breast Cancer Study Group. Br J Cancer. ;83(10):1301-8.
3. **Antoniou A.C., Gayther S.A., Stratton J.F., Ponder B.A., Easton D.F.** (2000)  
Risk models for familial ovarian and breast cancer. Genet Epidemiol.;18(2):173-90.
4. **Antoniou A.C., Pharoah P.D., McMullan G., Day N.E., Ponder B.A., Easton D.** (2001)  
Evidence for further breast cancer susceptibility genes in addition to BRCA1 and BRCA2 in a population-based study. Genet Epidemiol.;21(1):1-18.
5. **Antoniou A.C., Pharoah P.D., McMullan G., Day N.E., Stratton M.R., Peto J., Ponder B.J., Easton D.F.** (2002)  
A comprehensive model for familial breast cancer incorporating BRCA1, BRCA2 and other genes. Br J Cancer.;86(1):76-83.
6. **Antoniou A., Pharoah P.D., Narod S., Risch H.A., Eyfjord J.E., Hopper J.L., Easton D.F., et al.** (2003)  
Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. Am J Hum Genet.;72(5):1117-30.
7. **Armour J.A., Sismani C., Patsalis P.C., Cross G.** (2000)  
Measurement of locus copy number by hybridization with amplifiable probes. Nucleic Acids Res.;28(2):605-9.
8. **Balmain A., Gray J., Ponder B.** (2003)  
The genetics and genomics of cancer.Nat Genet.;33 Suppl:238-44.
9. **Bendib., Bignon., Abdelouahab., Urhammer., Chaer.** (2008)  
Genetic breast cancer mutation in Algeria results and clinical analysis through 63 cases.
10. **Bertwistle D., Swift S., Marston N.J., Jackson L.E., Crossland S., Crompton M.R., Marshall C.J., Ashworth A.** (1997)  
Nuclear location and cell cycle regulation of the BRCA2 protein. Cancer Res.;57(24):5485-8.
11. **Bieche I., Lidereau R.** (1999)  
Increased level of exon 12 alternatively spliced BRCA2 transcripts in tumor breast tissue compared with normal tissue. Cancer Res.;59(11):2546-50.
12. **Bochar D.A., Wang L., Beniya H., Kinev A., Xue Y., Lane W.S., Wang W., Kashanchi F., Shiekhattar R.** (2000)  
BRCA1 is associated with a human SWI/SNF-related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer. Cell.;102(2):257-65.

## Références bibliographiques

---

13. **Bork P., Blomberg N., Nilges M.** (1996)  
Internal repeats in the BRCA2 protein sequence. *Nat Genet.*;13(1):22-3.
14. **Callebaut I., Mornon J.P.** (1997)  
From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair. *FEBS Lett.*;400(1):25-30.
15. **Chapman M.S., Verma I.M.** (1996)  
Transcriptional activation by BRCA1. *Nature.*;382(6593):678-9.
16. **Chen C.F., Li S., Chen Y., Chen P.L., Sharp Z.D., Lee W.H.** (1996)
17. The nuclear localization sequences of the BRCA1 protein interact with the importin-alpha subunit of the nuclear transport signal receptor. *J Biol Chem.*;271(51):32863-8.
18. **Chen J., Silver D.P., Walpita D., Cantor S.B., Gazdar A.F., Tomlinson G., Couch F.J., Weber B.L., Ashley T., Livingston D.M., Scully R.** (1998)  
Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells. *Mol Cell.*;2(3):317-28.
19. **Claus E.B., Risch N.J., Thompson W.D.** (1990)  
Age at onset as an indicator of familial risk of breast cancer. *Am J Epidemiol.*;131(6):961-72.
20. **Couch F.J., Deshano M.L., Blackwood M.A., et al.** (1997)  
BRCA 1 mutation in women attending clinics that evaluate the risk of breast cancer. *N Engl J Med*; 20:1409-1415.
21. **Ford D., Easton D.F., Bishop D.T., et al.** (1994)  
Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Lancet* ;343(8899):692-5.
22. **Ford D., Easton D.F., Bishop D.T., Narod S.A., Goldgar D.E.** (1994)  
Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Lancet.* ;343(8899):692-5.
23. **Ford D., Easton D.F., Stratton M., Narod S., Goldgar D., Devilee P., Bishop D.T., Weber B., Lenoir G.; et al.** (1998)  
Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet.*;62(3):676-89.
24. **Fuks F., Milner J., Kouzarides T.** (1998)  
BRCA2 associates with acetyltransferase activity when bound to P/CAF. *Oncogene.* 12;17(19):2531-4.
25. **Hakem R., de la Pompa J.L., Sirard C., Mo R., Woo M., Hakem A., Wakeham A., Potter J., Reitmair A., Billia F., Firpo E., Hui C.C., Roberts J., Rossant J., Mak T.W.** (1996)  
The tumor suppressor gene *Brcal* is required for embryonic cellular proliferation in the mouse. *Cell.*;85(7):1009-23.
26. **Hemminki K., Eng C.** (2004)  
Clinical genetic counselling for familial cancers requires reliable data on familial cancer risks and general action plans. *J Med Genet* ;41(11):801-7.



## Références bibliographiques

---

- 27. Hopper JL, Southey MC, Dite GS, Jolley DJ, Giles GG, McCredie MR, Easton DF, Venter DJ. (1999)**  
Population-based estimate of the average age-specific cumulative risk of breast cancer for a defined set of protein-truncating mutations in BRCA1 and BRCA2. Australian Breast Cancer Family Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* Sep;8(9):741-7
- 28. Houlston R.S., Peto J. (2004)**  
The search for low-penetrance cancer susceptibility alleles. *Oncogene* ;23(38):6471-6.
- 29. Hu Y.F., Miyake T., Ye Q., Li R. (2000)**  
Characterization of a novel trans-activation domain of BRCA1 that functions in concert with the BRCA1 C-terminal (BRCT) domain. *J Biol Chem.*;275(52):40910-5.
- 30. Huyton T., Bates P.A., Zhang X., Sternberg M.J., Freemont P.S. (2000)**  
The BRCA1 C-terminal domain: structure and function. *Mutat Res.*;460(3-4):319-32.
- 31. Kerr P., Ashworth A. (2001)**  
New complexities for BRCA1 and BRCA2. *Curr Biol* 11, R668-76.
- 32. Koonin E.V., Altschul S.F., Bork P. (1996)**  
BRCA1 protein products ... Functional motifs...*Nat Genet.*;13(3):266-8.
- 33. Lu M., Conzen S.D., Cole C.N., Arrick B.A. (1996)**  
Characterization of functional messenger RNA splice variants of BRCA1 expressed in nonmalignant and tumor-derived breast cells. *Cancer Res.*;56(20):4578-81
- 34. Marc W .Y., et al. (2005)**  
Caractérisation des segments de la région centrale du gène BRCA1: un échafaudage intrinsèquement désordonnés de multiples interactions protéine-protéine et protéine-ADN *J Mol Biol* 345, 275-87.
- 35. Marmorstein L.Y., Kinev A.V., Chan G.K., Bochar D.A., Beniya H., Epstein J.A., Yen T.J., Shiekhatar R. (2001)**  
A human BRCA2 complex containing a structural DNA binding component influences cell cycle progression. *Cell.*;104(2):247-57.
- 36. Miki Y., Swensen J., Shattuck-Eidens D., Futreal P.A, Harshman K., Tavtigian S., Liu Q., Cochran C., Bennett L.M., Ding W., et al. (1994)**  
A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science.*;266(5182):66-71.
- 37. Milner J., Ponder B., Hughes-Davies L., Seltmann M., Kouzarides T. (1997)**  
Transcriptional activation functions in BRCA2. *Nature.*;386(6627):772-3.
- 38. Miki Y., et al. (1994)**  
A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266, 66-71 .
- 39. Newman B., Austin M.A., Lee M., et al. (1998)**  
Inheritance of human breast cancer: évidence for autosomal dominant transmission in high-risk families. *Proc Natl Acad Sci U S A* ;85(9):3044-8.
- 40. Newman, B., Millikan, R.C., King, M.C. (1997)**  
Genetic epidemiology of breast and ovarian cancers. *Epidemiol Rev* 19, 69-79 .
- 41. OMS.2013** Communiqué de presse n°223.2013.
- 42. Orban T.I., Olah E. (2003)**  
Emerging roles of BRCA1 alternative splicing. *Mol Pathol.*;56(4):191- 7.

## Références bibliographiques

---

- 43. Oros KK, Ghadirian P, Greenwood CM, et al. (2004)**  
Significant proportion of breast and/or ovarian cancer families of French Canadian descent harbor 1 of 5 BRCA1 and BRCA2 mutations. *Int J Cancer* ;112(3):411-9
- 44. Rodriguez J.A., Henderson B.R. (2000)**  
Identification of a functional nuclear export sequence in BRCA1. *J Biol Chem.* 275(49):38589-96 (Antoniou et al – *Am. J. Hum. Genet.* 2003 ; 72 :117-30.
- 45. Paluch-Shimon , Ido Wolf I, Sadetzki S *et al.* (2010)**  
Association between very young age and adverse characteristics of breast cancer at presentation amongst israeli women. *Am J Clin Oncol* [Epub ahead of print].
- 46. Parmigani G., Berry D., Aguilar O. (1998)**  
Determining carrier probabilities for breast cancer –susceptibility genes BRCA1 and BRCA 2. *Am Hum Genet*;1:145-158.
- 47. Peto J., Collins N., Barfoot R., Seal S., Warren W., Rahman N., Easton D.F., Evans C., Deacon J., Stratton M.R. (1999)**  
Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in patients with early-onset breast cancer. *J Natl Cancer Inst.*;91(11):943-9.
- 48. Pharoah P.D., Dunning A.M., Ponder B.A., *et al.* (2004)**  
Association studies for finding cancer-susceptibility genetic variants. *Nat Rev Cancer* ;4(11):850-60.
- 49. Pharoah P.D., Antoniou A., Bobrow M., *et al.* (2002)**  
Polygénie susceptibility to breast cancer and implications for prévention. *Nat Genét* ;31(1):33-6.
- 50. Scully R., Anderson S.F., Chao D.M., Wei W., Ye L., Young R.A., Livingston D.M., Parvin J.D. (1997)**  
BRCA1 is a component of the RNA polymerase II holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;94(11):5605-10.
- 51. Shattuck-Eidens D.,Oliphant A., McClure M., *et al.* (1997).**  
BRCA1 sequence analysis in women at high risk for susceptibility mutations.Risk factor analysis and implications for genetic testing *JAMA*, 15:1242-1250.
- 52. Spain B.H., Larson C.J., Shihabuddin L.S., Gage F.H., Verma I.M. (1999)**  
Truncated BRCA2 is cytoplasmic: implications for cancer-linked mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;96(24):13920-5.
- 53. Sobol H., Bignon Y. J., Bonaiti, C., Cuisenier J., Lasset C., Lortholary A., Nogues C., Stoppa-Lyonnet, D., Eisinger F., and the french Cooperative Network/Groupe Génétique et Cancer de la FNCLCC. (1999)**  
Four years analysis of cancer genetic clinics activity in France from 1994 to 1997: a survey on 801 patients. *Dis Markers* . 15: 15-29.
- 54. Sobol H. Bignon Y, Eisinger F. Birnbaum D, Fervers B. (1994)**  
Génétique et cancer du sein. *Ann Chir* pp 303 – 308.
- 55. Sobol H., Mazoyer S., Smith S., *et al.* (1993)**  
Familial ovarian carcinoma: pedigree studies and preliminary results from linkage analysis. *Bull Cancer* 80: 121-134.

## Références bibliographiques

---

- 56. Sobol H., Mazoyer S., Stoppa-Lyonnet D., Bignon Y. (1992)**  
Prédisposition génétique au cancer. *Lett cancer* 1: 59-66.
- 57. Stoppa Lyonnet D, Aurias A. (1992)**  
Ataxie telangiectasie: quel impact en cancérologie clinique *Bull Cancer* 79: 645-650 .
- 58. Stoppa Lyonnet D, Essioux L, Thomas G. Bonaiti-Pellié C. (1995)**  
Prédispositions génétiques au cancer du sein. *Méd Thérap* 1: 327-335.
- 59. Thakur S., Zhang H.B., Peng Y., Le H., Carroll B., Ward T., Yao J., Farid L.M., Couch F.J., Wilson R.B., Weber B.L. (1997)**  
Localization of BRCA1 and a splice variant identifies the nuclear localization signal. *Mol Cell Biol.*;17(1):444-52.
- 60. Thompson D., Easton D.F; Breast Cancer Linkage Consortium. (2002)**  
Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst.*;94(18):1358-65.
- 61. Thompson D., Szabo C.I., Mangion J., Oldenburg R.A., Odefrey F., Seal S., *et al.* (2002c )**  
Evaluation of linkage of breast cancer to the putative BRCA3 locus on chromosome 13q21 in 128 multiple case families from the Breast Cancer Linkage Consortium. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;99(2):827-31.
- 62. Uhrhammer N, Abdelouahab A, Lafarge L *et al.* (2008)**  
BRCA1 mutations in algerian breast cancer patients: high frequency in young, sporadic cases. *Int J Med Sci* ;5:197-202.
- 63. Venkitaraman A.R. (2002)**  
Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell.*;108(2):171-82.
- 64. Venkitaraman A.R. (2001a)**  
Chromosome stability, DNA recombination and the BRCA2 tumour suppressor. *Curr Opin Cell Biol.*;13(3):338-43.
- 65. Wang Q., Zhang H., Fishel R., Greene M.I. (2000)**  
BRCA1 and cell signaling. *Oncogene.*;19(53):6152-8.
- 66. Wang Y., Cortez D., Yazdi P., Neff N., Elledge S.J., Qin J. (2000)**  
BASC, a super complex of BRCA1- associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev.*;14(8):927-39..
- 67. Welsh P.L., King M.C. ( 2001 )**  
BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet*;10(7):705-13.
- 68. Welsh P.L., Owens K.N., King M.C., (2000)**  
Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. *Trends Genet*, **16**, 69-74. Friend 1995, BIC database, (<http://research.nhgri.nih.gov/bic/>)
- 69. Wilson C.A., Payton M.N., Elliott G.S., Buaas F.W., Cajulis E.E., Grosshans D., Ramos L., Reese D.M., Slamon D.J., Calzone F.J. (1997)**  
Differential subcellular localization, expression and biological toxicity of BRCA1 and the splice variant BRCA1-delta11b. *Oncogene.*;14(1):1 16.

## Références bibliographiques

---

- 70. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G *et al.* (1995)**  
Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature.*;378(6559):789-92.
- 71. Wooster R., Neuhausen S.L., Mangion J., Quirk Y., Ford D., Collins N., Nguyen K., Seal S., Tran T., Averill D., *et al.* (1994)**  
Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science.* ;265(5181):2088-90.
- 72. Xu C.F., Brown M.A., Nicolai H., Chambers J.A., Griffiths B.L., Solomon E. (1997)**
- 73.** Isolation and characterisation of the NBR2 gene which lies head to head with the human BRCA1 gene. *Hum Mol Genet.*;6(7):1057-62.
- 74. Xu C.F., Chambers J.A., Nicolai H., Brown M.A., Hujeirat Y., Mohammed S., Hodgson S., Kelsell D.P., Spurr N.K., Bishop D.T., Solomon E. (1997)**  
Mutations and alternative splicing of the BRCA1 gene in UK breast/ovarian cancer families. *Genes Chromosomes Cancer.*;18(2):102-10
- 75. Yarden R.I, Brody L.C. (1999)**  
BRCA1 interacts with components of the histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;96(9):4983-8.
- 76. Yarden R.I., Pardo-Reoyo S., Sgagias M., Cowan K.H., Brody L.C.( 2002)**  
BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. *Nat Genet.*;30(3):285-9
- 77. Zou J.P., Hirose Y., Siddique H., Rao V.N., Reddy E.S.( 1999)**  
Structure and expression of variant BRCA2a lacking the transactivation domain. *Oncol Rep.*;6(2):437-40.

## II- Généralités

Les progrès récents de la génétique moléculaire ont permis de passer des modèles mathématiques de la cancérogenèse proposés dans les années cinquante, à une réalité biologique. On sait maintenant que le cancer est une maladie de l'ADN qui résulte de l'accumulation d'événements mutationnels successifs: des mutations germinales ou acquises altèrent le fonctionnement normal de certains gènes.(Sabol *et al.*, 1999).

### II-1 Le cancer, processus multi-étapes

Les cellules de l'organisme sont programmées pour se multiplier, croître, se différencier, puis mourir en réponse à un système complexe de signaux régis par le cycle cellulaire. Mais lors de la cancérogenèse, il y a rupture des contraintes normales de la croissance cellulaire, aboutissant à la prolifération anormale et anarchique d'un clone cellulaire particulier. Ce dernier, présente une autonomie vis à vis des facteurs régulant le cycle cellulaire, échappement à l'apoptose, pouvoir répliatif illimité, activation de l'angiogenèse, pouvoir métastatique et instabilité génétique (Hanahan *et al.*,2000). Les événements génétiques et épigénétiques durant ce processus multi-étapes touchent une multitude de gènes, dont les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur.

Durant la tumorigenèse, les proto-oncogènes ont une action stimulatrice sur la division cellulaire, mais leur expression est soumise à une régulation fine durant le cycle cellulaire. Ils sont activés en oncogènes par des amplifications géniques (des translocations chromosomiques ou des mutations ponctuelles) qui peuvent provoquer leur surexpression. Ils échappent alors à leur système de régulation. Leur mode d'action est dominant car il suffit qu'un seul des deux allèles soit muté pour que leur action puisse s'exercer (Stewart *et a.* ;/ 2003).

Un gène suppresseur de tumeur est un gène dont l'altération durant la carcinogenèse résulte de la perte de fonction essentielle pour le contrôle de la prolifération cellulaire normale. Cette perte de fonction est un mécanisme récessif, c'est à dire que les deux allèles du gène doivent être inactivés. Cette inactivation peut être due à la perte des allèles du gène, à des petites délétions ou insertions, à des mutations ponctuelles cruciales pour l'activité de la protéine ou à la baisse de la transcription par l'altération du promoteur.

Récemment, les gènes suppresseurs de tumeur ont été classés selon leurs fonctions :

- les « **gatekeepers** », intervenant dans le contrôle du déroulement du cycle cellulaire,
- les« **caretakers** » qui interviennent pour maintenir l'intégrité du cycle cellulaire.

L'inactivation du gène ne conduit pas à l'initiation d'une tumeur mais à une instabilité génétique, qui accélère l'accumulation de mutations dans d'autres gènes, favorisant ainsi le développement de tumeurs (Kinzler *et al.*, 1997).

### II-2 Anatomie du sein

Le sein est une glande productrice de lait comprenant un tissu glandulaire (mammaire), des tissus fibreux et adipeux situés entre les lobes et lobules glandulaires, des vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que des nerfs. Le tiers du tissu mammaire se compose de graisse et de tissu conjonctif et les deux tiers se composent de canaux et de lobules. Le lait est produit dans les 15-20 lobules et est conduit aux 5-9 orifices mamelonnaires par les canaux.

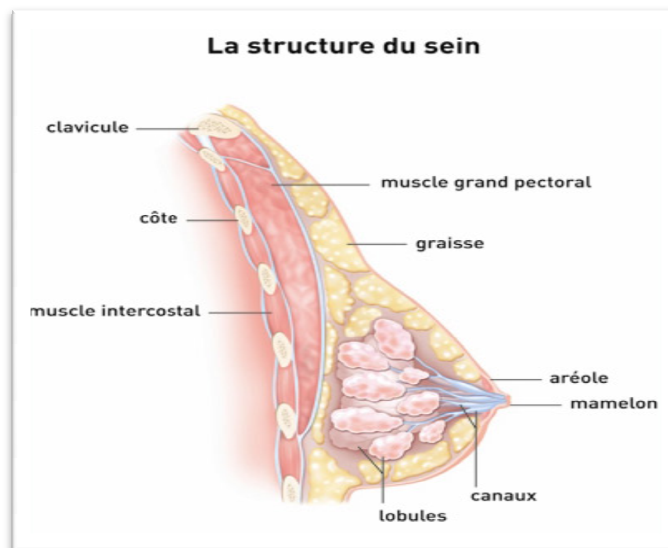


Figure 1 : schéma d'une coupe sagittale représentant l'anatomie du sein normal (Gauthier, 2012)

### II-3 Cancer du sein

Les cancers du sein prennent naissance dans les tissus glandulaires (épithélium) du sein et sont appelés adénocarcinomes. Les cellules néoplasiques peuvent se développer dans les canaux galactophores (carcinome canalaire) ou dans les lobules glandulaires (carcinome lobulaire). Il existe différentes formes de cancer du sein, chacune ayant une évolution qui lui est propre :

- **Le carcinome canalaire** est le cancer du sein le plus fréquent, il représente environ 70% des cas, et se développe aux dépens des canaux galactophores.
- **Le carcinome lobulaire** regroupe 10% des cas. Il se développe à partir de l'épithélium des lobules.

- Ces deux types de cancer (carcinome canalaire et lobulaire) peuvent se présenter sous la forme *in situ* (localisé) ou *Infiltrant* (invasive) ; disséminer par voie lymphatique vers les ganglions ou par voie hémotogène vers d'autres parties du corps, pour former des tumeurs secondaires ou métastases.
- *Les carcinomes médullaires, colloïdes ou tubulaires*; des cancers à évolution lente que l'on détecte au microscope, ils constituent environ 12% des cas.
- *Le carcinome inflammatoire* représente environ 1% à 4% des cas, il est le cancer du sein le plus agressif et le plus difficile à traiter parce qu'il se propage rapidement.  
(Abbas *et al.*, 2011)

### II-3.1 La classification histopathologique

Les études histologiques ont montré que le type histologique prédominant des tumeurs était le carcinome canalaire infiltrant (CCI) dans 87,8% des cas, suivi du carcinome lobulaire infiltrant (CLI 4,7%), puis le carcinome métaplasique (2,4%) et le carcinome médullaire (2%). Les trois critères (taille de la tumeur, atteinte ou non des ganglions lymphatiques, présence ou non de métastases) permettant de définir le stade du cancer selon la classification **TNM** qui signifie en anglais « **Tumor, Nodes, Metastasis** » soit « tumeur, ganglions, métastases ». (Abbas *et al.*, 2011)

En fonction des caractéristiques observées lors de l'examen, une annotation par lettre ou par chiffre est portée pour T, N ou M :

- Tx pour la taille de la tumeur ;
- Nx à N2 pour le degré d'envahissement des ganglions ;
- Mx, M0 et M1 pour la présence ou non de métastases à distance.

### II-3.2 Cancer du sein et facteurs de risque

De nombreux facteurs de risque intervenant dans la cancérogenèse mammaire ont pu être identifiés : facteurs environnementaux, antécédents familiaux, affections bénignes du sein, facteurs nutritionnels, métabolisme lipidique, hormones stéroïdes.

La recherche étiologique du cancer du sein s'est orientée vers des facteurs liés à la vie reproductive et à la maturité sexuelle. Le risque de développer un cancer du sein augmente avec des règles précoces (avant 12 ans), une ménopause tardive (après 55ans) due à une durée d'exposition aux œstrogènes plus longue. De plus, une première grossesse tardive accroît ce risque, (Keen *et al.*, 2003). Par ailleurs, des facteurs environnementaux augmenteraient le risque de cancer du sein ; comme une exposition aux radiations ionisantes, et des facteurs liés



au mode de vie (régime alimentaire riche en graisses, carbohydrates et protéines animales, absence d'activité physique). Toutefois, tous ces facteurs de risque sont moindres par rapport à une histoire familiale, qui reste le facteur de risque le plus important de développer un cancer du sein. L'augmentation du risque dépend du nombre de personnes atteintes dans la famille, du degré de parenté, et de l'âge au diagnostic. (Claus *et al.*, 1990).

### II-4 Epidémiologie

Dans le monde, le cancer du sein touche les deux sexes avec une nette prédominance féminine. Les hommes peuvent être touchés rarement avec moins de 1% des cas (Sasco *et al.*, 1993). Depuis les dernières estimations pour 2008, l'incidence a augmenté de plus de 20%, et la mortalité de 14%. Il est en particulier de plus en plus fréquent dans le pays en développement où la majorité des cas sont diagnostiqués à des stades avancés. (GLOBOCAN 2012, OMS.2013).

En Occident, une femme sur 8 développera un cancer du sein au cours de sa vie. En Afrique du nord et au Moyen-Orient, le cancer du sein est le premier cancer chez la femme. Son évolution est de 10 à 42% par rapport à aux cancers féminins, avec une augmentation plus importante en terme d'incidence et de stabilité, faute de détection précoce et d'accès aux traitements (Belkacemi *et al.*, 2010). En 2008, le nombre de cas est estimé à plus de 1.4 millions de nouveau cas de femmes atteintes avec 460 000 décès. Ce chiffre atteindrait les 12 millions d'ici 2030.(OMS. 2008). En Algérie, l'incidence globale de ce cancer est de 100/105 habitants à 120/105 habitants. (Mahnane *et al.*,2012)

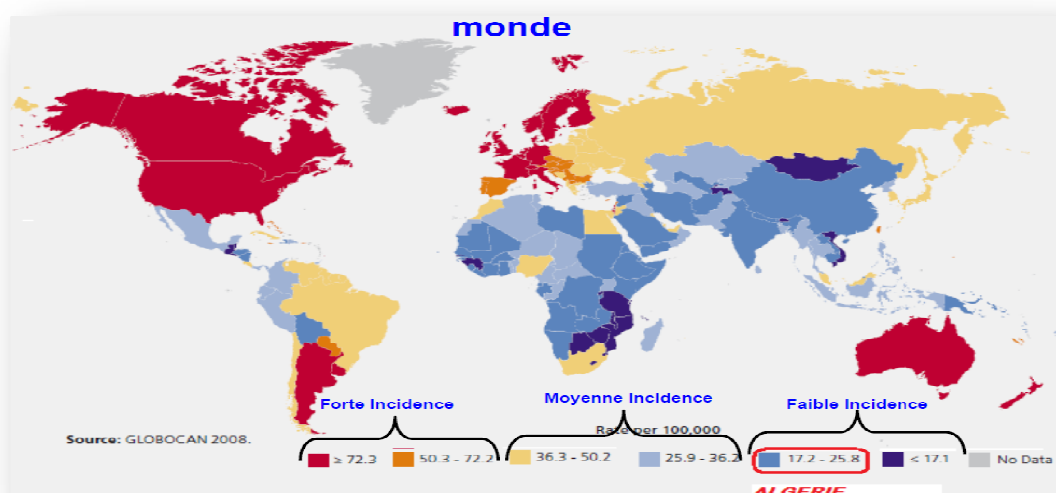


Figure 2 : répartition du taux d'incidence standardisé du cancer du sein dans le monde. (Mahnane *et al.*, 2012)



### II-5 Génétique des cancers du sein

La mise en évidence d'une prédisposition au cancer n'est pas toujours aisée. Une fréquence élevée de cancers du sein au sein d'une même famille suggère une éventuelle prédisposition, due vraisemblablement à l'altération d'un gène majeur, et cela d'autant plus si le type de cancer est rare ou si les tumeurs surviennent à un âge précoce.

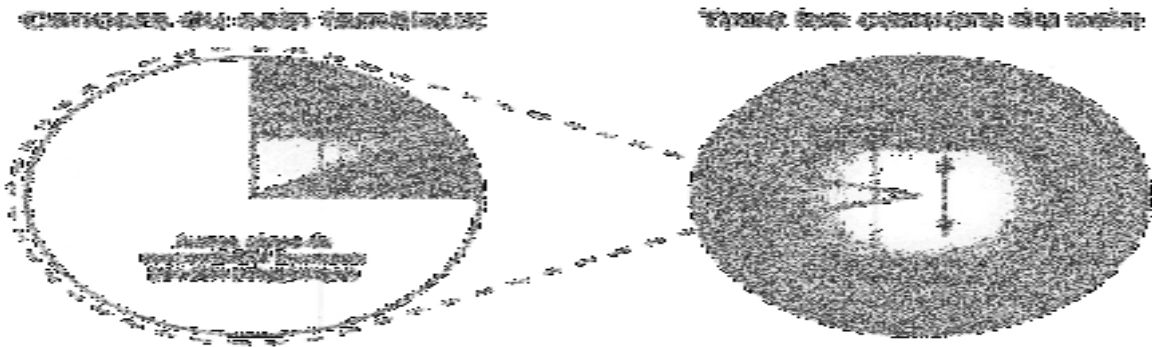
#### II-5.1 Formes sporadiques, familiales et héréditaires des cancers du sein

La plupart des modifications génétiques surviennent de façon spontanée (mutations sporadiques) et ne sont pas transmises par l'un ou l'autre des parents. Les qualificatifs familiaux et héréditaires, sans être synonymes, renvoient à la notion d'un risque de cancer accru au sein d'une famille.

La forme familiale d'un cancer consiste en la simple concentration de cas de la maladie au sein d'une famille. Parmi ces cas familiaux, une partie serait attribuable à des concentrations familiales fortuites de cette maladie. D'autres facteurs encore inconnus pourraient être responsables de certaines concentrations familiales de cancer du sein, tels que des conditions environnementales auxquelles des noyaux familiaux sont exposés, (Hemminki *et al.*, 2004, Pharoah *et al.*, 2004).

Pour ce qui est du cancer à caractère héréditaire, il s'agit d'un sous-groupe de maladies familiales dont le profil de distribution est régi par la loi de Mendel sur la transmission héréditaire des gènes de prédisposition, ont la transmission est autosomique dominante (Newman *et al.*, 1988 ).

Des études de liaisons génétiques ont mis en évidence l'existence de plusieurs gènes de prédisposition au cancer du sein. Deux gènes majeurs de prédisposition au cancer du sein ont été localisés et isolés par clonage positionnel. Ce sont les gènes suppresseurs de tumeur **BRCA1 (BR**east **C**Ancer 1) (Miki *et al.*, 1994) et **BRCA2 (BR**east **C**Ancer 2) (Wooster *et al.*, 1995, Tavtigian *et al.*, 1996), localisés respectivement sur les chromosomes **17q21-1** et **13q12-13**



Le cancer du sein familial (cercle de gauche) représente seulement 5 à 10% de tous les cancers du sein (cercle de droite). *BRCA1* et *BRCA2* contribuent à environ 20% des cancers du sein familiaux

Des mutations, dans ces deux gènes, sont responsables de 15 à 20% des cancers du sein familiaux et de 40 à 60% des cancers de l'ovaire familiaux. Alors que d'autres gènes tels que *TP53*, *ATM* et *PTEN* seraient responsables de moins de 5% des cas familiaux de cancer du sein et que les 75% restants seraient expliqués par un modèle polygénique impliquant une multitude de variations génétiques, (Houlston *et al.*, 2004. Pharoah *et al.*, 2002) .

### II-5.2 Estimation du risque tumoral induit par les mutations BRCA

Dans le cas de mutation BRCA, le risque d'avoir un cancer du sein à 70 ans est de 40 à 85% contre 10% dans la population générale, et le risque en fonction du gène touché est de 65% pour *BRCA1* et 45% pour *BRCA2*. Par contre avant 45 ans le risque est estimé à 25% pour *BRCA1* et 7% pour *BRCA2*. (Antoniou *et al.*, 2003)

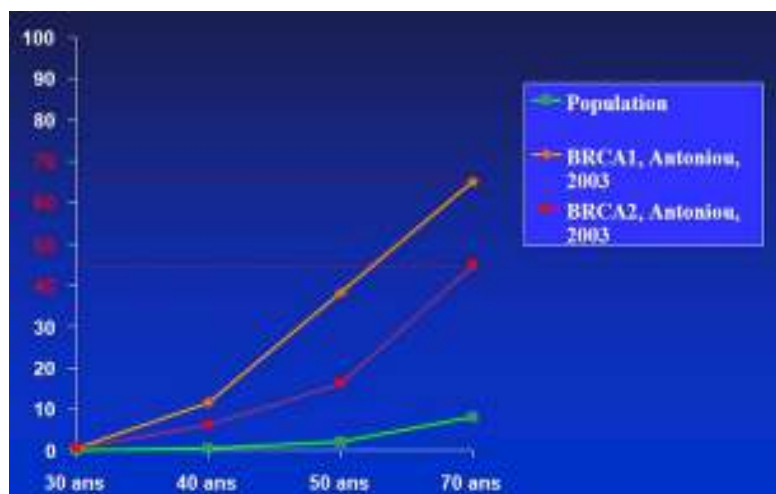


Figure 4: Risque en fonction de l'âge de cancer du sein chez les porteuses de mutations des gènes BRCA. (Antoniou *et al.*, 2003)

### II-6 Caractérisation des gènes BRCA1 et BRCA2

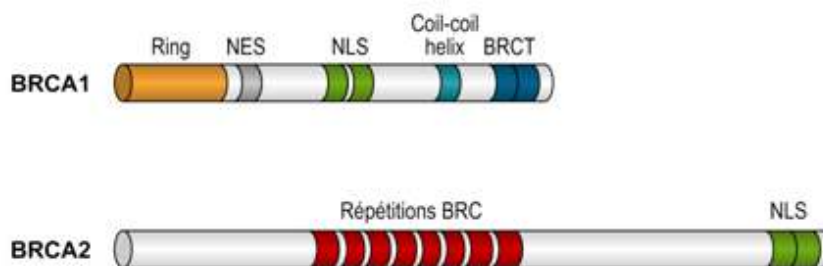


Figure 5 : Structure des gènes BRCA (Kerr *et al.*, 2001)

#### II-6.1 Structure du gène et du transcrit BRCA1

Le gène BRCA1 est localisé sur le chromosome 17q21-1. Il est constitué de 23 exons répartis sur 81 kb d'ADN, dont 22 sont codants. La caractéristique de BRCA1 est la présence d'un grand exon central, l'exon 11 de 3 426 pb, qui représente 60% de la séquence codante. La taille des autres exons varie de 41 à 311 pb. Les introns quant à eux représentent 91% de la séquence du gène, et comportent de nombreuses séquences répétées, dont 42% sont de type Alu. BRCA1 est ainsi l'un des plus riches gènes humains en séquence Alu, il est localisé «tête-bêche» avec le gène NBR2 (Near BRCA1 gene 2) partageant avec lui un promoteur bidirectionnel de 218 pb dans la région intergénique (Xu *et al.*, 1997).

Le gène BRCA1 code pour une phosphoprotéine de 1 863 acides aminés. Différentes études ont mis en évidence l'existence de divers transcrits résultant d'un épissage alternatif (Miki *et al.*, 1994, Takur *et al.*, 1997, Lu *et al.*, 1996, Orban *et al.*, 2003). Ils sont exprimés de façon ubiquitaire aussi bien dans les cellules épithéliales mammaires que dans les lignées cellulaires dérivées de tumeurs du sein.

#### II-6.2 Domaines fonctionnels de BRCA1

De nombreux domaines, ayant des fonctions différentes, ont été identifiés au niveau de la séquence de BRCA1 :

- un domaine RING finger, ou domaine en doigt de zinc à l'extrémité amino terminale (Miki *et al.*, 1994). Région riche en résidus cystéine et histidine, pouvant lier des ions zinc. Il serait impliqué au niveau de différentes interactions protéines/protéines ;
- 2 domaines BRCT (BRCA1 C Terminus) à l'extrémité carboxy terminale, s'étendant sur les résidus aminés 1 646 à 1 859. Il s'agit d'un motif d'acides aminés, (Koonin *et al.*, 1996,

Callebaut *et al.*, 1997). Ils interviendraient au niveau des interactions protéines/protéines et dans la réponse aux dommages de l'ADN (Huyton *et al.*, 2000) ;

- 2 domaines de signalisation de localisation nucléaire NLS (Nuclear Localization Sequences) (Thakur *et al.*, 1997, Chen *et al.*, 1996) ;

- un domaine d'exportation nucléaire NES (Nuclear Export Sequence) à proximité de l'extrémité amino terminale. Ce domaine faciliterait l'exportation de la protéine du noyau vers le cytoplasme par un mécanisme dépendant d'un récepteur d'export nucléaire (Rodriguez *et al.*, 2000).

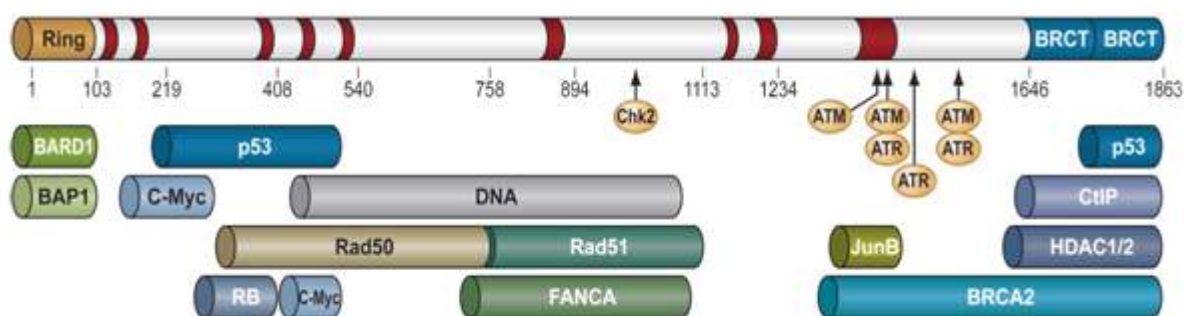


Figure 6 : Représentation schématique de la séquence primaire de BRCA1 (Mark, 2005)

### II-6.3 Structure du gène et du transcrit BRCA2

Le gène BRCA2 se trouve sur le chromosome 13q12-13. Il est constitué de 27 exons, dont 26 sont codants, répartis sur 84 kb d'ADN. Deux exons centraux de grandes tailles (les exons 10 de 1 116 pb et 11 de 4 932 pb) représentent 59% de la séquence codante. Les introns représentent 86% de la séquence génomique. Les éléments répétés occupent 47% de la séquence génomique de BRCA2 et ce sont des éléments de type Alu (20%), (Welch *et al.*, 2001). Le transcrit principal de BRCA2 de 11 kb code pour une phosphoprotéine de 3 418 acides aminés.

### II-6.4 Domaines fonctionnels BRCA2

Deux domaines fonctionnels ont été identifiés au niveau de la séquence de BRCA2 :

- 8 éléments répétés au niveau de l'exon 11 constituant le motif BRC, 30 à 40 résidus aminés. Ces domaines seraient impliqués dans la liaison directe avec la protéine de recombinaison et de réparation de l'ADN, RAD51 ; (Bork *et al.*, 1996).

- 2 sites impliqués dans le signal de localisation nucléaire NLS à l'extrémité carboxy terminal (Spain *et al.*, 1999) ;

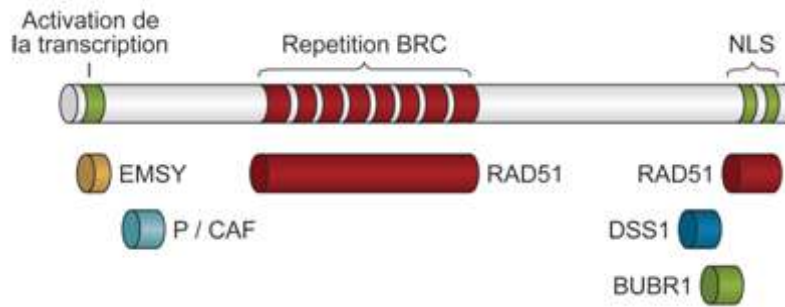


Figure 7 : Représentation schématique de la séquence primaire de BRCA2 et ses principaux partenaires d'interactions. (Mark. 2005)

## II-7 Fonctions de BRCA1

### II-7.1 Localisation et expression cellulaire

BRCA1 est une phosphoprotéine nucléaire de 220 kDa, qui naviguerait entre les deux compartiments cellulaires. Elle est fortement exprimée durant la phase S (duplication des chromosomes). Dans l'organisme, BRCA1 est exprimée ubiquitairement avec une prédominance dans la rate, le thymus et les testicules (Miki *et al.*, 1994, Takur *et al.*, 1997).

### II-7.2 Réparation de l'ADN

Les cellules BRCA1<sup>-/-</sup> présentent une hypersensibilité aux radiations ionisantes, accumulant spontanément des aberrations chromosomiques (cassures des chromosomes, translocations, formation de micronoyaux, duplication du centrosome). (Venkitarman *et al.*, 2001b) mais aussi, un défaut au niveau de la réparation par la recombinaison homologue (RH), alors que la recombinaison non-homologue (NHEJ pour non homologous end joining) apparaît indemne (Venkitarman *et al.*, 2002). Ces résultats suggèrent l'implication de BRCA1 dans la réponse aux lésions de l'ADN. Cela a été confortée par sa colocalisation et son interaction avec la protéine RAD51 qui se lie aux structures simple brin de l'ADN au niveau des cassures doubles brins, afin de former un filament nucléoprotéique permettant l'échange d'informations entre les molécules d'ADN. (Venkitarman *et al.*, 2001b, 2002).

BRCA1 ne se lie pas directement à RAD51 mais s'associe à des complexes protéiques : interaction avec le complexe BASC (BRCA1 Associated genome Surveillance Complex) de 15 sous unités comprenant des suppresseurs de tumeur et des protéines de la réparation (Wang *et al.*, 2000) ; interaction avec le complexe RAD50/MRE11/NSB1, lié à la RH et à la NHEJ. Suite à des lésions de l'ADN, BRCA1 va être hyperphosphorylée par différentes kinases

## Données Bibliographiques

(ATM, ATR, CHEK2), selon le type de dommage induit. BRCA1 quitte alors les fous nucléaires pour s'accumuler au niveau des structures répliquatives lésées (Chen *et al.*, 1998) et déclenche alors toute la machinerie de réparation de l'ADN. En fait, BRCA1 jouerait un rôle de chef d'orchestre, coordonnant les différentes réponses cellulaires mises en jeu lors de la détection des lésions de l'ADN (Venkitarman *et al.*, 2002).

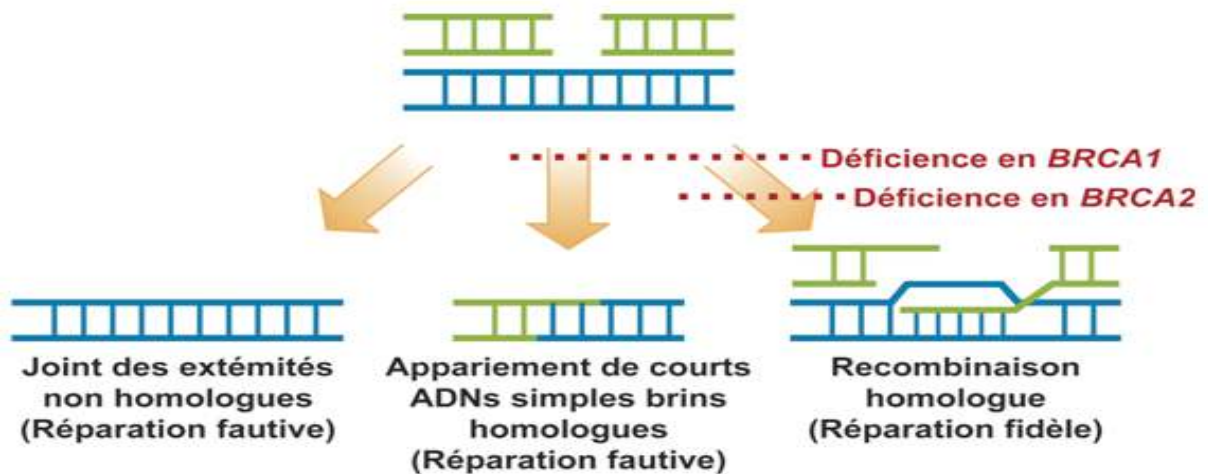


Figure 8 : Instabilité chromosomique due à des réparations de bris d'ADN double brins inappropriées (Venkitaraman *et al.*, 2002)

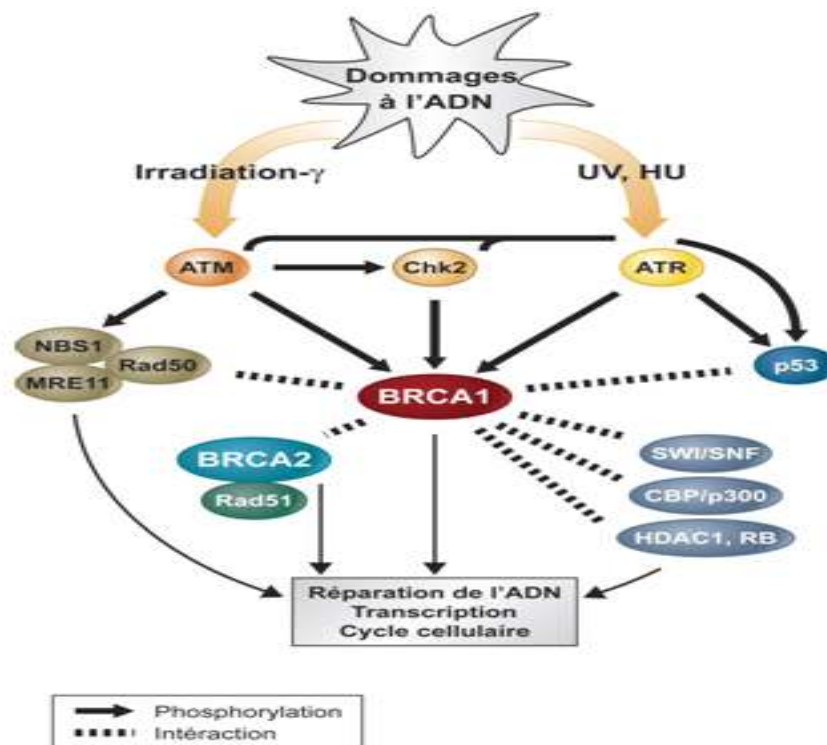


Figure 9 : Fonction de la protéine BRCA1 en réponse aux dommages à l'ADN. (Yoshida., 2004)



### II-7.3 Régulation de la transcription

L'implication de BRCA1 dans la régulation transcriptionnelle a tout d'abord été suggérée par la nature de sa séquence. En effet, BRCA1 possède à son extrémité carboxy terminal un domaine riche en résidus aminés chargés négativement, (Chapman *et al.*, 1996, Wang *et al.*, 2000 ). Ce type de domaine constitue le plus souvent le domaine de transactivation des facteurs de transcription. Récemment, un deuxième domaine d'activation AD1, doté d'un potentiel supérieur, a été identifié juste en amont du précédent appelé AD2. AD1 activerait la transcription de façon ubiquitaire, alors que AD2 dépendrait du type cellulaire (Hu *et al.*, 2000). Par ailleurs, BRCA1 est associée au complexe de l'holoenzyme ARN II polymérase, via son interaction avec un des éléments, l'ARN hélicase A (Scully *et al.*, 1997, Wang *et al.*, 2000 ).

BRCA1, de par son association avec des complexes remodelant la chromatine (Bochar *et al.*, 2000), et des régulateurs d'acétylation/désacétylation des histones (Yarden *et al.*, 1999), faciliterait l'accessibilité de l'ADN aux complexes de la transcription et de la réparation.

### II-7.4 Cycle cellulaire

BRCA1 régulerait le point de contrôle G1/S, et en association avec les centrosomes, interagirait avec d'autres protéines comme p53 ou Rb, régulant le point de contrôle G2/M (Larson *et al.*, 1997). BRCA1 active de plus la kinase CHEK1, qui retarde l'entrée en mitose jusqu'à ce que la réparation des sites lésés soit effectuée (Yarden *et al.*, 2002).

## II-8 Fonctions de BRCA2

### II-8.1 Localisation et expression cellulaire

BRCA2 est une phosphoprotéine nucléaire de poids moléculaire apparent de 390 kDa (Chen *et al.* 1998). L'expression de la protéine BRCA2 est régulée au cours du cycle cellulaire. Il a été montré que BRCA2 est exprimée en réponse à la prolifération cellulaire, et que son expression est maximale en phase S (Bertwistle *et al.*, 1997).

### II-8.2 Réparation de l'ADN

Comme pour BRCA1, les cellules BRCA2<sup>-/-</sup> présentent une hypersensibilité aux radiations ionisantes, accumulant spontanément des aberrations chromosomiques (Venkatarman *et al.*, 2001b). Mais aussi un défaut au niveau de la réparation par RH, alors que la NHEJ apparaît indemne. Ces résultats suggèrent l'implication de BRCA2 dans la réponse aux lésions de l'ADN. Le fait que BRCA2 colocalise et interagisse avec RAD51, protéine majeure de la RH, plaident en faveur de son implication dans la réparation de l'ADN.

Contrairement à BRCA1, BRCA2 se lie directement à RAD51 au niveau des 40 premiers acides aminés des motifs BRC (Chen *et al.*, 1998), BRCA2 aurait un rôle central dans la recombinaison de l'ADN en contrôlant la disponibilité et l'activité de RAD51 (Venkatarman *et al.*, 2002).

### II-8.3 Contrôle du cycle cellulaire

Il n'est pas certain que BRCA2 soit la cible de kinases contrôlant les points du cycle cellulaire. Mais, il a été suggéré que BRCA2 participerait directement au contrôle G2/M (Marmorstein *et al.*, 2001). De plus amples données sont nécessaires afin de savoir si oui ou non BRCA2 régule le cycle cellulaire indépendamment de son rôle dans la réparation de l'ADN.

### II-8.4 Régulation de la transcription

L'implication de BRCA2 dans la régulation de la transcription est moins évidente que pour BRCA1. Toutefois, l'exon 3 de BRCA2 présente une homologie de séquence avec le domaine d'activation du facteur de transcription c-jun. Ce domaine possède une activité transcriptionnelle (Milner *et al.*, 1997). BRCA2 interagit avec P/CAF (p3000/CBP Associated Factor), co-activateur ayant une activité histone acétyl transférase. Ce complexe pourrait intervenir dans la régulation transcriptionnelle en modifiant les histones (Fuks *et al.*, 1998).



En conclusion, BRCA1 et BRCA2 sont des protéines à rôles multiples. Toutefois, il semble que BRCA1 serait plus impliqué dans la surveillance générale des processus de réponse aux dommages de l'ADN, alors que BRCA2 semblerait avoir un rôle plus ciblé dans le mécanisme de réparation de l'ADN. Leur rôle majeur dans la réparation de l'ADN les définit comme des « **caretakers** », c'est à dire qu'elles maintiennent l'intégrité et la stabilité du génome.

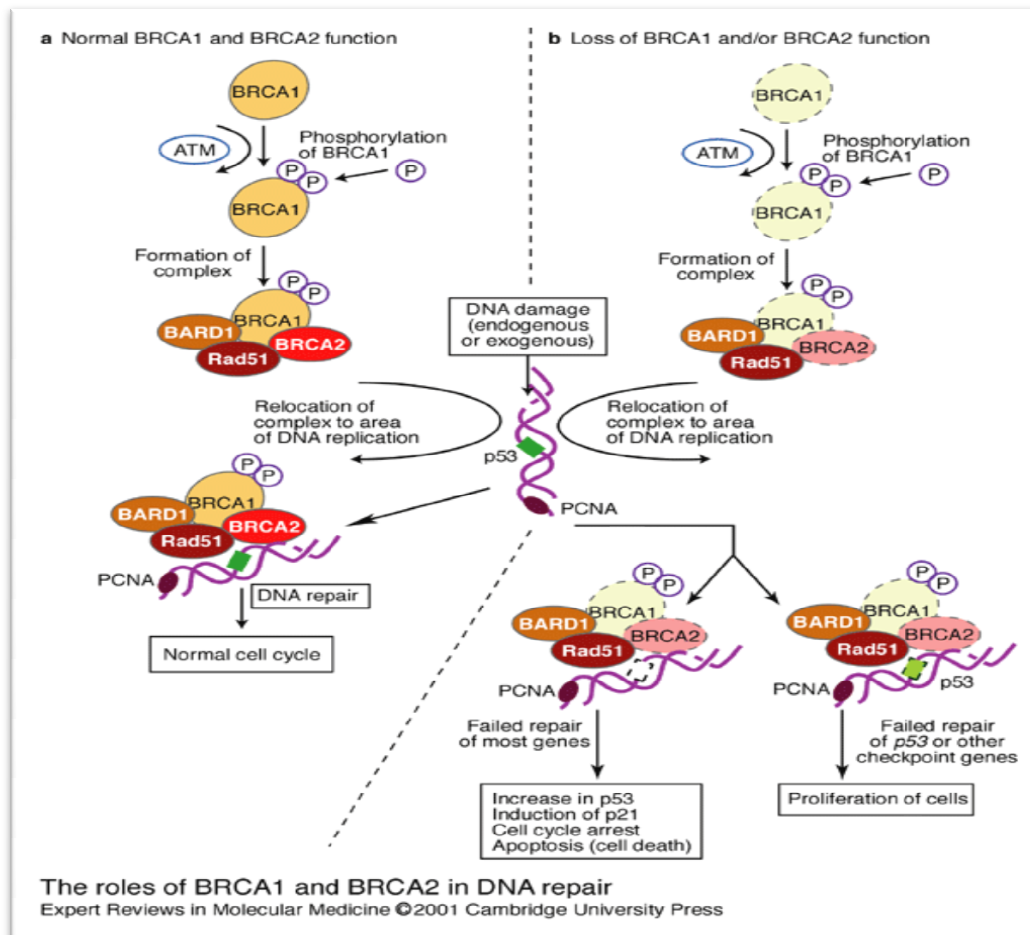


Figure 10 : Un possible modèle de l'implication de BRCA1 et BRCA2 dans la réparation de l'ADN. (Welsh *et al.*, 2000)

### II-9 Gènes mineurs de prédisposition au cancer du sein

D'autres gènes dits mineurs sont impliqués dans la prédisposition au cancer du sein. Il s'agit de gènes responsables de syndromes autosomiques dominants rares, associés à un risque élevé de cancer du sein.

- **le syndrome de Li-Fraumeni**, lié essentiellement à des mutations germinales de **P53**, associe chez l'enfant et le jeune adulte des sarcomes, des tumeurs cérébrales, des cortico-surrénales et des cancers du sein.

- **La maladie de Cowden**, liée à une mutation germinale du gène **PTEN**, se caractérise par de multiples lésions hyperplasiques, et tumorales impliquant de nombreux organes, mais plus fréquemment les muqueuses digestives, la thyroïde et le sein.
- Par ailleurs, il faut mentionner l'augmentation du risque de cancer du sein chez les porteurs de mutations hétérozygotes du gène **ATM** au sein des familles atteintes d'**ataxie télangiectasie**, syndrome autosomique récessif rare associant chez les sujets homozygotes une ataxie relative au cervelet, (Frebourg *et al.*, 2001).
- **BRCA X**, Des études suggèrent l'implication d'un (des) autre(s) gène(s) «BRCA3(X)», mais aucune localisation chromosomique significative démontrant l'existence d'un autre gène de susceptibilité au cancer du sein n'a pu être démontrée jusqu'à présent. (Du *et al.*, 2002, Thompson *et al.*, 2002c)

### II-10 Spectre de mutation de BRCA 1 et BRCA 2

#### II-10.1 Mutations germinales

À ce jour, selon la base de données «The Breast Cancer Information Core» (BIC), 1528 et 1910 mutations germinales distinctes de BRCA1 et BRCA2 ont été répertoriées, respectivement.

##### II-10.1.1 Mutations de petite taille

La majorité des mutations pour BRCA1 et BRCA2 engendre **un codon stop** prématuré. Parmi ces mutations, 70% sont des petites délétions, 10% des insertions, qui créent un décalage du cadre de lecture. Ce sont aussi des substitutions de quelques nucléotides qui génèrent un codon stop prématuré, des erreurs du site d'épissage, et des grandes altérations génomiques. (Friend., 1995)

##### II-10.1.2 Les grands réarrangements génomiques

Les réarrangements de grandes tailles sont des altérations sovent indétectables par les techniques habituelles de recherche de mutations, basées sur l'amplification par PCR de l'ADN génomique. Par contre le séquençage à haut débit nous permet un meilleur résultat.

#### II-10.2 Mutations somatiques

Si la mutation s'est produite dans une cellule somatique, la mutation demeure somatique, et n'altère pas le capital génétique transmissible par l'individu à sa descendance. Seules les cellules dérivant de la cellule où l'évènement mutationnel s'est produit sont touchés. Ainsi, le phénomène touche seulement un clone cellulaire. Dans les cas de cancers sporadiques, les 2 allèles du gène doivent acquérir une mutation somatique pour que la tumeur se développe.

# TABLE DES MATIÈRES

## **Abréviations**

<b>I- Introduction</b> .....	1
------------------------------	---

## **DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES**

<b>II- Généralités</b> .....	2
------------------------------	---

<b>II-1 Le cancer, processus multi-étapes</b> .....	2
---	---

<b>II-2 Anatomie du sein</b> .....	3
------------------------------------	---

<b>II-3 Cancer du sein</b> .....	3
----------------------------------	---

II-3.1 La classification histopathologique.....	4
---	---

II-3.2 Cancer du sein et facteurs de risque.....	4
--	---

<b>II-4 Epidémiologie</b> .....	5
---------------------------------	---

<b>II-5 Génétique des cancers du sein</b> .....	6
---	---

II-5.1 Formes sporadiques, familiales et héréditaires des cancers du sein .....	6
---	---

II-5.2 Estimation du risque tumoral induit par les mutations BRCA.....	7
--	---

<b>II-6 Caractérisation des gènes BRCA1 et BRCA2</b> .....	8
--	---

II-6.1 Structure du gène et du transcrit BRCA1.....	8
---	---

II-6.2 Domaines Fonctionnels BRCA1 .....	8
--	---

II-6.3 structure du gène et du transcrit BRCA2 .....	9
--	---

II-6.4 Domaines fonctionnels BRCA2.....	9
---	---

<b>II-7 Fonctions de BRCA1</b> .....	10
--------------------------------------	----

II-7.1 Localisation et expression cellulaire .....	10
--	----

II-7.2 Réparation de l'ADN.....	10
---------------------------------	----

II-7.3 Régulation de la transcription .....	12
---	----

II-7.4 Cycle cellulaire.....	12
------------------------------	----

<b>II-8 Fonctions de BRCA2</b> .....	12
--------------------------------------	----

II-8.1 Localisation et expression cellulaire.....	12
---	----

II-8.2 Réparation de l'ADN.....	13
---------------------------------	----

II-8.3	Contrôle du cycle cellulaire.....	13
II-8.4	Régulation de la transcription.....	13
<b>II-9</b>	<b>Gènes mineurs de prédisposition au cancer du sein.....</b>	<b>14</b>
<b>II-10</b>	<b>Spectre de mutation de BRCA 1 et BRCA 2.....</b>	<b>15</b>
II-10.1	Mutations germinales.....	15
II-10.1.1	Mutations de petite taille.....	15
II-10.1.2	Les grands réarrangements génomiques.....	15
II-10.2	Mutations somatiques.....	15

## **MATERIELS ET METHODE**

<b>III-1</b>	<b>Matériel d'étude .....</b>	<b>16</b>
III-1.1	Patients étudiés .....	16
III-1.2	Critères d'inclusion.....	16
<b>III-2</b>	<b>Méthodes moléculaires.....</b>	<b>17</b>
III-2.1	Extraction de l'ADN génomique.....	17
III-2.2	Mode d'emploi.....	17
III-2.3	Protocole d'extraction d'ADN .....	17
III-2.4	Contrôle de la qualité de l'ADN.....	18
<b>III-3</b>	<b>Amplification de l'ADN génomique par PCR .....</b>	<b>18</b>
III-3.1	Principe « Réaction de polymérisation en chaîne ».....	18
III-3.2	Les différentes étapes de la PCR .....	19
III-3.3	Contrôle du produit de la PCR.....	20
<b>III-4</b>	<b>Séquençage de l'ADN .....</b>	<b>21</b>
III-4.1	Principe : la méthode de Sanger .....	21
III-4.2	Séquençage automatique .....	21
III-4.3	Purification produit PCR.....	22
III-4.4	Réaction de séquence de réaction de séquence par le Magnésil .....	22
III-4.5	Purification des produits.....	23
III-4.6	Analyse des séquences.....	24

## **RESULTAT ET DISCUSSION**

<b>IV-1 Résultats de l'analyse moléculaire du gène</b> .....	25
IV-1.1 Résultats des tests génétiques .....	25
VI-1.2 Identification des mutations BRCA chez les cas index et les cas apparenté.....	25
IV-1.3 Répartition des types de cancer chez les cas index.....	26
IV-1.4 Répartition des mutations BRCA selon l'âge des individus.....	26
VI-1.5 Répartition des mutations BRCA selon le sexe.....	27
IV-1.6 Répartitions des mutations selon le gène BRCA muté et le sexe.....	27
<b>IV-2 Discussion</b> .....	28

### **Conclusion et perspectives**

### **Références bibliographiques**

### **Annexes**

### **Résumé**

# Summary

Breast cancer is the most common cancer in women. Among all cases of breast cancer ,about 10% have a hereditary component associated with a very high risk of developing the disease.

BRCA1 and BRCA2 genes have been identified as the two major genes predisposing to breast cancer. 40 to 85 % women carrying these mutations have a high risk to develop breast cancer at the age of 70.

The study we conducted at the breast unit of Larbi TEBESSI health center with Dr Amina ABDELOUAHAB has involved 32 people with family history of breast cancer . We therefore set out to determine the contribution of mutations in the BRCA1/BRCA2 genes to breast cancer in Algeria.

The study shows that women who had already breast cancer ( 8 of 32 ) were all carrying mutations of BRCA1/BRCA2 genes, also, we identified 3 cancer-free male patients carrying mutation of BRCA2 , and 2 cancer-free females carrying BRCA1 mutation . The results show clearly that hereditary breast cancer was due to mutations on BRCA1/BRCA2 genes , also, they enabled us to identify high-risk individuals in order to improve their disease management in the future .

**Keywords:** Hereditary breast cancer , mutation , BRCA1, BRCA2

# **Données bibliographiques**

# **Matériels et méthodes**



# **Résultats et Discussion**