



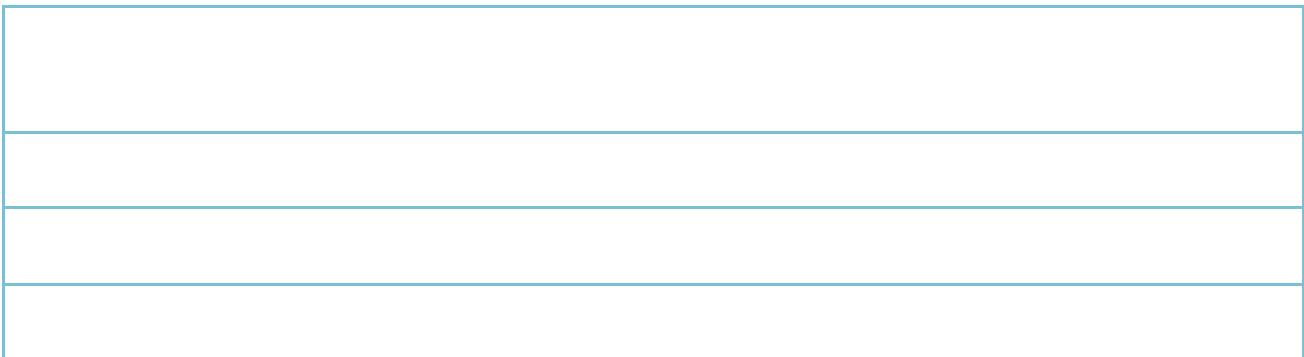
---

ml	Millilitre
Mn	Minute
$\mu$ l	Microlitre
NaCl	Chlorure De Sodium
ng	Nanogramme
nm	Nanomole
pb	Paire de base
PCR	Polymerisation Chaine Reaction
PIC	Papillome intracanalaire
R	Revers
SLB	Solution De Lyse des globules blancs
T	Thymine
T	Témoin
TBE	Tris-Borate-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tm	Température de fusion
Tr	Tour
UV	Ultra Violet
V	Volume





## *Liste des tableaux :*





## *Liste des figures :*

Figure 1 : La composition anatomique du sein

Figure 2 : Instabilité chromosomique due à des réparations de bris d'ADN double brins inappropriées.

Figure 3 : localisation du gène BRCA1 sur le chromosome 17 : (17q21)

Figure 4 : Représentation schématique de la séquence primaire de BRCA1

Figure 5 : Éléments structuraux de la protéine BRCA1

Figure 6 : Caractéristiques de la protéine humaine du BRCA

Figure 7 : Fonction de la protéine BRCA1 en réponse aux dommages à l'ADN

Figure 8 : Rôle de BRCA1 dans la régulation de la transcription et le contrôle du cycle cellulaire après l'exposition aux radiations ionisantes.

Figure 9 : Modèle de l'activation de l'hétérodimère BRCA1-BARD1 par les dommages à l'ADN

Figure 10: Résumé sur les connaissances actuelles concernant les corrélations entre le génotype et le phénotype dans les cancers du sein liés à BRCA1



Figure 11 : Éléments structuraux de la protéine BRCA2

Figure 12 : Mesures de prévention et dépistage des cancers du sein et de l'ovaire dans le cadre d'une mutation germinale BRCA1

Figure 13 : Spectrophotomètre NANODROP

Figure 14 : les étapes de la réaction de polymérisation en chaîne

Figure 15 : Thérmocycleur AppliedBiosystem 2700.

Figure 16 : mécanisme de la fluorescence par la technique du transfert d'énergie par résonance.

Figure 17 : Analyseur génétique 3500Dx

Figure 18 : Exemple de résultat de séquençage

Figure 19 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose 2% des produits d'amplification par PCR du gène BRCA1 (amorces BRCA1\_Ex11-1\_F/ BRCA1\_Ex11-1\_R).

Figure 20 : Electrophorèse sur gel d'agarose 2% des produits d'amplification par PCR (amorces BRCA1\_Ex11-1\_F/ BRCA1\_Ex11-1\_R) en utilisant différentes concentrations de l'ADN

Figure 21 : Electrophorèse sur gel d'agarose 2% des produits d'amplification par PCR en utilisant les amorces BRCA1\_Ex11-1\_F/ BRCA1\_Ex11-1\_R et avec une concentration d'amorces de 10 pmol /μl.

Figure 22 : Electrophorèse sur gel d'agarose 2% des produits d'amplification par PCR en utilisant les amorces BRCA1\_Ex11-1\_F/ BRCA1\_Ex11-1\_R après modification de la concentration des amorces.

Figure 23 : Electrophorèse sur gel d'agarose 2% des produits d'amplification par PCR en utilisant les amorces BRCA1\_Ex11-1\_F/ BRCA1\_Ex11-1\_R après changement de tampon de migration.

Figure 24 : Electrophorèse sur gel d'agarose 2% des produits d'amplification par PCR en utilisant les amorces BRCA1\_Ex11-1\_F/ BRCA1\_Ex11-1\_R après modification de tampon de migration.



Figure 25 : Electrophorégramme de la séquence amplifiée par le couple d'amorce BRCA1\_Ex11-1\_F/  
BRCA1\_Ex11-1\_R et séquencée par l'amorce BRCA1\_Ex11-1\_R de la patiente 19

Figure 26 : Electrophorégramme de la séquence amplifiée par le couple d'amorce BRCA1\_Ex11-1\_F/  
BRCA1\_Ex11-1\_R et séquencée par l'amorce BRCA1\_Ex11-1\_R de la patiente 19

Figure 27 : Alignement de la séquence amplifiée par le couple d'amorces BRCA1\_Ex11-1\_F/  
BRCA1\_Ex11-1\_R avec celle de la base de données

Figure 28 : Electrophorèse sur gel d'agarose 2% des produits d'amplification des 22 patientes par  
PCR en utilisant les amorces BRCA1\_Ex11-2\_F/ BRCA1\_Ex11-2\_R

Figure 29 : Electrophorèse sur gel d'agarose 2% de la suite des produits d'amplification des 22  
patientes par PCR en utilisant les amorces BRCA1\_Ex11-1\_F/ BRCA1\_Ex11-1\_R

Figure 30 : Electrophorèse sur gel d'agarose 2% des produits d'amplification des patientes dont on  
avait pas de bandes dans la PCR précédente en utilisant les amorces BRCA1\_Ex11-2\_F/  
BRCA1\_Ex11-2\_R

Figure 31 : Electrophorégramme de la séquence amplifiée par le couple d'amorce BRCA1\_Ex11-2\_F/  
BRCA1\_Ex11-2\_R et séquencée par l'amorce BRCA1\_Ex11-2\_F de la patiente 2

Figure 32 : Alignement de la séquence amplifiée par le couple d'amorces BRCA1\_Ex11-2\_F/  
BRCA1\_Ex11-2\_R avec celle de la base de données

Figure 33 : Electrophorégramme de la séquence d'un type sauvage amplifiée par le couple d'amorce  
BRCA1\_Ex11-2\_F/ BRCA1\_Ex11-2\_R et séquencée par l'amorce BRCA1\_Ex11-2\_F

Figure 34 : Electrophorégramme de la séquence amplifiée par le couple d'amorce BRCA1\_Ex11-2\_F/  
BRCA1\_Ex11-2\_R et séquencée par l'amorce BRCA1\_Ex11-2\_F de la patiente 2

Figure 35 : Electrophorégramme de la séquence amplifiée par le couple d'amorce BRCA1\_Ex11-2\_F/  
BRCA1\_Ex11-2\_R et séquencée par l'amorce BRCA1\_Ex11-2\_R de la patiente 2

Figure 36 : Alignement de la séquence amplifiée par le couple d'amorces BRCA1\_Ex11



## Sommaire

Remerciements	
Dédicaces	
Abréviations	
Listes des tableaux	
Listes des figures	
Sommaire	
Présentation de l'établissement	
Introduction.....	21
Revue bibliographique	
I)      Données Epidemiologiques	
1) Incidence du cancer du sein dans le monde et au Maroc .....	24
2) Facteurs de risque.....	24



a) L'âge.....	25
b) Facteurs hormonaux.....	25
c) Exposition aux radiations.....	25
d) Facteurs environnementaux.....	26
e) Facteur familial .....	26
 II) Anatomie et pathologies du sein	
1) Définition .....	26
2) Anatomie du sein.....	26
3) Types du cancer du sein.....	27
3-1) Carcinome in situ.....	27
3-2) Carcinome infiltrant.....	28
3-3) Carcinome inflammatoire.....	28
3-4) Maladie de Paget.....	28
3-5) Cancer triple négatif.....	28
3-6) Tumeur phyllode maligne.....	29
4) Lésions bénignes	
4-1) Nodule bénin.....	29
4-2) Maladies fibrokystiques.....	29
4-3) Kystes.....	29
4-4) Fibroadénome.....	30
4-5) Papillome intracanalaire.....	30
4-6) Tumeur phyllode benigne.....	30
4-7) Galactophorite.....	30
4-8) Mastite.....	30
4-9) Abcés.....	30
 III) Généralités sur le cancer du sein.....	31
IV) Notion d'hérédité.....	32
V) Hérédité et prédisposition génétique.....	33
VI) Prédisposition héréditaire au cancer du sein et/ ou de l'ovaire.....	33



---

1) Transmission autosomique dominante.....	33
2) Quand penser à une prédisposition héréditaire ?.....	34
VII) Prévalence d'une mutation .....	36
VIII) Risques de cancers associés à une mutation BRCA.....	37
IX) Génétique Moléculaire :	
1) Apport des données de génétique moléculaire.....	38
2) Les gènes BRCA1 et BRCA2.....	39
a) Données épidémiologiques et syndromes associés.....	39
b) Présentation clinique et proportion respectives associés aux différents Gènes.....	39
c) Fonctions.....	40
3) BRCA1	
a) Le gène.....	41
b) La région de l'exon 11.....	43
c) La protéine .....	44
d) Principaux rôles.....	46
e) Les mutations.....	50
f) Corrélation génotype phénotype.....	50
4) Le gène de prédisposition BRCA2 et sa protéine.....	51
5) Autres gènes de prédisposition au cancer du sein.....	52
a) Le gène P53.....	52
b) Le gène BRCA3.....	53
c) Le gène de la maladie de Cowden .....	53
d) Le gène AR (récepteur aux œstrogènes).....	53
e) Les gènes hMSH2, hMLH1, hPMS1 ET hPMS2 .....	53
f) Le gène ATM (Ataxie télangiectasie).....	54
6) L'intérêt d'un diagnostic génétique.....	54
7) Pronostic des cancers du sein chez les porteurs de mutation BRC...54	
8) Prise en charge .....	55
Objectif.....	58
Matériel et méthode	
A/ Matériel	
1- Echantillonnage	



---

a) Critères d'inclusion.....	61
b) Patients.....	62

B/ Méthodes :

1- Stratégie du travail.....	66
2- Prélèvementsanguin et conservation.....	66
3- Extraction d'ADN.....	66

3-1 : Extraction d'ADN par sel sur sang (salting-out)

a)Principe.....	66
b) Réactifs nécessaires.....	67
c)Protocol expérimental.....	67
i)    Lyse des globules rouges	
ii)    Lyse des globules blancs	
iii)    Dénaturation et précipitation des protéines et impuretés	
iv)    Précipitation et lavage de l'ADN	

4- Dosage de l'ADN extrait.....68

5- Amplification du gène BRCA1 (exon 11) par réaction de  
polymérisation en chaîne

    5-1. choix des amorces.....69

    5-2. mise au point de la technique de PCR

a) Principe.....	69
b) Réactifs nécessaires.....	70
c) Milieu réactionnel et programme PCR.....	71

    5-3. Visualisation du produit PCR.....73

a) Principe.....	73
b) Réactifs nécessaires.....	74
c) Protocol expérimental.....	74



## 6- Séquençage du gène BRCA1

6-1. Principe.....	74
a) Purification par ExoSAP®.....	75
b) Réaction de séquence par BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing.....	75
i) Réactifs nécessaires.....	77
ii) Protocol expérimental.....	77
c) Purification de la réaction de séquence avec le Kit BigDye-XTerminator .....	78
6-2. Chargement de l'appareil.....	79
7) les outils de bio informatique	
7-2. Logiciel BLAST.....	80
Résultats :	
I) Dosage et qualité de l'ADN extrait.....	82
II) La réaction de polymérisation en chaîne et séquençage.....	82
1) Optimisation de la réaction PCR par le couple d'amorce.....	83
2) Séquençage des produits d'amplification obtenus par le couple d'amorces... ;	89
3) Optimisation de la réaction PCR par le deuxième couple d'amorces.....	91
4) Séquençage des produits d'amplification obtenus par le deuxième couple d'amorces.....	92
Conclusion et perspectives .....	98
Anneses... ;.....	100
Références bibliographiques.....	111



### Présentation de l'établissement :

Le centre hospitalier universitaire Hassan II (CHU Hassan II) de Fès, a été réalisé de nature à promouvoir un nouveau pôle sanitaire et médical au service du développement régional, à réduire la pression sur les unités hospitalières de Rabat et Casablanca et à croître les capacités universitaires régionales. L'ouverture de cette infrastructure sanitaire moderne contribue à la fois à l'amélioration des services médicaux fournis à la population et à la promotion de la recherche scientifique dans ce domaine.

Ce complexe hospitalo-universitaire est construit sur une superficie de 120.000 m<sup>2</sup>, dont 78.102 m<sup>2</sup> couverts, il comprend un hôpital des spécialités, un hôpital Mère-enfant, un bloc opératoire, une salle de diagnostic, un pavillon de consultations externes et un laboratoire central. Qui comprend 7 services qui se repartissent de la manière suivante :

- Rez-de-chaussée : service de biochimie, de toxicologie et de pharmacologie.



- Premier étage : service de bactériologie de sérologie et d'hématologie.
- Deuxième étage : service de **génétique médicale, d'oncogénétique** et d'anatomopathologie.

**L'unité de génétique médicale et d'oncogénétique**, représente une première expérience dans un CHU au MAROC, elle est activement mise en place depuis sa création en Mars 2009. Il est constitué de plusieurs unités permettant le bon déroulement et l'exécution des examens tout en respectant l'organisation du travail au sein du service.

Ce dernier est sous la responsabilité d'un **personnel** composé de :

- Un professeur agrégé chef de l'unité.
- 3 médecins résidentes.
- 2 administrateurs.
- 3 techniciennes.

L'unité de génétique médicale et d'oncogénétique est subdivisé en trois disciplines (Clinique, cytogénétique et moléculaire). Elle assure des activités variées qui comprennent:

1) Génétique clinique (activité clinique)

- ◆ Consultation de génétique (au centre du diagnostic)
- ◆ Conseil génétique (au centre du diagnostic)
- ◆ Consultation d'oncogénétique (au centre du diagnostic)
- ◆ Avis du médecin généticien dans les services cliniques
- ◆ Hôpital de jour (en coordination avec les services cliniques)

2) Génétique chromosomique (analyse des chromosomes)

- ◆ Cytogénétique classique (caryotype)
- ◆ Cytogénétique moléculaire (FISH : Hybridation In Situ en Fluorescence)

3) Génétique moléculaire (analyse des gènes)

- ◆ Amplification de gène par PCR



♦ séquencage

## Introduction générale :

Le cancer est associé à une croissance anormale des cellules, qui présentent une dérégulation des processus de prolifération et de mort cellulaire. Ces cellules peuvent acquérir de nouvelles capacités, telle la propriété d'envahir les tissus adjacents et de former des métastases d'autres tissus ou organes, pouvant ainsi entraîner la morbidité ou la mort de l'hôte.[\[1\]](#)[\[2\]](#)

Les changements observés au niveau de ces cellules sont ultimement le résultat d'une expression anormale de gènes. Ces altérations génétiques ont deux conséquences bien différentes. Elles peuvent conduire à l'augmentation de l'activité de certains gènes favorisant au sens large la croissance tumorale ; ces gènes sont appelés oncogènes. A l'inverse, elles peuvent inactiver d'autres gènes dont l'activité physiologique s'oppose à la transformation tumorale, d'où leur nom de gènes suppresseurs de tumeurs. [\[3\]](#)

Au niveau de la cellule tumorale, les oncogènes ont une action dominante : l'activation d'un seul allèle est généralement suffisante à sa contribution au phénotype tumoral. À l'inverse, les gènes suppresseurs de tumeurs sont récessifs, l'inactivation des deux allèles est nécessaire[\[4\]](#)

En outre, la majorité de ces mutations et remaniement de l'ADN sont acquis et transmis lors de la division cellulaire, on parle de mutations somatiques. Celles présentes dès la conception sont appelées mutations constitutionnelles, ou encore germinales. Ces dernières expliquent les prédispositions génétiques aux cancers. De plus, ces mutations germinales touchent le plus souvent des gènes suppresseurs de tumeurs, et parfois certains oncogènes. [\[4\]](#)



---

Les études d'épidémiologie génétique ont permis d'estimer que 5 à 10% des cas de cancer du sein sont liés à la présence d'un facteur génétique transmis selon un mode autosomique dominant (c'est-à-dire transmis par l'un des deux parents, soit la mère soit le père), et associé à un risque cumulé de cancer du sein de 67% à l'âge de 70ans, soit un risque multiplié par 10 par rapport à celui de la population générale. [5]

A la lumière de ces données, et vue la fréquence élevée du cancer du sein dans notre centre hospitalier universitaire Hassan II de Fès, il était indispensable de penser à la mise en place d'une consultation d'oncogénétique, qui permet d'évaluer la probabilité de l'existence d'une prédisposition héréditaire via le test génétique. Cette consultation va permettre d'évaluer les risque de cancer et d'y adapter une meilleur prise en charge de cette population à risque par une prévention du cancer du sein, sensibilisation des autres membres de la famille, dépistage précoce tout en sachant qu'un cancer découvert au tout début peut-être guérissable dans plus de 90% des cas.

Notre travail consiste à rechercher les mutations germinales responsables du cancer BRCA1 du sein et / ou de l'ovaire chez les familles marocaines par la technique PCR suivie d'un séquençage bidirectionnel de l'exon 11 du gène BRCA1.



## *Revue bibliographique*

*Rapport gratuit.com*



## **I) Données épidémiologiques :**

### **1) Incidence du cancer du sein dans le monde et au Maroc :**

Le cancer du sein est le premier cancer de la femme dans le monde et son incidence ne cesse d'augmenter [6] particulièrement pour la tranche d'âge allant de 35 à 55 ans [7].

Chaque année, plus d'un million de nouveaux cas dans le monde apparaissent, avec 30% de cas dans les pays industrialisés et 14% de cas dans les pays en voie de développement. En France en 2005, plus de 49 000 patientes ont été atteintes d'un cancer du sein et plus de 11000 décès lui sont attribués en 2006 [8]. L'estimation est d'au moins une femme sur dix, qui est atteinte par ce fléau.

Au Maroc, ce cancer est également classé le premier par rapport à l'ensemble des cancers chez les femmes, tout âge confondu [9, 10]. GLOBOCAN en 2002, note que l'incidence au Maroc (22,5 pour 100 000 femmes/an), est comparable à celle estimée en Algérie (23,5 pour 100 000 femmes/an), un peu plus élevée que celle de la Tunisie (19,6 pour 100 000 femmes/an) et nettement inférieure à celles observées aussi bien en Amérique (101,1 pour 100 000 femmes/an respectivement [10]. En 2004, le registre de Casablanca avait noté une incidence élevée du cancer du sein de l'ordre de 35,04 pour 100 000 femmes/an, avec une proportion de 36,1 % par rapport au total des cancers enregistrés chez les femmes [11]. Ainsi, le Maroc rejoint la plupart des pays occidentaux concernant la fréquence des cancers du sein qui est en nette progression au cours de cette dernière décennie et représente un problème majeur de santé publique. Cette augmentation est due d'une part, à l'amélioration du dépistage et des moyens de la prise en charge diagnostique et d'autre part, à l'exposition accrue aux différents facteurs de risque (contraception orale, multiparité, absence d'allaitement, radiothérapie antérieure...).

### **2) Facteurs de risques :**

L'étiologie est multifactorielle, impliquant des facteurs tels que l'âge, les facteurs hormonaux, l'exposition aux radiations, les facteurs environnementaux, et le facteur familial.

#### **a) L'âge :**



Comme l'illustre le tableau I, le risque de cancer du sein augmente avec l'âge, la plupart des cancers du sein se déclarent après l'âge de 50 ans.

**Tableau I : fréquence des mutations identifiées dans BRCA1 en fonction de l'âge des 169 patientes au moment du diagnostic de cancer du sein. Les patientes appartenaient à des familles à risque élevé de cancer héréditaire (moyenne de 4 cancers par famille)** [12]

Age au diagnostic	Nombre de mutations par famille étudiée	Pourcentage de mutations
<35	1/5	3.7%
35-39	7/27	25.9%
40-44	5/32	18.5%
45-49	5/24	18.5%
50-54	4/34	14.8%
55-59	1/24	3.7%
>59	4/23	14.8%
<b>Total</b>	<b>27/169</b>	<b>16.0%</b>

Comme pour tous les syndromes de cancers héréditaires, les sujets porteurs d'une prédisposition génétique liée au gène BRCA1 développent leur cancer à un âge plus précoce que les cas sporadiques. Près de 4% des femmes présentant un cancer du sein avant l'âge de 35 ans sont porteuses d'une mutation germinale de BRCA1. La prévalence d'altérations génétiques diminue proportionnellement avec l'augmentation de l'âge au moment du diagnostic.

**b) Facteurs hormonaux :**

Le risque de cancer du sein est augmenté en cas de ménarche précoce, de ménopause tardive et lorsque la première grossesse se déroule après 30 ans. [13]

**c) Exposition aux radiations :**

Des observations chez les survivants de Hiroshima et Nagasaki et chez des femmes ayant reçu un traitement radiothérapie au niveau de la poitrine et du tronc supérieur montrent une augmentation du risque de cancer du sein liée à l'exposition aux radiations [14].



#### **d) Facteurs environnementaux :**

Des facteurs environnementaux comme l'obésité, l'apport de graisse, la consommation d'alcool [15] et un faible niveau d'activité physique [16] entraînent une légère augmentation du facteur de risque au cancer du sein.

#### **e) Facteur familial :**

Un des facteurs les plus importants dans l'évaluation du risque de cancer du sein reste le facteur familial. En effet, comme le suggère l'anamnèse des patients atteints de cancer du sein, 15 à 20% présentent un contexte familial. Ce facteur de risque a été évalué par plusieurs études, que ce soient des études cas contrôle ou des études de cohorte. Le risque relatif global calculé à partir de 38 cas de ces études s'élèverait à 2,1 pour les femmes avec un apparenté au premier degré atteint d'un cancer du sein.[17]

## **II) Anatomie et pathologies du sein :**

### **1) Définition :**

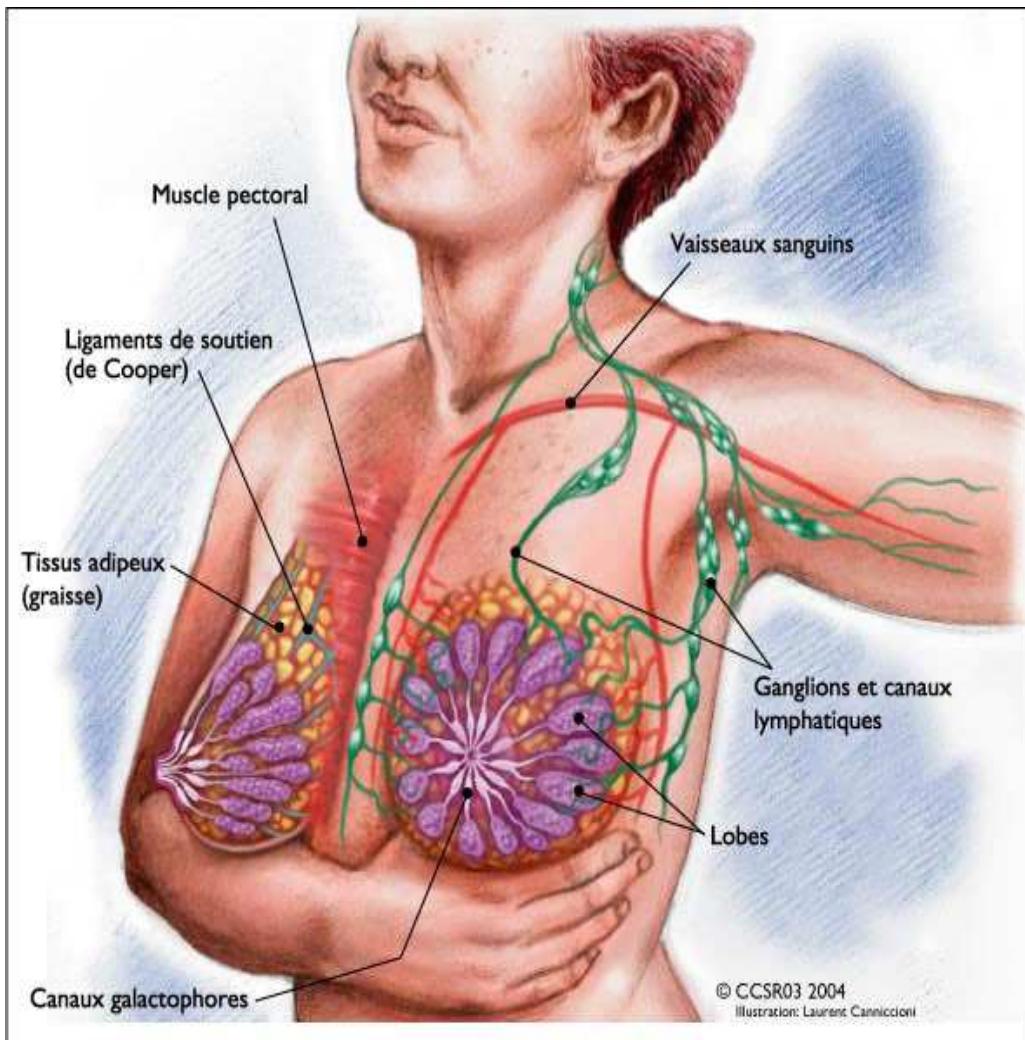
Le **sein** (du latin *sinus*, « courbure, sinuosité, pli ») ou la **poitrine** dans son ensemble, est la partie antérieure du thorax humain qui s'étend de la base du cou jusqu'au creux de l'estomac.

Plus particulièrement chez la femme, il désigne ses mamelles. Il contient des glandes mammaires sécrétrices du lait qui permettent l'allaitement des jeunes bébés dès la naissance. Chez l'homme, il désigne de la même façon la glande mammaire atrophiée.

### **2) Anatomie du sein :**

Le sein est composé d'une **glande mammaire**, de fibres de soutien (ligaments de Cooper) et de graisse (tissu adipeux); le tout est recouvert par la peau. La quantité de chacune de ses composantes peut varier d'une femme à l'autre. Le sein est situé par-dessus le muscle pectoral. On trouve également dans le sein des nerfs, des vaisseaux sanguins et lymphatiques. La **glande mammaire** est divisée en 15 à 20 sections qu'on appelle **lobes**, composés de **lobules**. Ceux-ci sont reliés à

des **canaux** qui se rendent sous le mamelon (situé au centre du sein). On peut également observer des chaînes de ganglions lymphatiques qui filtrent les microbes et protègent le corps contre l'infection et la maladie. Le cancer du sein peut se développer tant au niveau d'un canal galactophore que d'un lobule et il peut également se retrouver au niveau des ganglions lymphatiques.



**Figure 1 : La composition anatomique du sein**

### **3) Types de cancer du sein**



### **3-1) Carcinome in situ :**

Le carcinome canalaire in situ ou CCIS (DCIS en anglais) est la prolifération de cellules cancéreuses à l'intérieur d'un canal galactophore sans que les cellules ne dépassent la paroi du canal pour envahir le reste du sein.

Les CCIS sont différents et leur évolution et leur risque de rechute varient. Le risque de rechute est plus grand si le CCIS est gros (plus de 41 mm), de grade élevé à la pathologie (grade 3) et plus la femme atteinte est jeune (moins de 40 ans). [18]

### **3-2) Carcinome infiltrant :**

- Le **carcinome canalaire infiltrant** (CCI) est le type de cancer le plus commun. Il représente 76 % des cancers infiltrants. Le cancer provient des canaux mais envahi le reste du sein. [18]
- Le **carcinome lobulaire infiltrant** (CLI) est le second cancer infiltrant du sein de point de vue fréquence, il représente 8 % des cancers infiltrants. Il est souvent difficile à palper et à identifier à la mammographie. L'étendue réelle de ce cancer est souvent beaucoup plus grande que ce qui est soupçonné à l'examen clinique du sein ou à la mammographie. [18]

### **3-3) Cancer inflammatoire**

Les cancers inflammatoires du sein sont des cancers à progression rapide et agressifs. Ils se présentent comme une mastite (infection du sein). La rougeur, le gonflement du sein et parfois la peau d'orange s'étendent sur au moins le tiers de la surface du sein et ces signes ont tendance à couvrir rapidement le reste du sein. Une douleur peut être associée au cancer inflammatoire en raison de son évolution rapide. [18]

### **3-4) Maladie de Paget :**

La maladie de Paget est un cancer de la peau du mamelon ou de l'aréole. Les femmes présentent habituellement une lésion eczémateuse sous forme de croûte, de plaie qui ne guérit pas au niveau du mamelon ou de l'aréole et un écoulement de sang peut aussi être présent.

### **3-5) Cancer triple négatif :**



Lorsqu'on ne trouve aucun récepteur des œstrogènes, aucun récepteur de la progestérone et aucune trace du HER2 dans un cancer, on le nomme cancer triple négatif. Les femmes porteuses d'une mutation au niveau du gène BRCA1 et aussi celles porteuses d'une mutation au niveau du gène BRCA2 mais moins fréquemment, présentent souvent ce type de cancer. Par contre, ce ne sont pas toutes les femmes ayant un cancer triple négatif qui sont porteuses de mutation au niveau des gènes BRCA. Ces cancers tendent à être plus agressifs.

### **3-6) Tumeur phyllode maligne**

La tumeur phyllode est rare. On l'appelle aussi cystosarcomephyllode. Elle se présente comme une masse qui peut être bosselée et grossir rapidement. Elle peut même parfois déformer le sein.

Il existe trois types de tumeurs phyllodes selon leur apparence au microscope:

- **bénigne** : la plupart des tumeurs phyllodes sont bénignes.
- **à malignité restreinte** : ces tumeurs peuvent parfois se comporter comme des cancers.
- **maligne ou cancéreuse** : moins de 5 % des tumeurs phyllodes sont cancéreuses.

## **4) Lésions bénignes :**

### **4-1) Nodule bénin :**

Un nodule au sein peut être bénin (non cancéreux) ou malin (cancer). Les tumeurs bénignes les plus fréquentes sont le fibroadénome et le kyste. Il existe d'autres types de tumeurs bénignes comme par exemple, le lipome, l'adénolipome, la tumeur phyllode, le papillome intracanalaire, l'adénose et la sclérose.

### **4-2) Maladie fibrokystique :**

Il ne s'agit pas vraiment d'une pathologie mais plutôt d'une affection bénigne qui touche plus de la moitié des femmes âgées de 30 à 50 ans. Elle se caractérise par la formation de nodules et de kystes



---

à l'intérieur du sein, à la suite de la stimulation des hormones féminines. Elle peut causer un gonflement, de la douleur ou de la sensibilité aux deux seins, surtout dans la partie supéro-externe.

#### **4-3) Kyste :**

Un kyste est une tumeur bénigne (sans risque) du sein contenant du liquide. Il peut être unique ou multiple, comme dans la maladie fibrokystique. Souvent il occasionne un malaise ou un inconfort, surtout si le liquide est sous tension.

#### **4-4) Fibroadénome**

Le fibroadénome est une tumeur bénigne (sans risque) du sein qui touche en général les femmes de moins de 30 ans. Il forme un nodule rond, unique ou multiple, ferme, bien délimité et ne cause habituellement pas de douleur. Son volume peut augmenter durant la phase prémenstruelle et être alors repéré plus facilement.

#### **4-5) Papillome intracanalaire (PIC)**

Le papillome intracanalaire est une tumeur bénigne à l'intérieur d'un canal galactophore qui est responsable d'un écoulement jaunâtre ou sanguinolent tachant les vêtements.

#### **4-6) Tumeur phyllode bénigne**

La tumeur phyllode est rare. On l'appelle aussi cystosarcomephyllode. Elle se présente comme une masse qui peut être bosselée et grossir rapidement. Elle peut même parfois déformer le sein.

#### **4-7) Galactophorite**

La galactophorite est l'inflammation d'un ou plusieurs canaux qui peut être aigüe avec rougeur et sensibilité du mamelon. La galactophorite chronique peut entraîner une rétraction du mamelon qui disparaît en manipulant le mamelon au début et qui peut devenir plus permanente avec les années.

#### **4-8) Mastite**



La rougeur, la douleur, la chaleur et le gonflement du sein caractérisent la mastite. Il s'agit d'une infection du sein qui s'observe le plus souvent chez les femmes enceintes ou qui allaitent.

#### **4-9) Abcès**

L'abcès peut survenir lors de la grossesse ou l'allaitement. Il s'agit d'une bosse sensible, rouge qui contient du pus. Si l'abcès est entre le sein et le thorax, il peut être plus difficile à palper et la rougeur peut être absente. L'échographie peut aider à faire le diagnostic. L'abcès qui survient chez une femme qui n'est pas en période de grossesse et d'allaitement est observé plus souvent chez les fumeuses.

### **III) Généralités sur le cancer du sein :**

Le cancer du sein est aujourd'hui le cancer féminin le plus fréquent et constitue de ce fait un problème majeur de santé publique. En effet, la probabilité de développer un cancer du sein durant toute la vie d'une femme est de 13,3% environ, soit une femme sur huit. [19,20]

Le cancer de l'ovaire est de 7 à 10 fois moins fréquent que celui du sein (environ 400 cas incidents), cependant il représente le quatrième cancer de la femme et la cinquième cause de mortalité par cancer, ceci s'explique en partie, par le fait qu'il est fréquemment diagnostiqué à un stade avancé [21,22]. On estime généralement que 4 à 10 % de ces deux cancers se développeraient dans un contexte héréditaire simple c'est-à-dire mendélien [23,24,25]. Si la proportion des sujets prédisposés semble faible, le risque de développer la maladie est majeur. En ce sens, outre l'âge et le sexe, rien ne peut être comparé au risque génétique. Le faible pourcentage représente cependant, de par la fréquence élevée de ces deux localisations tumorales, un nombre de sujets plus important que n'importe quelle autre pathologie héréditaire non cancéreuse.

L'analyse de cas cliniques et les résultats issus d'études d'épidémiologie classique ou d'épidémiologie génétique ont permis tout d'abord, de suggérer l'existence d'une prédisposition génétique au cancer, puis d'identifier certaines présentations cliniques ou phénotypes particuliers associés à un contexte héréditaire, d'estimer les paramètres génétiques (fréquence génique, pénétrance, expressivité) et de préciser les modes de transmission. [26]



Certaines caractéristiques cliniques évocatrices de prédisposition génétique ont été décrites dans les modèles que sont le rétinoblastome, la polypose colique familiale et le cancer médullaire de la thyroïde [27]. Il s'agit de la précocité, de la bilatéralité, de la multifocalité des atteintes, de l'existence d'un stade précancéreux (polypose, hyperplasie des cellules C) ou d'associations tumorales (cancer médullaire de la thyroïde et phéochromocytome). Cependant, pour les tumeurs communes, il est souvent difficile d'affirmer l'hérédité et ainsi de différencier un cas sporadique d'un cas héréditaire (association fortuite de tumeurs sporadiques, ou cas sporadiques associés à des cas héréditaires). Pour porter le diagnostic de cas héréditaire ou de prédisposition génétique, il faut rechercher des arguments supplémentaires, et notamment une histoire familiale évocatrice (au moins trois apparentés de premier ou deuxième degré atteints dans la même branche parentale, ou deux cas, si l'un est précoce ou bilatéral). L'existence dans la famille ou chez un même individu d'associations tumorales caractéristiques (cancers du sein et sarcome), ou de certains symptômes évoquent un syndrome rare tel que la maladie de Cowden.

Les cancers du sein, des ovaires, de l'endomètre et du colon sont héréditaires dans 5 à 10 % des cas. Ces prédispositions génétiques s'intègrent dans deux syndromes majeurs : les formes familiales de cancer du sein et /ou de l'ovaire (gènes BRCA1, BRCA2), et les formes familiales de cancer du côlon, de l'endomètre et de l'ovaire (syndrome de Lynch ou HNPCC) (gènes hMLH1, hMSH2, hMLH6). L'estimation du risque familial et individuel peut être un apport déterminant à la prise en charge de ces patientes, par la pratique d'un dépistage ou d'une prévention adaptée. En effet, le risque de cancer d'un individu ayant un test positif pour un gène de prédisposition aux cancers du sein (BRCA1, BRCA2) ou du côlon (hMLH1, hMSH2, hMLH6) est compris entre 50 à 70 % à l'âge de 70 ans. L'indication d'un test génétique doit être discutée dans le cadre d'une consultation d'oncogénétique. Une prise en charge médicale, individuelle et familiale, allant de la simple surveillance à la chirurgie prophylactique est proposée aux personnes prédisposées. [28]

## **VI) Notion d'hérédité :**

L'accumulation de certains types de cancers à l'intérieur de certaines familles a apporté un intérêt particulier à comprendre la place de la susceptibilité héréditaire de l'individu dans les carcinogénèses.



En effet, le cancer du sein tend à se présenter en regroupement à l'intérieur de certaines familles et plus de 12% des femmes atteintes d'un cancer du sein ont une parente au premier ou au deuxième degré elle aussi atteinte [29]. Bien que cette susceptibilité accrue puisse être le fruit du partage d'un même environnement ou d'habitudes de vie semblables, des études chez des jumeaux mono et di zygotes indiquent que la majeure partie de cette agrégation familiale est le résultat d'une susceptibilité transmise de façon héréditaire [30,31].

Parmi ces cancers survenant à l'intérieur d'une même famille, on considère comme héréditaire ceux pour lesquels une mutation d'un gène de susceptibilité est connue, ou qu'une telle mutation est suspectée sur la base du risque élevé retrouvé dans la famille. Le terme « familial » est quant à lui utilisé lorsque le cancer est retrouvé chez au moins deux parents au premier et ou second degré ; sans que la transmission mendélienne d'une susceptibilité soit apparente. Le reste des cas de cancers apparaît en l'absence d'une histoire familiale de cancer du sein et sont habituellement appelés des cas « sporadiques » [32].

Cependant la découverte de nouveaux allèles de susceptibilité et l'étude exhaustive des antécédents familiaux liés à certains cas pourraient permettre de reclasser une partie des cancers familiaux (et même certains cancers sporadiques) en tant que cancers héréditaires [33]

## **V) Hérédité et prédisposition génétique :**

La notion de prédisposition génétique au(x) cancer(s) est une notion relative : elle correspond à une augmentation du risque de cancers, ou d'un cancer donné, chez une personne, par rapport au risque moyen observé dans la population générale. Cette augmentation peut être mesurée par le risque relatif ; autrement dit, si l'on revient au processus biologique de la transformation cellulaire, il s'agit de situations où le quota de mutations nécessaire à la transformation cellulaire est atteint plus rapidement. [34]

## **VI) Prédisposition héréditaire au cancer du sein et/ ou de l'ovaire :**

L'altération génétique responsable d'une prédisposition héréditaire au cancer du sein et /ou de l'ovaire se rencontre le plus fréquemment dans les gènes BRCA1 et BRCA2, mais également, de façon plus rare, dans d'autres gènes tels les gènes ATM associé à l'ataxie télangiectasie (syndrome



de Louis Bar), p53 responsable du syndrome de Li-Fraumeni et STK11 responsable du syndrome de peutz-Jeghers. [35]

### **1. Transmission autosomique dominante :**

Une prédisposition héréditaire au cancer du sein associée aux gènes BRCA1 est transmise selon le mode autosomique dominant répondant aux 3 critères suivants [35] :

- ✓ des cas du cancer du sein et /ou de l'ovaire se retrouvent sur plusieurs générations, on parle de transmission verticale. Ainsi, pour être porteur d'une prédisposition, il faut avoir hérité la mutation d'un des deux parents porteurs.
- ✓ Lorsqu'un parent est atteint, chaque enfant à 50% de risque d'hériter la mutation de prédisposition
- ✓ Autant d'hommes que de femmes portent et transmettent la prédisposition autosomique dominante. Le gène muté est ainsi transmis aux enfants de sexe féminin et de sexe masculin. Même si le phénotype ne s'exprime spécifiquement que chez les femmes, un homme peut également être porteur et transmettre son gène altéré à sa descendance.

Ces critères essentiels sont recherchés lors de l'évaluation familiale ou lors de la réalisation de l'arbre généalogique, afin de différencier sur la base de l'anamnèse les formes familiales des formes héréditaires. La reconstitution d'un arbre généalogique va permettre de mettre en évidence le mode de transmission des cancers présents dans une famille. Il est important lors de son établissement, de recueillir le plus précisément possible les données tant du côté maternel que du côté paternel, car la mutation de prédisposition peut se transmettre tant par l'homme que par la femme. L'arbre va permettre également de compter facilement le nombre de cas atteints dans la famille, de le comparer au nombre de cas qui auraient pu être atteints et de regarder les liens de parenté [35].

Une évaluation du risque de cancer héréditaire chez la personne qui consulte sera ainsi rendu possible. La présence de 3 cas de cancers du sein déclarés avant 50 ans chez des personnes unies par des liens de parenté au premier degré dans la même branche parentale par exemple, fait grimper la probabilité d'être porteur d'une mutation de prédisposition BRCA1 ou BRCA2 à plus de 33%, soit une chance sur 3.[35]

### **2. Quand penser à une prédisposition héréditaire ?**

Les indications d'étude des gènes BRCA 1/2 chez le cas index reposent sur un certain arbitraire qui est un compromis entre la probabilité d'identifier une mutation BRCA 1/2 et les capacités d'analyse



des laboratoires. L'expertise collective INSERM-FNCLCC sur la prise en charge des femmes à haut risque de cancer du sein parue en 1998 avait retenu qu'un test pouvait être proposé si la probabilité de prédisposition du cas index était d'au moins 25 % [36], ce qui correspond à une probabilité de détection d'une mutation comprise entre 10 et 16 % selon qu'il s'agisse d'une famille de type cancers du sein-seul ou cancers du sein et de l'ovaire (prise en compte de la contribution de BRCA à 95 % des formes dites héréditaires de cancers du sein et de l'ovaire et de 65 % pour les familles sein-seul et d'une sensibilité de détection de mutation de 70%).

Ces probabilités de prédisposition peuvent correspondre, à titre d'exemple, aux situations familiales suivantes :

1. au moins trois cas de cancer du sein ou de l'ovaire appartenant à la même branche parentale et survenant chez des personnes apparentées au premier ou au second degré ;
2. deux cas de cancer du sein chez des apparentées du premier degré dont l'âge au diagnostic d'au moins un cas est inférieur ou égal à 40 ans ;
3. deux cas de cancer du sein chez des apparentés du premier degré dont au moins un cas est masculin ;
4. deux cas chez des apparentées du premier degré dont au moins un cas a un cancer de l'ovaire.

Certains proposent une indication de test génétique devant les situations individuelles suivantes (absence d'histoire familiale de cancers du sein et/ou de l'ovaire) :

- a- association d'un cancer du sein et d'un cancer primitif de l'ovaire ;
- b- cancer du sein de type histologique médullaire (les formes médullaires sont 10 fois plus fréquentes en cas de mutation BRCA 1) ;
- c- diagnostic de cancer du sein très indifférencié (SBR3, RH-) chez une femme de 40 ans ou moins [37].

Le caractère bilatéral d'un cancer du sein n'est pas pris en compte, car le recul est insuffisant pour estimer la valeur prédictive de la présence d'une mutation. Lors de la mise à jour des recommandations de prise en charge des femmes à risque de cancer du sein publiée en janvier 2004, le seuil de 10 % de détecter une mutation BRCA 1/2 était toujours retenu [38]. Alors que l'expertise de 1998 décourageait de retenir comme cas index une personne qui était indemne de cancer du sein ou de l'ovaire, la mise à jour de 2004 retient l'indication d'une étude chez une femme dont l'histoire familiale est très évocatrice d'une prédisposition, en particulier s'il y a des antécédents de cancer de



l'ovaire. Si le résultat est négatif, il faut rester cependant prudent sur sa signification qui n'éliminera pas une prédisposition génétique sous-jacente.

Enfin, la mise à jour 2004 a proposé un score permettant d'orienter la personne vers la consultation de génétique. A notre sens, ce score peut aussi être utilisé comme base d'indication d'étude BRCA 1/2 cas index. Il est présent sur le tableau II [38].

**Tableau II : le score d'indication de consultation de génétique et par extension (selon le point de vue des auteurs) de l'indication des tests BRCA1/2 chez les cas index selon la mise à jour 2004 des recommandations de prise en charge des femmes à risque de cancer du sein.**

<b>T sein chez une femme avant 30 ans</b>	<b>4</b>
<b>T sein chez une femme entre 30 et 39 ans</b>	<b>3</b>
<b>T sein chez une femme entre 40 et 49 ans</b>	<b>2</b>
<b>T sein chez une femme entre 50 et 70 ans</b>	<b>1</b>
<b>T sein chez un homme</b>	<b>4</b>
<b>T ovaire</b>	<b>3</b>

**Addition de chaque point par cas de tumeur (T) sein (ou ovaire) si cas dans la même branche parentale 5 : excellente indication ; 3 ou 4 : Indication possible : 1 ou 2 : utilité médicale faible**

Concernant les tests chez les apparentées d'une famille où une mutation BRCA a été identifiée, il n'y a pas de limitation des indications de prescription. La limite de la prescription n'est pas liée aux capacités du laboratoire mais à la démarche active des apparentées. [38]

## **VII) Prévalence des mutations**

Dans la population générale, un individu sur 500 environ a été estimé « porteur » d'un allèle muté de BRCA1 ou de BRCA2, ce qui ferait de ce syndrome une des maladies génétiques les plus fréquentes. L'intervalle de confiance lié à cette estimation reste cependant large (1/200 à



1/900) [39]. La population d'origine ashkénaze a une fréquence plus élevée avec un taux de 2,4% en raison de la présence de 3 mutations fréquentes du fait d'effets fondateurs [40].

Une diminution du nombre de cancers canalaires par rapport aux contrôles avec une p value de 0,006 pour les altérations de BRCA1 et de 0,003 pour celles de BRCA2 a été observée. D'autre part, les adénocarcinomes canalaires des porteuses de mutation BRCA1 sont en général, d'un grade histologique plus sévère que les contrôles (p value <0,0001). Ceci s'explique par une augmentation hautement significative du nombre de mitoses (p value <0,0001) mais aussi du nombre de pléomorphismes nucléaires (p value= 0,006) en cas de tumeur en association avec une altération de BRCA1. [41]

Les cancers du sein chez les patientes porteuses d'une mutation dans BRCA1 sont plus souvent négatifs pour les récepteurs aux œstrogènes, à la progestérone et pour HER2 tandis qu'ils sont positifs pour la protéine p53 en comparaison avec des contrôles. [42]

### **VIII) Risques de cancers associés à une mutation BRCA**

Les estimations du risque cumulé (pénétrance) de cancer pour les femmes ayant une mutation constitutionnelle de BRCA1 ou de BRCA2 sont variables suivant le type et la population d'étude. Les risques sont de l'ordre de 40 à 80% de développer un cancer du sein à 70 ans pour BRCA1 et BRCA2 comparés à 8 % dans la population générale, de 20 à 60 % pour le cancer de l'ovaire et BRCA1 et de 6 à 27 % pour BRCA2 comparé à 1 % dans la population générale. Le tableau III résume ces données pour des études familiales qui donnent les risques les plus élevés et les études en population qui donnent, comme attendu, des risques plus faibles 2, 12, 13 et 14. Le risque ovarien lié à BRCA1 est nettement plus élevé avant 50 ans que celui associé à BRCA2. [43]



**Tableau III. Estimation des risques de cancer du sein et de l'ovaire suivant les types d'étude**

	Risque de cancer du sein à 50 ans, %	Risque de cancer du sein à 70 ans, %	Risque de cancer de l'ovaire à 50 ans, %	Risque de cancer de l'ovaire à 70 ans, %
Étude de ségrégation[2]	38	67		
Études familiales <i>BRCA1</i> [12]	73 (49-87)	87 (72-95)	29 (16-40)	44 (28-56)
Études familiales <i>BRCA2</i> [13]	28 (9-44)	84 (43-95)	0,4 (0-1)	27 (0-47)
Méta-analyse <i>BRCA1</i> [14]	38 (30-50)	65 (51-75)	13 (8-18)	39 (22-51)
Méta-analyse <i>BRCA2</i> [14]	16 (11-21)	45 (33-54)	1 (0-3)	11 (4-18)

## **IX. Génétique moléculaire :**

### **1. Apport des données de génétique moléculaire :**

Au-delà d'une classification purement clinique se profile un abord bioclinique des maladies. En effet, la localisation et l'isolement des gènes de prédisposition permettent de déterminer quels sont les phénotypes associés à tel ou tel gène (spectre d'expression tumorale), voire à des mutations particulières (corrélations génotype phénotype). [44]

On peut attendre de ces éléments, s'ils sont confirmés, une aide diagnostique (détermination des profils cliniques, identification des sujets à risque) et une aide pour l'orientation de la prise en



charge. A titre d'exemple, si l'on retrouve dans une généalogie des cancers du sein chez l'homme et peu ou pas de cancer de l'ovaire, on rechercherait en premier lieu une mutation germinale du gène BRCA2. A l'inverse, l'existence dans une famille d'un sujet présentant à la fois un cancer du sein et un cancer de l'ovaire est très en faveur d'une mutation constitutionnelle du gène BRCA1. De la même manière, l'identification d'une mutation germinale dans la partie proximale du gène BRCA1 ou dans la région "OCCR" de l'exon 11 de BRCA2 qui sont associées à un risque élevé de cancer de l'ovaire, seraient des arguments de poids dans la détermination des pratiques médicales à proposer.

Les études familiales ont permis d'individualiser un certain nombre de gènes impliqués dans la prédisposition génétique au cancer du sein dans le cadre des différentes présentations cliniques. Il existe clairement une hétérogénéité génétique, c'est-à dire que des gènes différents peuvent être à l'origine des mêmes syndromes. Ces travaux apportent une preuve moléculaire à l'existence d'une prédisposition génétique et permettent une meilleure définition du cadre nosologique en débouchant sur une définition bio-clinique des maladies.[\[45\]](#)

## **2. Les gènes BRCA1 et BRCA2 :**

### **a) Données épidémiologiques moléculaires et syndromes associés :**

Deux gènes majeurs de prédisposition aux cancers du sein et de l'ovaire, BRCA1 et BRCA2 [\[46\]](#), ont été isolés. L'existence d'un troisième gène BRCA3 est confirmée, il serait localisé sur le bras court du chromosome 8 [\[47\]](#). En ce qui concerne les deux premiers, un certain nombre d'études épidémiologiques et moléculaires ont permis d'estimer leur contribution respective et de déterminer les présentations cliniques associées, de même que le spectre d'expression tumorale qu'ils conditionnent. [\[45\]](#)

### **b) Présentations cliniques et proportions respectives associées aux différents gènes :**

BRCA1 est impliqué dans près de 50 % des familles de cancers du sein seul et dans la majorité des familles de cancers du sein et de l'ovaire, les cancers du sein chez l'homme y sont rares (Tableau IV).

Une étude récente portant sur 9 familles de cancers de l'ovaire seul retrouve également une association avec le locus BRCA1. Un travail collaboratif international explorant l'incidence des



cancers du sein et de l'ovaire dans les familles liées au gène BRCA1 suggère l'existence d'au moins deux types d'allèles, l'un prédisposant plus fortement que l'autre aux cancers de l'ovaire [47]

**Tableau IV : Contribution des gènes de la famille BRCA aux formes familiales de cancers du sein et de l'ovaire** (*sous le modèle CASH, d'après les données de Breast Cancer Linkage Consortium D.Ford et al., 1996, communication personnelle*) [48]

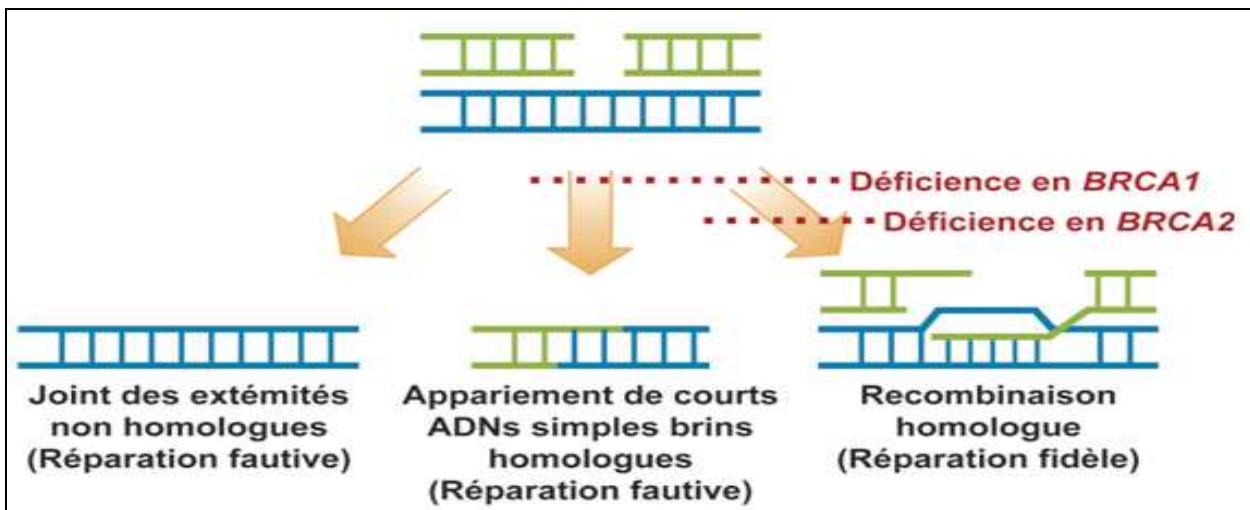
Type familiale (N=228)	BRCA1	BRCA2	BRCAx
Tous types de familles : cancer du sein (H+F) et ou de l'ovaire (N=228)	0.50	0.35	0.15
Cancer du sein (F) et /Ou de l'ovaire (N=203)	0.55	0.29	0.16
Familles avec cancers du sein chez l'homme (N=25)	0.21	0.76	0.03
Familles avec cancers de l'ovaire (sans cancer du sein chez l'homme) (N=86)	0.79	0.16	0.05
Familles de cancer du sein seul (N=117)	0.26	0.36	0.38
BRCA1	Risque de cancer du sein (%)	Risque de cancer de l'ovaire (%)	Age
Allèle 1	62	11	60
Allèle 2	39	42	60
			Proportion
Allèle 1	62	11	71%
Allèle 2	39	42	29%

**Tableau V**  
chez les suj

### c) Fonctions :

BRCA1 et BRCA2 sont associés par leurs fonctions apparentées, par exemple lors de la réparation de l'ADN, dans la régulation de la transcription et dans le remodelage de la chromatine [49] [50-51]. De plus, de nombreuses protéines retrouvées dans des complexes avec BRCA1 et BRCA2 sont impliquées dans différents cancers et maladies souvent associés à une instabilité génomique tout comme BRCA1 et BRCA2. En effet, les protéines BRCA1 et BRCA2 sont essentielles dans les mécanismes de contrôle de la recombinaison homologue (HR) ainsi que dans la réparation des cassures double brin de l'ADN (Figure 2). Ces gènes sont des suppresseurs de tumeurs agissant en tant que « caretakers » en maintenant la stabilité génomique par opposition à des « gatekeepers »

qui, lorsque leur expression est altérée, n'ont plus un contrôle normal de la division, mort ou durée de vie cellulaire promouvant ainsi directement l'expansion des cellules cancéreuses. L'absence des activités de la protéine BRCA1 ou BRCA2 causerait une instabilité génomique par l'augmentation de la fréquence des altérations chromosomiques telles que les bris double brins, l'aneuploïdie, l'amplification du centrosome, les réarrangements chromosomiques, les mutations, la duplication de chromosomes et la délétion de chromosomes (perte d'hétérozygocité) [52]. Ces bris peuvent altérer éventuellement des gènes impliqués dans le maintien de la structure chromosomique, la division et viabilité cellulaire ainsi que des gènes « gatekeepers » comme l'oncogène p53, favorisant alors l'évolution tumorale.[56] [53-54]



**Figure 2 : Instabilité chromosomique due à des réparations de bris d'ADN double brins inappropriées.**

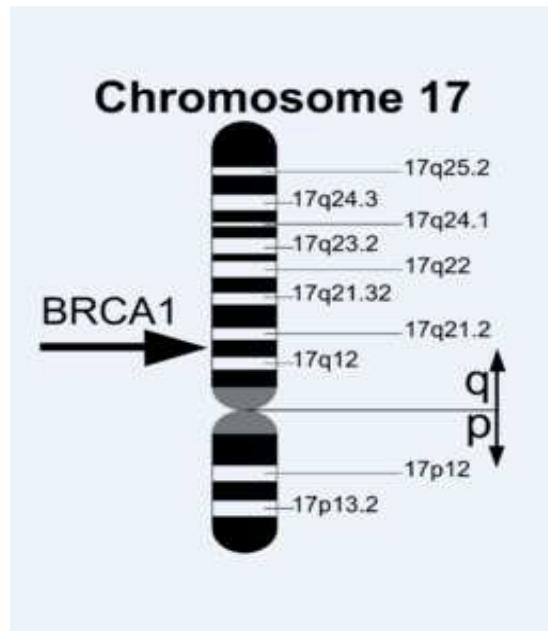
Un bris double brins de l'ADN de cellules de mammifères peut être réparé par trois mécanismes mais lorsque BRCA1 ou BRCA2 sont déficients, le processus de réparation par recombinaison homologue normalement favorisé n'est plus fonctionnel.

### **3. BRCA1 (Breast Cancer 1) :**

#### **a) Le gène :**

En 1990, l'équipe de Marie -Claire King localise un gène de prédisposition au cancer du sein sur le bras long du chromosome 17 grâce à des études de liaison.

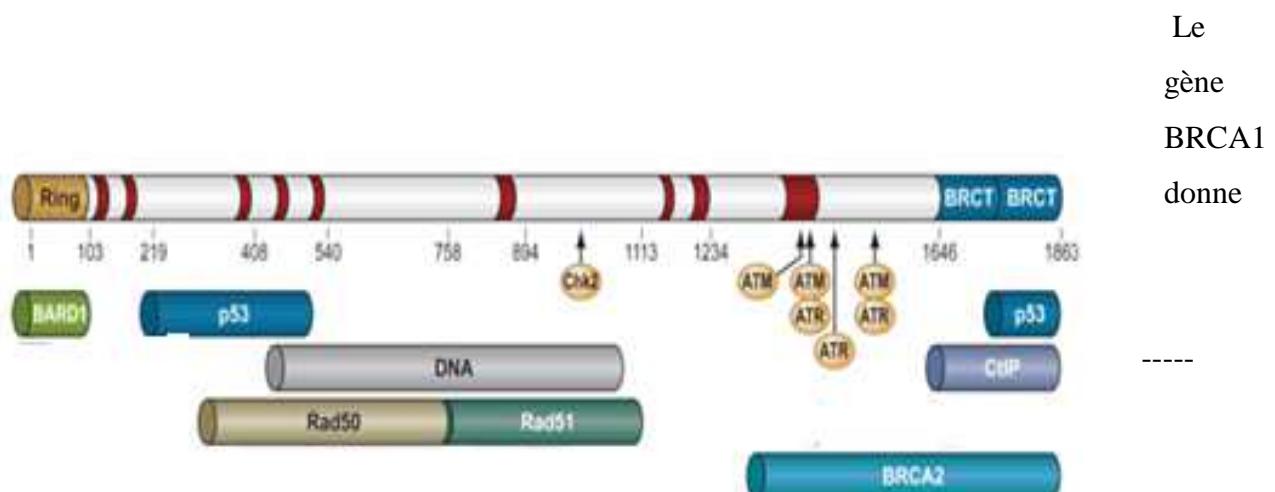
La liaison existant entre les marqueurs du chromosome 17 et l'apparition du cancer du sein et ou de l'ovaire met en évidence une transmission autosomique dominante dans les familles étudiées. En 1994, ce gène a été localisé en 17q21 et a été appelé BRCA1 pour Breast Cancer type 1 [46].



**Figure 3 : localisation du gène BRCA1 sur le chromosome 17 : (17q21)**

BRCA1 contient 24 exons qui sont composés d'un maximum de 250 nucléotides chacun à l'exception de l'exon 11 qui couvre 61% de la région codante du gène (3426 nucléotides (3,4 kb)). Il faut noter que les exons 1 et 4 ne sont pas codants. Au total, le gène comporte donc 22 exons codants.

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





naissance à un ARN messager d'une longueur de 7.8 kb. Cependant, un grand nombre de variants a été décrit (épissages alternatifs). Ainsi certains messagers ne comprennent pas l'exon 11, correspondant à plus de 50 % de la séquence codante [46, 55]. BRCA1 est exprimé dans de nombreux tissus (sein, ovaire, testicule, rate, thymus).

**Figure 4 : Représentation schématique de la séquence primaire de BRCA1.[56]**

En rouge : neuf régions conservées identifiées dans l'orthologue BRCA1 de poulet. Les principaux partenaires d'interactions de BRCA1 sont représentés ainsi que les sites de phosphorylation (flèches) de BRCA1. Adapté de Mark 2005.

**b) La région de l'exon 11 :**

La région de l'exon 11 est indispensable à plusieurs fonctions de la protéine BRCA1.

1. Principalement, elle détermine sa localisation intranucléaire comme en témoigne de la présence de NLS ou signaux de localisation nucléaire [57]
2. Le domaine de l'exon 11 participe à la recombinaison homologue permettant la réparation des lésions chromosomiques. Cette action est rendue possible par l'intervention de kinases sensibles aux lésions génotoxiques (par exemple ATM, impliquée dans l'ataxie télangiectasie et dans la prédisposition du cancer du sein). La protéine BRCA1 phosphorylée va ensuite activer des exonucléases (par exemple MRE11) aptes à scinder l'ADN double brin en simple brin aux sites de cassures, étape préalable à tout échange de chromatides sœurs.
3. L'exon 11 est également l'intermédiaire d'une dimérisation avec la protéine RAD51. La formation d'un complexe avec cette enzyme catalytique capable de se fixer sur l'ADN double brin ou simple brin aux sites de cassures, est une étape préalable à la réparation de ce dernier [58].
4. Les résidus 260 à 553 de l'exon 11 sont indispensables à la liaison avec BRG1, protéine porteuse d'une activité ATPase ADN dépendante et faisant partie du complexe SWI/SNF.

Ce complexe ne comporte pas moins de 26 protéines différentes. Il permet le remodelage de la chromatine par un mécanisme d'acétylation / déacétylation des histones [59]

5. Enfin, en interagissant avec le complexe MSH2/MSH6 du système de réparation des mésappariements (SRM), l'exon 11 permet à la protéine BRCA1 de reconnaître des lésions nucléotidiques. Cette interaction est suspectée par l'accumulation d'erreurs de mésappariements au sein des lignées cellulaires déficientes en BRCA1 [58]

### c) La protéine BRCA1:

BRCA1 code pour une protéine complexe de 190 kDa et de 1863 acides aminés [61]. Sa fonction est encore inconnue, mais des éléments en faveur de son rôle suppresseur de tumeur [63] et de son implication dans le contrôle de la prolifération cellulaire de l'épithélium mammaire en réponse aux stimulations hormonales [60, 61, 62], dans les phénomènes d'apoptose (mort cellulaire programmée) ainsi qu'une participation au contrôle de l'intégrité du génome ont été rapportés.



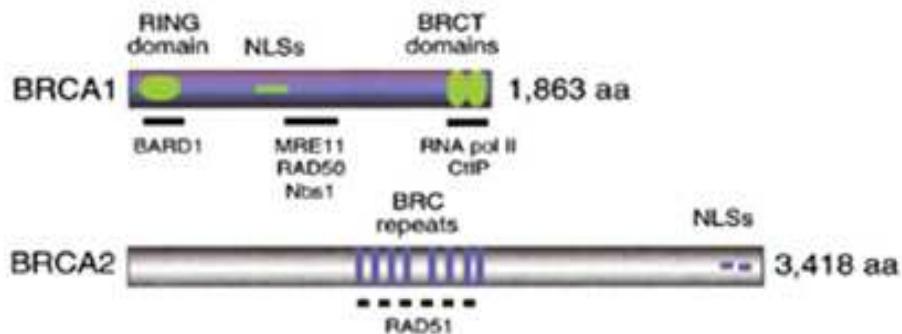
**Figure 5 : Éléments structuraux de la protéine BRCA1**

Deux motifs particuliers ont été retrouvés. D'une part, au niveau de l'extrémité amino- terminale, **un domaine de type RING finger** (C3HC4) [64, 65], qui suppose une fonction de régulation de l'expression d'autres gènes (activation de la transcription) ou d'interactions protéine-protéine [66]. D'autre part, **un motif de type granine**, dans l'exon 11 (acides aminés 1214 à 1223) (Figure 5), suggèrent une potentialité sécrétoire, mais ce dernier point est l'objet de vives controverses (Figure 5). Deux régions de forte conservation de séquence, entre l'homme et la souris, ont été retrouvées [67, 68] (Figure 6). Elles correspondent d'une part, au domaine RING finger et d'autre part, à une région de 160 acides aminés près de l'extrémité carboxy- terminale, distincte du motif granine.

#### Le motif RING



A l'extrémité 5' du gène, une interaction avec BARD1 via le motif RING, riche en cystéines et histidines stabilisées par un atome de zinc (doigt de zinc), a été identifiée. La nature et la fonction du complexe BRCA1/BARD1 doivent encore être établies de façon précise. Cependant, ce complexe pourrait jouer un rôle dans la maturation des ARNm qui serait transitoirement inhibée en cas de lésion de l'ADN [58]



#### **Les domaines BRCT :**

**Figure 6 : Caractéristiques de la protéine humaine du BRCA**

- BRCA1 contient un domaine N-terminal RING, les signaux de localisation nucléaire (NLS), et deux domaines BRCT en C-terminal de 110 résidus.
- BRCA2 contient huit répétitions des 40 résidus BRC motifs. Six des huit motifs de BRCA2 humain peut se lier directement à RAD51 lorsqu'elle est exprimée in vitro.

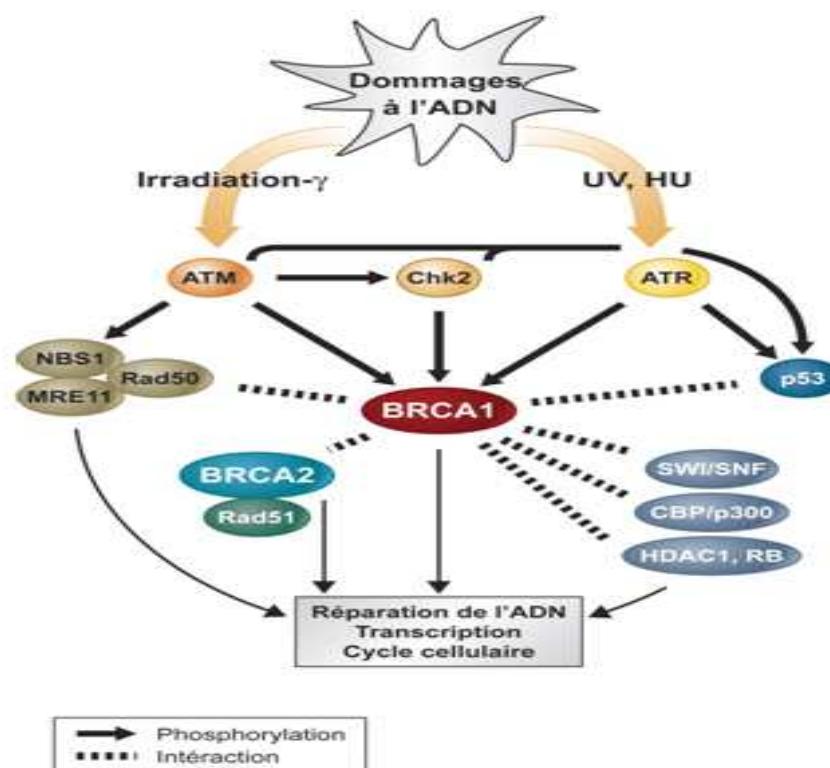
suppresseur de tumeur en modulant la transcription de l'anti-oncogène p53.[57]

#### **d) Principaux rôles :**

##### **Détection et réparation des dommages de l'ADN :**

Plusieurs éléments de preuve indiquent que BRCA1 est impliqué dans la réparation de l'ADN endommagé. Le premier est venu à partir des résultats que BRCA1 interagit avec trois protéines impliquées dans les voies de réparation des dommages d'ADN : RAD50, RAD51 et BRCA2.

BRCA1 non seulement interagit avec RAD51 [69] [70], mais elles se trouvent aussi colocalisées au niveau de structures intranucléaires où la réplication de l'ADN se produit après le traitement avec des réactifs endommageant l'ADN [71]. RAD51 est impliqué dans les réactions d'échange de brins d'ADN ATP-dépendante et est connue pour être un homologue de Rec A de levure, qui fonctionne dans la recombinaison homologue et la réparation des dommages de l'ADN. RAD51 interagit avec les gènes BRCA1 et BRCA2 pour former un complexe stable au cours de la réparation des dommages de l'ADN [72]. Un autre membre de la famille RAD, RAD50, interagit également avec BRCA1 à la fois *in vitro* et *in vivo* [73].



**Figure 7 : Fonction de la protéine BRCA1 en réponse aux dommages à l'ADN [84]**

### Réparation de l'ADN :

BRCA1 est impliquée dans la réparation de l'ADN par ses activités d'activation de la transcription de gènes de réparation par excision de nucléotides [74, 75, 76]. Suite à des dommages à l'ADN, BRCA1 stimule la liaison de p53 au promoteur de *DDB2*, ce qui active la transcription de ce gène produisant la petite sous-unité d'un hétérodimère (DDB) qui se lie à l'ADN endommagé



[77,78]. De plus, BRCA1 peut induire l'expression de GADD45 [79, 80,81] ainsi que le XPC, qui est un facteur de réparation des lésions de l'ADN induites par les UV.[78,82]

### **Remodelage de la chromatine et de la structure de l'ADN**

BRCA1 est impliquée dans les événements suivant un dommage à l'ADN puisqu'elle migre rapidement à ces sites où des histones phosphorylées y sont remodelées facilitant ainsi l'accès à cet ADN endommagé pour la machinerie de réparation [83] .

### **Duplication du centrosome**

BRCA1 serait aussi impliquée dans le processus de duplication du centrosome qui est un événement responsable de la ségrégation égale des chromosomes lors de la division nucléaire d'une cellule. En effet, la forme hypophosphorylée de BRCA1 est localisée aux centrosomes pendant la mitose et interagit (a.a. 504 à 803) avec la gamma-tubuline, composante majeure des microtubules nucléaires sur lesquels migreront les chromosomes lors de leur séparation [84, 85]. Lorsque la région d'interaction de BRCA1 avec la gamma-tubuline est tronquée (une partie de l'exon 11), on observe de multiples centrosomes, une ségrégation inégale de ceux-ci, une division nucléaire anormale et de l'aneuploïdie [86]

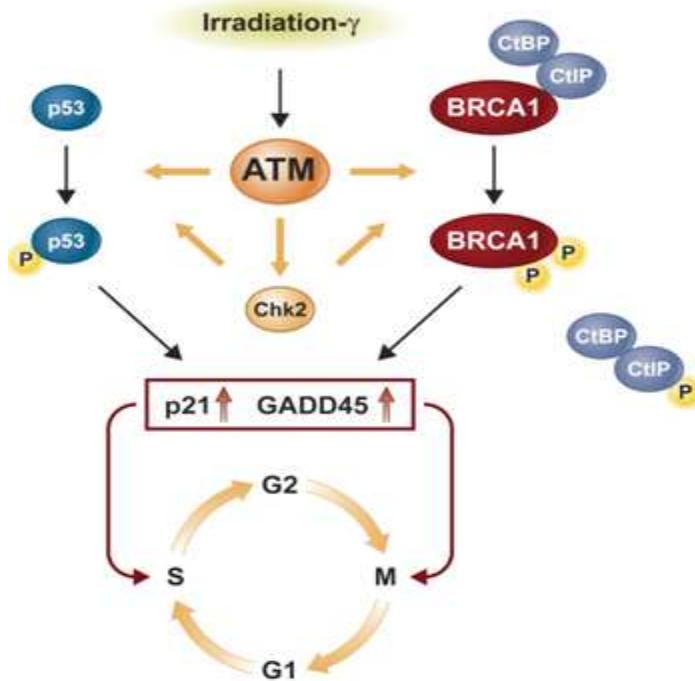
### **Régulation de la transcription**

Une large région en C-terminal de la protéine BRCA1 (a.a. 1293 à 1863) est impliquée dans la régulation de la transcription de nombreux gènes. De plus, les acides aminés 1650 à 1800 et 1560 à 1863 de BRCA1 interagissent respectivement avec l'ARN hélicase A et l'ARN polymérase II qui sont des composants de l'holoenzyme ARN polymérase [87, 88] (Figure 4). Cette capacité de moduler l'expression de gènes au niveau de la transcription est mise en évidence dans plusieurs fonctions de BRCA1 au niveau du cycle cellulaire et de la réparation de l'ADN. [89, 90, 91]

### **Contrôle du cycle cellulaire**

BRCA1 peut diriger la cellule vers l'apoptose [92] en activant d'une part la transcription de TNF-alpha, un signal extracellulaire majeur dans la mort cellulaire programmée [93], et d'autre part, en abolissant l'inhibition transcriptionnelle de GADD45[94,95]. Cette inhibition de GADD45 prévaut dans des conditions normales par l'interaction de BRCA1 (acides aminés 341 à 748) avec ZBRK1

appelé aussi KRAB (est une catégorie de domaines de répression de la transcription) sur une séquence dans l'intron 3 de GADD45 et elle est abolie par la dissociation du domaine BRCT de BRCA1 avec CtIP lorsque celui-ci a été phosphorylé par ATM104, [96,97, 98] (Figure 8).

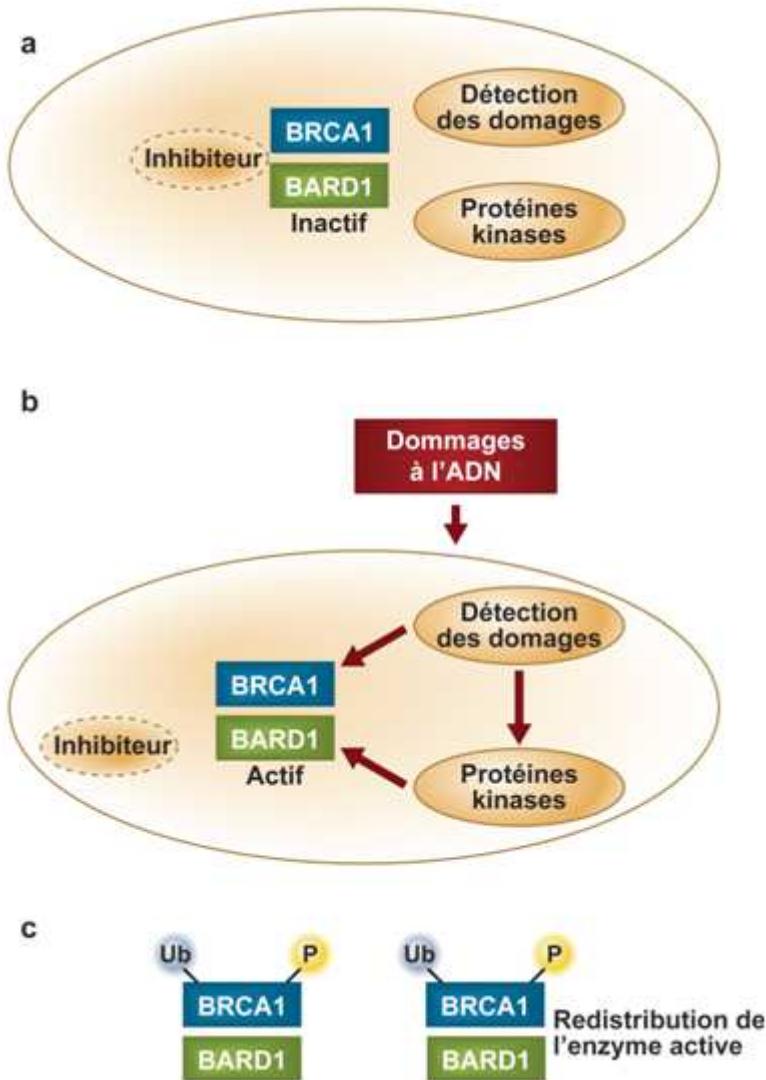


**Figure 8 : Rôle de BRCA1 dans la régulation de la transcription et le contrôle du cycle cellulaire après l'exposition aux radiations ionisantes.**

ATM est activée par ces irradiations et phosphoryle CtIP pour dissocier le complexe CtIP-CtBP-BRCA1. BRCA1 est alors libre et active p21 et GADD45. L'activation des points de contrôle du cycle cellulaire induit l'arrêt de la réplication pour permettre la réparation de l'ADN. [99]

### Ubiquitination

Le domaine RING de BRCA1 est le site d'hétérodimérisation de BRCA1 avec BARD1, qui a lui aussi un domaine RING et ensemble, ils ont une affinité pour les acides nucléiques (Figure 9).



**Figure 9 : Modèle de l'activation de l'hétérodimère BRCA1-BARD1 par les dommages à l'ADN.**

L'hétérodimère BRCA1-BARD1 s'associe avec les molécules qui peuvent reconnaître et se lier à différentes formes d'ADN endommagé (détecteur de dommages à l'ADN) telles que des protéines kinases. BRCA1-BARD1 est de base inactif en tant qu'ubiquitine ligase (b). La détection des dommages à l'ADN active BRCA1-BARD1 par des modifications comme la phosphorylation ou l'ubiquitination et/ou par le retrait de protéines inhibitrices. (c) L'enzyme activée est redistribuée à travers la cellule pour réaliser ses différentes fonctions effectrices dans la réponse aux dommages à l'ADN (remodelage de la chromatine, l'activation de la transcription, points de contrôle du cycle cellulaire et réparation de l'ADN). [56]



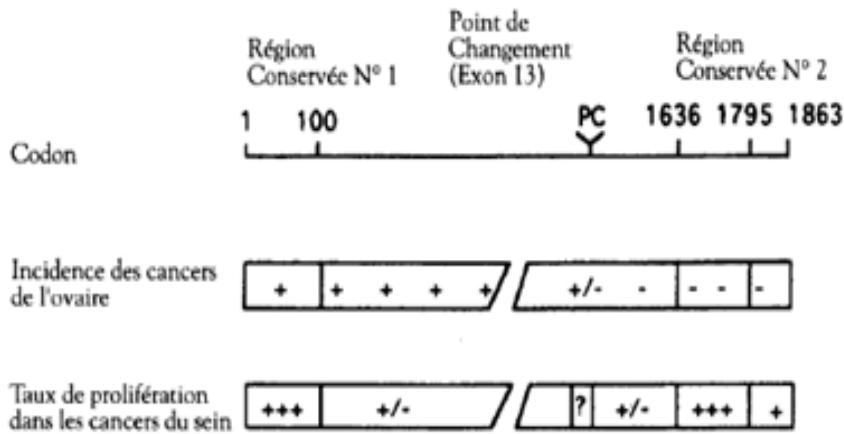
**e) Les mutations :**

Plus de 100 mutations germinales distinctes ont déjà été décrites. Elles sont dispersées tout au long de la séquence codante. Une banque de données internationale (BIC), où sont répertoriées la majorité des mutations constitutionnelles a été constituée. Seules quelques-unes d'entre elles peuvent être considérées comme récurrentes avec un ancêtre commun (effet fondateur), il s'agit de la mutation de l'exon 2: 185delAG retrouvée dans la population Juive Ashkénaz ce qui n'exclut pas que cette mutation soit retrouvée dans un contexte génétique autre, ou fréquentes, c'est-à-dire de même type mais d'origine différente, telles que la mutation de l'exon 20: 5382insC.

Plus de 80 % des mutations entraînent une troncation de la protéine (modification du cadre de lecture, mutation non-sens, ou altération de l'épissage). Pour les mutations faux sens il est souvent difficile de faire la part entre un variant neutre sans conséquence phénotypique et une mutation délétère. En conséquence, ne sont retenues comme pathogènes, que les mutations impliquant le domaine RING finger, les autres sont considérées, jusqu'à preuve du contraire, comme des polymorphismes. [45]

**f) Corrélation génotype phénotype :**

L'existence de différents syndromes (sein seul, sein ovarien, ovarien seul) ou phénotypes (cancers faiblement ou fortement prolifératifs), laissaient augurer de possibles corrélations entre le génotype (type de mutation) et le phénotype (manifestations cliniques). Ainsi, il a été observé que les mutations siégeant avant l'exon 13 du gène BRCA1 étaient associées à une plus grande incidence de cancers de l'ovaire. Ces données moléculaires sont à rapprocher de l'étude d'hétérogénéité génétique rapportée précédemment. Des analyses de transfection ont également montré que les mutations du gène BRCA1 entraînant une troncation de la protéine dans la région 5', étaient incapables d'inhiber la prolifération de lignées de cancers de l'ovaire, alors que l'allèle sauvage avait cette propriété. Cette région semble donc jouer un rôle "protecteur", ou tout au moins limitant, dans le développement des cancers de l'ovaire. [45]



**Figure 10: Résumé sur les connaissances actuelles concernant les corrélations entre le génotype et le phénotype dans les cancers du sein liés à BRCA1 (adapté de Sobol et coll, 1996)**

Il a également été retrouvée une corrélation entre le site des mutations germinales dans le gène BRCA1 et la prolifération des cancers du sein. Les mutations se produisant dans les deux régions conservées sont le plus souvent associées à des tumeurs hautement prolifératives (index mitotique 3) ( $p = 0.0024$ ) (Figures 10). A l'inverse, on retrouve plus fréquemment des tumeurs faiblement prolifératives lorsque les mutations touchent les régions variables.

#### **4. Le gène de prédisposition BRCA2 et sa protéine :**

Le gène BRCA2 est localisé sur le chromosome 13 en q1213 [100]. Il présente certaines similarités avec BRCA1 (par exemple la taille, la structure, l'expression tissulaire). Il s'agit d'un très grand gène comprenant 26 exons codants, avec 3 exons de grande taille dont l'exon 11, les deux autres étant les exons 10 et 27 [101]. Sa séquence est distribuée sur près de 70 kb d'ADN génomique et donne naissance à un transcrit de 10,4 kb. Il est exprimé dans les mêmes tissus que BRCA1.



**Figure 11 : Éléments structuraux de la protéine BRCA2.**

La protéine est constituée de 3418 acides aminés et sa fonction est encore inconnue. Des délétions impliquant le locus BRCA2 (analyse de pertes d'hétérozygotie) ont été retrouvées à la fois dans les cancers du sein héréditaires et sporadiques, ce qui apporte des éléments en faveur de son rôle suppresseur. Une séquence consensus de type granine a également été retrouvée dans la partie carboxy- terminale de la protéine (codée par l'exon 27). Cependant, comme pour BRCA1, son rôle est discuté [100,101].

## **5. Autres gènes de prédisposition aux cancers du sein et / ou de l'ovaire :**

### **a) Le gène p53**

Le gène p53, situé sur le bras court du chromosome 17, est le premier gène dont les mutations constitutionnelles ont été associées au cancer du sein. Des mutations germinales de ce gène ont été mises en évidence chez des sujets appartenant à des familles présentant un syndrome de Li et Fraumeni (SLF) [102, 103, 104]. Cependant, pour certaines familles typiques, aucune mutation n'a pu être identifiée, ce qui est en faveur d'une hétérogénéité génétique [105]. On peut très bien trouver une mutation germinale de p53 en l'absence d'un contexte évident de syndrome de Li et Fraumeni, notamment dans le cadre de familles de cancers du sein tardifs [106]. Une étude a récemment défini le profil des familles associées à des mutations constitutionnelles de p53 [105].

Le gène p53 est très fréquemment altéré au niveau somatique dans tous les types de tumeurs [107]. Il semble contrôler le cycle cellulaire de telle façon que la progression dans le cycle qui amène à la division cellulaire n'est possible que si l'intégrité du génome est respectée [108]. En cas de défaut, la protéine p53 arrêterait le cycle permettant une réparation, ou induirait la mort cellulaire. Un dysfonctionnement de p53 permettrait notamment à une cellule anormale de se diviser.

### **b) Le gène BRCA3**



Les agrégations familiales de cancers du sein ne relèvent pas toutes de BRCA1 et BRCA2. Une étude récente va dans ce sens et invoquerait un effet géographique dans la fréquence respective des différents gènes de prédisposition aux cancers du sein et de l'ovaire [109]. Les analyses de liaison génétique portant sur des familles françaises et allemandes sont en faveur d'une localisation de BRCA3 sur le bras court du chromosome 8 dans la région p12-21 [110]. Actuellement, les familles associées au locus 8p12-21 sont principalement de type cancer du sein seul, sans cancer du sein chez l'homme.

Des arguments supplémentaires, soulignant l'importance de ce locus, ont été apportés par l'analyse de l'ADN d'une série de cancers du sein sporadiques. Près de 50 % des tumeurs présentent une délétion de la région 8p12-21 [110].

**c) Le gène de la maladie de Cowden :**

Il est localisé sur le chromosome 10 [111], il s'agit du gène PTEN. Des analyses de liaison génétique réalisée pour des familles de cancer du sein non associées à BRCA1 et 2 ne sont pas en faveur de son appartenance à la famille des gènes BRCA et des délétions dans cette région sont rarement observées [112].

**d) Le gène AR (récepteur aux œstrogènes)**

Une mutation germinale du récepteur aux androgènes chez des hommes présentant à la fois des signes de résistance aux androgènes et un cancer du sein a été rapportée dans de rares familles atteintes du syndrome de Reifenstein [113]. Bien qu'il soit hautement probable qu'il y ait une relation de cause à effet entre ces mutations et le développement du cancer du sein dans ces agrégations familiales, une association fortuite ne peut être exclue, vue la rareté des observations.

**e) Les gènes hMSH2, hMLH1, hPMS1 ET hPMS2**

Le syndrome de Lynch ou HNPCC associe principalement des cancers d'origine digestive (côlon, estomac), des tumeurs gynécologiques (ovaire, endomètre) et des voies urinaires. La recherche de mutations constitutionnelles au niveau de ces gènes permettra de savoir si le cancer du sein fait partie du spectre d'expression tumorale. Des études préliminaires font état d'un spectre d'expression tumorale plus étendu pour hMLH1 que pour les autres gènes [114].

**f) Le gène ATM (Ataxie télangiectasie)**



Swift a émis l'hypothèse que les sujets hétérozygotes pour le gène ATM, donc ne présentant pas le phénotype ataxie télangiectasie, avaient un risque augmenté de développer des tumeurs communes, et notamment des cancers du sein [115]. Ils estiment que 3,5 à 7,5 % des tumeurs communes se développaient dans un tel contexte. Des délétions dans la région du locus ATM ont été retrouvées dans des cancers du sein sporadiques [116,117].

## **6) L'intérêt d'un diagnostic moléculaire d'une prédisposition génétique au cancer du sein et /ou de l'ovaire :**

Excepté la mise en évidence d'une mutation constitutionnelle, il n'existe pas d'examen spécifique capable de diagnostiquer une prédisposition héréditaire au cancer du sein.

Un test génétique de qualité couvrant l'ensemble des deux gènes connus BRCA1 et BRCA2, est indispensable à la prise en charge de ces patients. Il permettra d'une part, de confirmer le diagnostic de prédisposition héréditaire au cancer du sein chez le patient, permettant l'adaptation de traitement et la prévention et d'autre part, de proposer des diagnostics prédictifs pour les membres de sa famille. Cette approche consiste à rechercher la mutation associée à une prédisposition héréditaire au cancer du sein et ou de l'ovaire chez une personne apparentée au malade mais qui ne présente aucun symptôme. Le but est de pouvoir proposer au sujet porteur une surveillance attentive ou une thérapeutique adaptée et de rassurer le sujet non porteur de la prédisposition. [35]

## **7) Le diagnostic présymptomatique : démarche et intérêt**

Actuellement, aucune conclusion ne peut être portée sur le pronostic des cancers du sein associés à BRCA1 ou BRCA2, comparé aux formes sporadiques. En conséquence, il n'existe pas de raison pour envisager de traiter ces cancers de façon différente à stade égal des formes sporadiques. Il semble cependant que les cellules ayant une perte de fonction des gènes BRCA1 ou BRCA2 aient une sensibilité accrue aux rayonnements ionisants et aux chimiothérapies. [35]

Récemment une équipe marseillaise a mis en évidence des différences entre tumeurs liées à BRCA1 et tumeurs sporadiques. Les cancers du sein liés à BRCA1 sont plus volontiers précoces, de haut grade, avec des récepteurs hormonaux négatifs et rarement associés à une composante intra-canalaire, le type histologique médullaire semble être trouvé en excès [35]

Pour les cancers du sein liés à BRCA2, la survie à stade et âgeégaux est identique par rapport aux formes sporadiques. Les récepteurs hormonaux des cancers du sein liés à BRCA2 sont, à l'inverse de BRCA1, plus volontiers positifs, ce qui correspond aux données de notre deuxième famille.

## **8) Prise en charge**



La prise en charge a été largement discutée en France, mais du fait du caractère récent et du manque de recul de cette activité, les positions peuvent encore évoluer rapidement [118]. Les mesures proposées pour la prévention et le dépistage sont résumées dans la figure 13. La surveillance repose sur un examen clinique des seins dès l'âge de 20 ans, puis sur des examens annuels d'imagerie dès 30 ans, voire dès 25 ans dans certaines familles. L'IRM dont le bénéfice est bien démontré et malgré une spécificité moyenne qui s'améliore avec le temps, est l'avancée majeure des dernières années [119]. Elle permet une base de discussion plus équilibrée entre les propositions de surveillance et de prévention chirurgicale.

Prévention
<ul style="list-style-type: none"><li>• Mammectomie bilatérale</li><li>• Annexectomie bilatérale</li><li>• Pas d'AMM pour le tamoxifène en France</li></ul>
Dépistage sein
<ul style="list-style-type: none"><li>• Examen clinique 2 à 3 fois par an dès 20 ans</li><li>• Mammographie annuelle dès 30 ans</li><li>• Échographie mammaire annuelle dès 30 ans</li><li>• IRM mammaire annuelle (dans le cadre en France d'un PSIT : programme de soutien à l'innovation thérapeutique) (en évaluation au moment de l'expertise)</li></ul>
Dépistage ovarien
<ul style="list-style-type: none"><li>• Échographie pelvienne endovaginale et Doppler couleur une fois par an dès 35 ans</li></ul>

**Figure 13 :Mesures de prévention et dépistage des cancers du sein et de l'ovaire dans le cadre d'une mutation germinale BRCA1 [120]**

L'alternative chirurgicale, seule méthode aujourd'hui permettant de diminuer drastiquement le risque de cancer du sein [121], est adoptée par un petit nombre de femmes en France. Les préjudices douloureux, esthétiques, psychologiques, et sexuels sont cependant très mal évalués. Toute décision de ce geste doit être largement discutée et accompagnée par les différents intervenants. L'annexectomie prophylactique (l'ovariectomie seule ne peut être conseillée en raison du risque de cancer des trompes) est recommandée dès l'âge de 40 ans, voire 35 ans si le projet parental est accompli. Mais, en cas de mutation constitutionnelle BRCA2, étant donné le faible risque avant 50 ans, elle pourrait sans doute être effectuée plus tardivement. Comme dans la population générale, ce geste chirurgical diminue de 50 % le risque de cancer du sein, surtout s'il est pratiqué à un âge jeune (avant 45 ans) [122]. Le principal problème posé est la ménopause



---

induite précocement et qui ne peut être “substituée” en cas d’antécédent de cancer du sein. Chez une personne indemne, différentes solutions se discutent : du classique traitement substitutif à faible dose durant une périodescourte, qui ne semble pas éliminer le bénéfice de l’annexectomy prophylactique [123], à ses alternatives de traitement symptomatique des effets de la ménopause, dont la prévention et le traitement de l’ostéoporose. Quelle que soit la décision prise au cas par cas, l’information claire de la patiente est essentielle.

L’utilisation du tamoxifène (un modulateur sélectif des récepteurs des œstrogènes utilisé sous forme orale dans le cancer du sein) pour la prévention des cancers du sein chez les femmes à risque reste controversée. Quoi qu’il en soit, cette molécule n’a reçu aucune autorisation de mise sur le marché (AMM) en France. La stratégie optimale de prise en charge des femmes “à haut risque” reste à définir. Une analyse décisionnelle, étudiant les effets des différentes stratégies isolées ou combinées en termes de gain d’années de vie, en tenant compte de la qualité de vie, selon un modèle de Markov, conclut au meilleur gain pour la procédure mammectomie et ovariectomie. Cependant, si l’on tient compte des avis des patientes interrogées dans une étude hollandaise, la majorité opte pour une surveillance des seins couplée à une ovariectomie avant 40 ans [50].



Ce  
été réalisé  
laboratoire  
génétique  
et

mémoire a  
au  
de  
médicale

## OBJECTIF

d'oncogénétique au CHU Hassan II de Fès, où les analyses génétiques effectuées s'inscrivent dans le cadre d'un travail pluridisciplinaire entre le service d'oncologie et de gynécologie de CHU Hassan II de Fès.

Vu la fréquence élevée du cancer du sein, une consultation d'oncogénétique couplée à un test génétique devient indispensable pour permettre de proposer un diagnostic de prédisposition héréditaire au cancer du sein et/ ou de l'ovaire. Cette approche permettra d'offrir une meilleure prise en charge de cette population à risque (prévention du cancer du sein, sensibilisation des autres membres de la famille, dépistage précoce) tout en sachant qu'un cancer découvert au tout début peut être guérissable dans plus de 90% des cas.

A ce jour, seule l'identification d'une mutation germinale d'un gène de prédisposition (BRCA1 ou BRCA2) permet de confirmer le diagnostic d'un cancer du sein héréditaire avec des implications cliniques essentielles pour le patient et sa famille. En effet, la mise en évidence d'une mutation pathogénique chez un patient permet sa recherche à titre prédictif, chez les membres



---

asymptomatiques de sa famille. Les non porteurs de la famille pourront ainsi être rassurés et les porteurs être pris en charge et surveillés de manière efficace.

L'objectif de l'étude est d'évaluer l'importance du rôle que joue le gène BRCA1 dans la carcinogenèse de 22 patientes marocaines non apparentées, ayant toutes développé un cancer du sein et/ ou de l'ovaire et pour lesquelles un échantillon du sang avait été réceptionné dans notre laboratoire.

La sélection de ces 22 patientes s'est effectuée selon leur histoire personnelle et /ou familiale en retenant comme critères principaux :

- ✓ l'âge au diagnostic : les patients doivent avoir un âge moins de 50 ans.
- ✓ la présence d'autres tumeurs: en plus du cancer de sein, la patiente devrait présenter un autre type de cancer tel que celui de l'ovaire ou du colon.
- ✓ la bilatéralité du cancer du sein : les deux seins sont atteints du cancer.
- ✓ l'atteinte d'un sujet de sexe masculin : un homme atteint du cancer du sein, implique automatiquement que ce dernier est de type héréditaire.
- ✓ la présence de cas de cancers du sein et ou de l'ovaire chez au moins un apparenté du premier ou du second degré du patient.

Chacun de ces critères a été établi pour l'ensemble des patientes afin d'évaluer leurs impacts dans le dépistage des formes héréditaires et pour pouvoir dans le futur, repérer et sélectionner de façon plus efficace les familles porteuses de mutations germinales de BRCA1.

La stratégie moléculaire adoptée repose sur la recherche des mutations par la technique PCR suivie d'un séquençage bidirectionnel de l'exon 11 du gène BRCA1, dans le but de rechercher des mutations germinales responsables du cancer du sein et / ou de l'ovaire chez les familles marocaines.



## *Matériel & méthodes*

### A-Matériel

#### 1. Echantillonnage

##### a. Critères d'inclusion :



Dans ce travail, des patientes marocaines présentant les symptômes cliniques du cancer du sein et les critères d'inclusion ci-dessous ont été recrutées.

- 3 cas ou plus de cancer du sein ou de l'ovaire dans la même branche familiale, un cas étant apparenté au premier degré aux deux autres, ou au deuxième degré en transmission paternelle.
- 2 cas de cancer du sein ou de l'ovaire déclarés avant l'âge de 35 ans chez les apparentés au premier degré entre eux.
- l'âge au diagnostic (avant 50 ans),
- la présence d'autres tumeurs, la bilatéralité du cancer du sein,
- l'atteinte d'un sujet de sexe masculin

Les tableaux VI, VII, IIX et IX regroupent les principales informations cliniques justifiant l'analyse moléculaire du gène BRCA1 chez les 22 patientes atteintes du cancer du sein héréditaire.

**b. Patientes**

**Tableau VI : Données cliniques personnelles et familiales des 22 patientes sélectionnées**



	Famille 1	Famille 2	Famille 3	Famille 4	Famille 5	Famille 6
Age	36	49	36	25	33	42
Antécédent familiaux	Tante mat : C. Sein	*Sœur, tante pat + grand mère pat : C. colon *Père, oncle : C. hépatique	*Tante : C. S *Cousine Pat : C. S Tante mat : C de l'Os	*Sœur : C. colon *Frère : ostéosarcome *Tantes mat. C.S + Ccérébrale	*Cousine : tumeur osseuse	3 cousines mat : C. Sein
Cancer du sein Bilatéral	Non	Non	Non	Non	Non	Non
Cancer du sein gauche	Non	Non	Oui	Oui	Non	Oui
Cancer du sein droit	Oui	Oui	Oui	Non	Oui	Non
Taille de la tumeur	25 mm	-	QSE : 1,5cm QIE : 2cm		2 / 1,5/1,5cm	5x3x3 cm
Diagnostique histologique	CCI	CCI	CCI	CCI	CCI	CCI
Cancer du sein inflammatoire	Non	-	Non	Non	Non	Non
SBR	III	-	II	II	II	II
Chirurgie	Tumorectomie + Patey droit	mastectomie	mastectomie	Patey	Pyramidectomie + chirurgie	Patey
Radiothérapie	Non	-	Non	Oui	Non	Non
Chimiothérapie	Oui	-	Oui	Oui	Oui	Oui
Présence d'autres cancers	Non	C. colon C. endomètre	Non	Non	Non	C. de l'ovaire

**N.B :** CCI = Carcinome canalaire infiltrant

**Tableau VII : Données cliniques personnelles et familiales des 22 patientes sélectionnées (suite)**

	7	8	9	10	11	12
Age	34	41	40	42	38	50
Antécédents familiaux	*Sœur : C. d'estomac *Mère : C. poumon		*Père+oncle : C. pancreas	*2 Sœurs : cancer du sein	*Sœur et tante mat : cancer du pat décédées par C.	*Tante mat + 3 tantes



			*Oncle :C. estomac *2tantes+cousin e pat :C.sein	sein	sein métastatique *cousine mat +grd mère mat : stade métastatique	
Cancer du sein Bilatéral	Oui	Oui	Non	Non	Non	Oui
Cancer du sein gauche	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Cancer du sein droit	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Oui
Taille de la tumeur	-	SD :4x2.5c m SG :3.5x2c m	-	-	17x14x3cm	-
Diagnostique histologique	SG : CCI SD :carcinome lobulaire infiltrant	Hyperplasie canalaire et lobulaire simple	CCI	CCI	CCI	CCI
Cancer du sein inflammatoire	-	-	-	-	-	-
SBR	SG : I SD : I	SD : I SG : II	-	II	I	-
chirurgie	Tumorectomie	Patey droit Patey gauche	-	-	mastectomie	Zonectomie
radiothérapie	-	-	Oui	-	-	-
chimiothérapie	-	Oui	Oui	Oui	-	-
Présence d'autres cancers	Non	Non	Non	Non	Non	Non

**N.B :** CCI = Carcinome canalaire infiltrant

**Tableau IIX : Données cliniques personnelles et familiales des 22 patientes sélectionnées (suite)**

<b>Age</b>	22	22	-	30	43	35
<b>Antécédent familiaux</b>	*2 tante mat+cousine mat :C.S *1 tante mat :C de cerveau *Oncle pat :lymphome	Mère et tante mat :C.S	-	RAS	RAS	RAS
<b>Cancer du sein Bilatéral</b>	Oui	-	-	Non	Non	Non



Cancer du sein gauche	Oui	-	-	Oui	Oui	Non
Cancer du sein droit	Oui	-	-	Non	Non	Oui
Taille de la tumeur	SD :6,5 à 18x17 mm SG :8,2 à 28 x12 mm	-	-		1,5/1,2/1,1 cm	-
Diagnostique histologique	Fibroadénome juvénile	CCI	CCI	CCI	CCI	CCI
Cancer du sein inflammatoire	Non	Non	Non	Non	Non	-
SBR	III	-	-	I	III	II
chirurgie	Non	-	-	Non	Tumorectomie du SG	Patey
radiothérapie	-	-	-	Non	-	-
chimiothérapie	-	-	-	Oui	Non	Oui
Présence d'autres cancers	Non	Non	Non	Non	Non	Non

N.B : CCI :carcinome canalaire infiltrant

**Tableau IX : Données cliniques personnelles et familiales des 22 patientes sélectionnées (suite)**

	Famille	Famille	Famille	Famille
	19	20	21	22
Age	35	8	25	
Antécédent familiaux	*Oncle :C. estomac	-	*Tante mat :C. sein *Mère : C colon * 2 oncles mats : 2 neo solides	*Mère+cousine mat+demi sœur :C. S *Père :C. estomac
Cancer du sein Bilatéral	Non	-	Non	Non



---

Cancer du sein gauche	Non	-	Oui	Oui
Cancer du sein droit	Oui	-	Oui	Non
Taille de la tumeur	2.5cm	-	-	-
Diagnostique histologique	CCI	CCI	CCI	CCI
Cancer du sein inflammatoire	-	-	-	Non
SBR	II	-	-	-
chirurgie	Non	-	-	Non
radiothérapie	Oui	-	Oui	Non
chimiothérapie	Oui	-	Oui	Non
Présence d'autres cancers	Non	-	Non	Non

---

**N.B : CCI = Carcinome canalaire infiltrant**

## **B- Méthodes :**

### **1. Stratégie du travail :**



Notre travail repose sur l'extraction d'ADN à partir du sang total des différentes patientes, suivie d'une quantification par dosage spéctrophotométrique. L'ADN extrait est amplifié par la suite par la technique de PCR (pour amplification du gène BRCA1) et séquencé pour identifier les mutations recherchée.

## **2. Prélèvement sanguin et conservation :**

Pour chaque patiente de la série d'étude, un prélèvement de sang veineux a été réalisé (3 à 5 ml) dans un tube EDTA (Ethylène Diamine Tétra-acétique acide) puis stocké à +4°C. Les prélèvements restent anonymes et les sujets ne peuvent en obtenir aucun bénéfice personnel.

Le patient doit aussi signer une fiche de consentement éclairé ([Annexe 1](#)), dans laquelle il exprime son accord d'utiliser ce prélèvement dans l'étude.

## **3. Extraction d'ADN**

### **3.1 Extraction d'ADN par sel à partir du sang total (salting-out)**

#### **a. Principe**

L'ADN utilisé, comme matrice d'amplification pour les réactions PCR, a été extrait par la technique classique de salting-Out. Le sang doit être initialement et vigoureusement mélangé à une solution hypotonique pour faire éclater les globules rouges. Le lysat est centrifugé et après élimination du surnageant, le culot cellulaire, contenant les leucocytes, est traité par une solution de lyse des Globules blancs (SLB) contenant la protéinase K. (enzyme qui digère les protéines cellulaires). Les protéines seront par la suite éliminée par l'intermédiaire d'une force ionique du NaCl (5 M) et la précipitation de l'ADN génomique est effectuée en utilisant une solution d'éthanol absolu à froid (-20 °C).

#### **b. Réactifs nécessaires :**

- Tris-EDTA 20 mM / 5 mM
- Tris-EDTA 10 mM /1 mM



- ◆ SLB à +42°C ([Annexe2](#))
- ◆ Protéinase K 10 mg/ml
- ◆ Na Cl 5 M
- ◆ Ethanol 75% à +4°C
- ◆ Eau Distillé stérile

**c. Protocole expérimental :**

L'extraction d'ADN est réalisée à partir du sang total, conservé dans un tube EDTA et stocké à -20°C. Une décongélation de l'échantillon est donc nécessaire.

**i. Lyse des globules rouges**

Une fois décongelé, le sang est récupéré dans un tube de 15 ml, traité avec deux volumes du tampon d'extraction TE 20/5 (V/V), puis incubé dans la glace pendant 20 mn. Ces étapes permettent la lyse des globules rouges. Après incubation, une centrifugation à 2500 tr/mn pendant 5 mn est réalisée, et le surnageant est ensuite éliminé.

Les étapes précédentes sont répétées (ajout de deux volumes de TE 20/5, incubation.....) jusqu'à l'obtention d'un culot blanc ne renfermant que les globules blancs.

**ii. Lyse des globules blancs**

Le culot est suspendu dans 3 ml de SLB (Solution de lyse des globules blancs), puis 100 µl de protéinase K (10mg/ml) sont additionnés. L'incubation dure une nuit sous agitation douce à 42°C.

**iii. Dénaturation et précipitation des protéines et impuretés**

Après l'incubation, 4 ml d'eau distillée stérile et 4 ml de NaCl 5 M sont ajoutés, le tube est par la suite homogénéisé, puis centrifugé à 3000 tr/mn pendant 30 mn.

**iv. Précipitation et lavage de l'ADN**

Le surnageant est récupéré dans un nouveau tube de 50 ml, auquel deux volumes d'éthanol absolu froid sont ajoutés. Après homogénéisation, "la méduse" d'ADN se forme dans le tube. Cette dernière sera récupérée dans un tube eppendorff de 1.5 ml, puis lavée à l'éthanol 75%.



Après évaporation pour éliminer toute trace de l'éthanol, l'ADN est dilué dans 200 µl de TE (Tris-EDTA) puis stocké à +4°C pour toute utilisation ultérieure (pour un stockage prolongé il est préférable de conserver l'ADN à -20°C).

#### **4. Dosage de l'ADN extrait:**

La quantité d'ADN extraite est déterminée par spectrophotométrie. Les protéines absorbent à 280 nm alors que les acides nucléiques absorbent à 260 nm. Une unité de densité optique à 260nm correspond à 50 µg/ml d'ADN double brin. La valeur de l'absorbance à 280 nm permettra de déterminer toute contamination protéique. L'extrait d'ADN sera considéré comme pur si le rapport A260/A280 est compris entre 1.8 et 2.

Au laboratoire, le « NANODROP » (figure 13) est utilisé pour réaliser le dosage. Il suffit de déposer dans l'appareil 2µl d'ADN extrait pour déterminer sa concentration et obtenir la courbe qui renseigne sur sa pureté ([Annexe3](#)).



**Figure 13 : Spectrophotomètre NANODROP**

#### **5. Amplification du gène BRCA1 (exon 11) par réaction de polymérisation en chaîne**

Les mutations germinales du gène BRCA1 localisées au niveau de l'exon 11 recherchées et qui confèrent un risque accru du cancer du sein et du cancer de l'ovaire chez les familles marocaines sont les suivantes :



**Tableau X : Les différentes mutations recherchées au niveau du gène BRCA1.**

MUTATION	EXON	GENE	ARTICLE
c.798-799delTT/917delTT	11	BRCA1	(TAZZITE &al., 2012) [123]
c.2805delA/2924delA	11	BRCA1	(TAZZITE &al., 2012) [123]

### **5.1 Choix des amorces:**

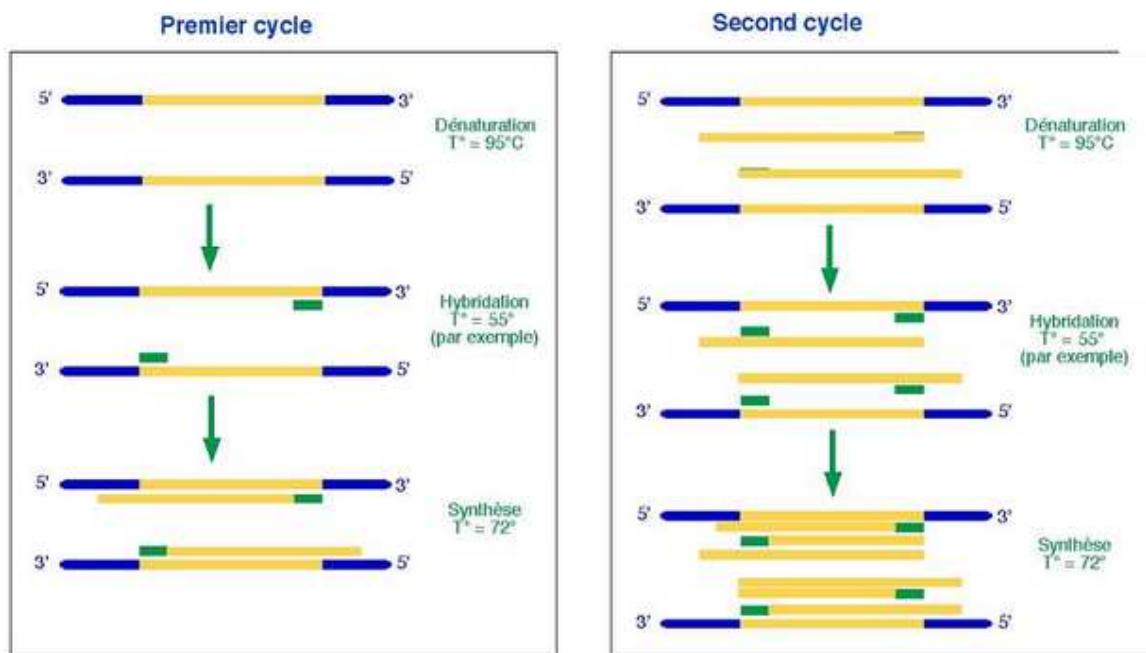
Dans le but de rechercher les différentes mutations germinales, une réaction de polymérisation en chaîne a été mise au point.

Les séquences d'amorces, utilisées pour la recherche des mutations c.798-799delTT /917delTT, c.2805delA/2924delA, dans l'exon 11 du gène BRCA1 sont celles établies dans une thèse scientifique qui concerne le dépistage des mutations du gène BRCA1 des patientes atteintes du cancer du sein et /ou de l'ovaire [124]. Les séquences ont été vérifiées par alignement avec le programme BLAST.

### **5.2 Technique de PCR :**

#### **a. Principe :**

La PCR permet d'obtenir un grand nombre de copies du fragment à étudier. L'utilisation de la Taq polymérase, purifiée à partir de *Thermus aquaticus*, a simplifié les protocoles. Elle permet d'amplifier une région précise de l'ADN grâce à deux amorces d'orientation opposée et complémentaires de la séquence adjacente à la région cible. Cette réaction permet d'amplifier un fragment d'ADN par une succession de cycles de dénaturation de l'ADN, d'hybridation des amorces et d'elongation pendant lesquelles la Taq polymérase assure la réPLICATION de la séquence entre les deux amorces (figure14).



L'ADN génomique est représenté en bleu. La région de l'ADN génomique que l'on souhaite amplifier est représentée en jaune. Les amores de PCR (oligonucléotides sont représentées en vert.

**Figure 14 : les étapes de la réaction de polymérisation en chaîne**

### b. Réactifs nécessaires

- La Taqpolymérase est une protéine recombinante de 94 kDa, isolée de la bactérie *Thermusaquaticus* et clonée dans *E.Coli*. Une unité de Taq correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour transformer 10 nmoles de dNTP en matériel acide insoluble. La concentration de la Taq utilisée est 5 unité/ $\mu\text{l}$ .
- Tampon d'enzyme 10X (Kit Proméga)
- Solution de MgCl<sub>2</sub> (25mM) (Kit Proméga)
- La solution de dNTP constituée de dATP, dTTP, dGTP, dCTP (100mM pour chacun)
- L'eau recommandée pour la PCR doit être de qualité ultra pure.
- Les amores sont fournies à l'état lyophilisé, elles seront reconstituées avec du Tris-EDTA (TE) pour avoir une solution mère de 200pmol/ $\mu\text{l}$ , puis une dilution avec de l'eau ultra pure est réalisée afin d'obtenir une solution finale de 10  $\mu\text{M}$ .



### c. Milieu réactionnel et programme de PCR

Tous les éléments nécessaires à la réaction de PCR sont regroupés dans un tube eppendorf qui sera soumis aux différentes températures. Ces cycles de température sont réalisés automatiquement dans un thermocycleur.



**Figure 15 :**

**Thermocycleur Applied Biosystem 2700.**

L'amplification est effectuée en 35 cycles qui sont précédés par une étape de dénaturation de 6 mn à 94°C.

Chaque cycle est constitué d'une étape de dénaturation (45s) à 94°C, d'une étape d'hybridation (30s) à une température spécifique et d'une étape d'extension (30 s) à 72°C.

Les températures d'hybridation déterminées pour chaque couple d'amorces sont mentionnées dans les Tableaux XI et XII.

Les 35 cycles d'amplification sont suivis d'une étape d'elongation de 10 min à 72°C, qui permet à la Taq polymérase de terminer la synthèse des brins qu'elle n'a pas eu le temps de finir pendant les cycles précédents. La PCR est réalisée automatiquement dans un thermocycleur Applied Biosystem 2700 (Figure 15).



**Tableau XI: Conditions de la réaction de PCR en utilisant le couple d'amorce**  
**BRCA1 11-1R/F**

Taille de l'amplifiat		Amorce 1Forward (5'>3')		Amorce 1Revers (5'>3')			
404pb		5'-GCCAGTTGGTTGATTCCACC -3'		5'-CCTTACTTCCAGCCCCATCTG -3'			
<b>Conditions expérimentales</b>				<b>Programme PCR</b>			
Réactif	Concentration	V (μl)	Etape	T (°C)	Temps	Cycles	
Tampon	5 X	4	Dénaturation initiale	94 °C	6 min	1	
MgCl2	25 mM	4					
dNTP	10 mM	1	Hybridation	60°C	30 s		
Amorces 11-1	11-1 F	10 mM	2				35
	11-1 R	10 mM	2				
H2O	Qsp	10,6	Elongation	72°C	30 s		
Taq	5 u/μl	0,4μl					
ADN	60 ng/μl	1	Elongation finale	72°C	10 min	1	



**Tableau XII : Conditions de la réaction de PCR en utilisant le couple d'amorce BRCA1 11-2R/F**

Taille de l'amplifiat		Amorce 1Forward (5'>3')		Amorce 1Revers (5'>3')	
404pb		5'-GGGACTAATTGTTGTTCC-3'		5'-CCTAGAGCCTCCTTGATAC-3'	
<u>Conditions expérimentales</u>			<u>Programme PCR</u>		
<u>Réactif</u>	<u>Concentration</u>	<u>V (µl)</u>	Etape	T (°C)	Temps
Tampon	5 X	4			
MgCl2	25 mM	4	Dénaturation initiale	94 °C	6 min
dNTP	10 mM	1			
Amorces 11-2	11-2 F	10 mM	2	94°C	45 s
	11-2 R	10 mM	2		
H2O		Qsp	10,6	60°C	30 s
Taq		5 u/µl	0,4µl		
ADN		60 ng/µl	1	Elongation finale	72°C
				10 min	1

### 5.3 Visualisation des produits PCR :

#### a. Principe:

Le contrôle des produits amplifiés se fait par électrophorèse sur gel d'agarose. L' ADN est une macromolécule chargée négativement, de ce fait, elle peut migrer dans un champ électrique de la cathode (-) vers l'anode (+) dans un tampon de migration (TAE ou TBE).

Les échantillons sont mélangés au bleu de bromophénol, colorant qui possède une masse moléculaire faible et qui permet de détecter le front de migration.



Lors de la préparation du gel d'agarose, le BET (Bromure d'éthidium), agent intercalant qui se fixe entre les bases nucléiques à l'intérieur de la double hélice, est ajouté. Cette molécule est fluorescente sous UV et permet de détecter les fragments d'acide nucléiques.

**b. Réactifs nécessaires (Annexe 2)**

- ♣ Poudre d'agarose
- ♣ TBE 1X
- ♣ BET
- ♣ Solution de charge

**c. Protocole expérimental**

Dans un premier temps, un gel d'agarose de 2% est préparé (1g d'agarose + 50ml de TBE 1X). Après ébullition et addition de 2µl de BET, le gel est coulé dans un moule, on y installe un peigne qui sera retiré après refroidissement du gel en laissant à sa place des puits où sera déposé l'ADN.

Après refroidissement, le moule est ensuite installé dans une cuve remplie du tampon de migration (TBE 1X). Dans chaque puits un mélange de 5 µl de produit PCR et de 2 µl de solution de charge sont déposés. La migration est réalisée à 100 V et les bandes d'ADN fluorescentes sont visualisées sous UV.

**6. Séquençage du gène BRCA1 :**

**6.1 Principe :**

Le séquençage est un procédé qui permet d'obtenir la séquence nucléotidique exacte d'un fragment d'ADN. Initialement appliquée par Fréderick Sanger, cette technique a reconnu depuis, un énorme progrès consistant en l'utilisation de kits spécifiques, marquage par quatre types de fluorochromes, automatisation du processus...

Avant de procéder au séquençage proprement dit, il est nécessaire de passer par des étapes de préparation du produit à séquencer afin d'obtenir un résultat optimal.

**a) Purification par ExoSAP®(ExoStar 1-Step)**



ExoStar 1-Step est conçu pour une purification rapide et efficace des produits de PCR. Il comporte deux enzymes hydrolytiques, l'exonucléase I (Exo I) qui dégrade les ADN simples brins et la phosphatase alcaline de crevette (SAP) qui hydrolyse les dNTPs libres et en excès, sans interférence avec les applications en aval. L'enzyme est active à 37°C et inactive à 80°C. Les fragments simples brins inférieurs à 100pb sont ainsi dégradés.

### Protocole expérimental

Dans un tube eppendorff de 0.2 ml, un volume de 2,5 µl de la solution ExoSap est mis en présence de 5,5 µl du produit PCR. Le mélange réactionnel est déposé dans le Thermocycleur. Le programme spécifique de l'ExoSap suivant est lancé (Tableau XIII).

**Tableau XIII: Programme de l'ExoSap**

Stade	Température	Temps	cycles
1	37°C	15 mn	1
2	80°C	15 mn	1
3	10°C	∞	1

### b) Réaction de séquence par BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing

La réaction de Sanger repose sur l'incorporation aléatoire par l'ADN polymérase, de didéoxynucléotides interrupteurs de chaîne (ddNTP) présents dans le milieu réactionnel et dont chacun est marqué par un fluorophore spécifique possédant un spectre d'émission spécifique. Une analyse spectrale va différencier les différents fluorochromes associés à la base correspondante et donc définir la séquence nucléotidique du brin d'ADN initial. Les fragments d'ADN synthétisés portent ce fluorophore terminal. On les appelle des terminateurs d'elongation ou "BigDyeTerminators" ou "Dye-labeledterminator".

La technologie BigDyeTerminator (BDT) utilise un système de transfert d'énergie par résonance (FRET) entre deux fluorochromes fixés sur le même ddNTP et reliés entre eux par un linker. Le premier est une fluorescéine (6 carboxyfluorescéine) appelé fluorochrome donneur,

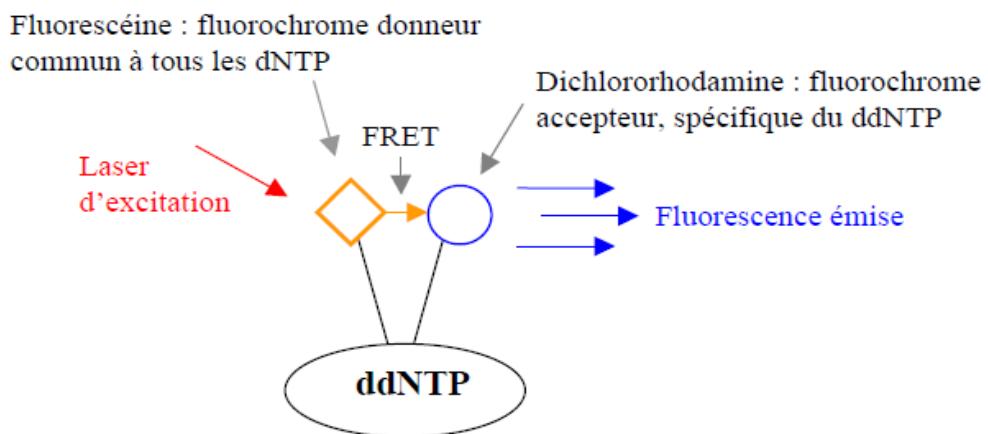


commun aux quatre ddNTP, le second est une dichlororhodamine (dRhodamine) qui joue le rôle de fluorochrome accepteur.

Le fluorochrome donneur est excité par un rayon laser à argon dont la longueur d'onde se situe entre 488nm et 514,5nm. Son énergie de fluorescence émise (515-520nm) est captée intégralement par le fluorochrome accepteur qui est excité à son tour. Le fluorochrome accepteur ou dichlororhodamine est différent pour chaque type de ddNTP.

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

Le spectre de la fluorescence réémise sera ainsi spécifique de chaque type de ddNTP. Le transfert du signal de la fluorescéine vers la dRhodamine permet une amplification de ce dernier et par conséquent, une augmentation de la sensibilité de la technique (figure 16).



**Figure 16 : mécanisme de la fluorescence par la technique du transfert d'énergie par résonance.**



25 cycles d'amplification sont effectués dans le thermocycleur avec des conditions spécifiques à la réaction de séquence. Un cycle correspond à :

- **Une étape de dénaturation de l'ADN** à 96°C pendant 10 secondes, pour obtenir l'ADN sous forme simple brin.
- **Une étape d'hybridation** à 50°C pendant 5 sec (température moyenne d'hybridation pour la majorité des amorces utilisées).
- **Une étape d'elongation de l'ADN** par la taq polymérase à 60°C pendant 4 min. Cette température faible ralentit la Taq et va déplacer l'équilibre pour permettre une meilleure incorporation des ddNTP. Une fois l'étape de thermocyclage effectuée, il est nécessaire de purifier la réaction de séquence.

#### i. Réactifs nécessaires

- Kit de la réaction de séquence ABI®BigDye® Terminator V1.1 cycle sequencing Kits qui contient principalement:
  - Taq polymérase
  - dNTP
  - ddNTP marqués
  - tampon
  - MgCL2
- Produit PCR purifié
- Amorces spécifiques
- Eau stérile
- 

#### ii. Protocole expérimental

- Le mix préparé est illustré dans le tableau XIV, 2 tubes sont préparés pour chaque patient.
- 

**Tableau XIV: Volumes des réactifs du mix de la réaction de séquence**

Tubes de réaction	BigDye ( $\mu$ l)	Amorces 6mM ( $\mu$ l)	Pr. PCR purifié ( $\mu$ l)	Eau stérile ( $\mu$ l)	Volume finale ( $\mu$ l)
Tube 1 F (contenant les amorces F)	2	1	4	3	10



Tube 1 R (contenant les amorces R)	2	1	4	3	10
------------------------------------	---	---	---	---	----

- Le tube est incubé dans le ThermoCycleur et le programme suivant est lancé:

**Tableau XV: Programme de la réaction de séquence**

Stade	Température	Temps	cycles
1	96°C	1 min	1
2	96°C	10 s	25
	50°C	5s	
	60°C	4 min	
3	10°C	∞	1

A la fin de la réaction, les tubes sont récupérés, et les produits de la réaction de séquence feront l'objet d'une purification.

**c) Purification de la réaction de séquence avec le Kit BigDye-XTerminator :**

Le kit BigDye® Xterminator™ permet la purification des produits de réaction de séquence en capturant les dyes non incorporés dans la réaction, les sels et autres molécules chargées qui pourraient interférer lors de la détection des bases par le séquenceur.

Le kit contient : - un flacon “SAM Solution” (stockage à T°ambiante)

- un flacon: « XTerminator Solution (stockage à 4°C, ne pas congeler)

 **Protocole expérimental**

45 µl du produit SAM™Solution et 10 µl du produit BigDye®XTerminator™Solution préalablement vortexés pour suspendre les résines et 10 µl du produit de la réaction de séquençage sont déposés dans les puits de la plaque. La plaque est mise ensuite sous agitation légère pendant 30



min, puis une centrifugation à 1000 tr/min pendant 2 minutes est réalisée. Le surnageant contenant les fragments à séquencer est transféré dans les puits de la plaque du séquenceur.

## 6.2 Chargement de l'appareil :

La plaque est placée dans le séquenceur (figure 17) qui est un automate d'électrophorèse capillaire. Ce dernier lance un flux électrique d'ions à travers un capillaire, ce qui entraîne la migration des fragments d'ADN. Une fois arrivés au site de détection, les quatre fluorochromes des ddNTP terminaux seront excités. Suite à cette excitation, chaque fluorochrome émettra une lumière à une longueur d'onde différente qui sera détectée puis convertie en séquence par le logiciel d'analyse des séquences.



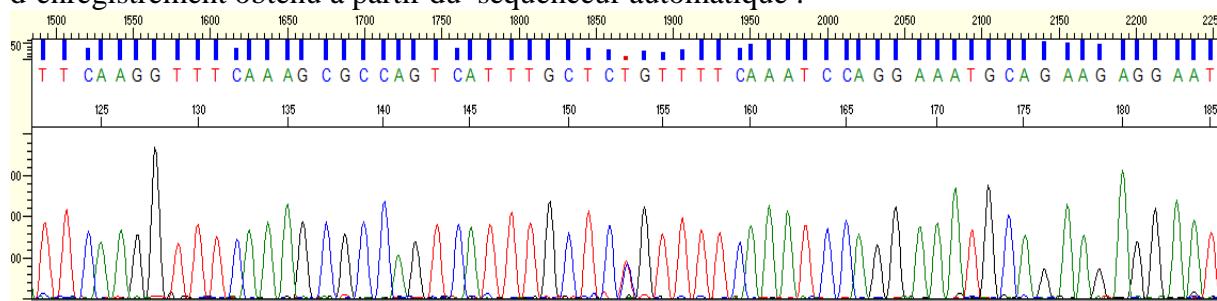
Figure  
génétique

Ci-  
exemple

17 : Analyseur  
3500Dx.

dessous un

d'enregistrement obtenu à partir du séquenceur automatique :





### **Figure 18 : Exemple de résultat de séquençage**

Il n'y a qu'une seule réaction de séquençage en présence des 4 ddNTP.

**ADN matrice + dNTP + ddCTP fluorescent bleu + ddATP fluorescent vert + ddGTP fluorescent noir + ddTTP fluorescent rouge.**

## **7. Les outils de bioinformatique**

### **✓ Logiciel BLAST**

Le logiciel blast permet de comparer une séquence nucléique dite requête à une banque de séquences nucléiques sur les 2 brins, c'est-à-dire la séquence étudiée (brin +) et son complémentaire inversé (brin -).

## *Résultats & Discussions*



Il s'agit d'une étude rétrospective étalée entre l'année 2010 jusqu'au février 2013. La population étudiée est composée de 22 patientes originaires de la région de Fès dont l'âge varie entre 22 ans et 50 ans et qui présentent les critères d'inclusion éligibles du cancer du sein familial.

Une consultation d'oncogénétique a été réalisée pour chaque patiente, au cours de laquelle le médecin généticien a établi un arbre généalogique pour chacune d'entre elles. (Exemple d'arbre dans [Annexe 4](#)).

Un prélèvement sanguin a été par la suite réalisé, en vue de la recherche des mutations c.798-799delTT/917delTT et c.2805delA/ 2924delA dans le gène BRCA1 (exon 11).

## I. Dosage et qualité de l'ADN extrait

La qualité de l'ADN obtenu après extraction requiert une importance majeure, car elle influence directement sur la qualité des résultats des techniques de biologie moléculaire (PCR, Séquençage) utilisées pour la recherche des mutations germinales du gène BRCA1.

L'extraction d'ADN a été réalisée par la méthode classique de « Salting- Out » à partir du sang total des patientes étudiées.

Le rapport de l'absorbance  $DO_{260}/DO_{280}$ , est compris pour la plupart des échantillons entre les valeurs 1,8 et 2, ce qui laisse conclure que ces extraits ne sont contaminés ni par l'ARN ni par les protéines et peuvent être qualifiés de purs.

## II. La réaction de polymérisation en chaîne et séquençage :

La PCR permet d'amplifier rapidement une portion précise d'ADN sur un chromosome en ciblant précisément un locus particulier. Pour cela, il est nécessaire



d'utiliser des amorces d'ADN complémentaires à la séquence du gène qui répondent aux critères suivants :

- Ils doivent être spécifiques du gène recherché.
- La longueur doit être comprise entre 18- 30 pb, car elle influe sur la température de fusion, la température d'hybridation et la spécificité d'hybridation.
- Les amorces ne doivent pas s'autohybrider (self-dimer), ni s'hybrider entre elles (dimer), ni former des structures en épingle à cheveux (hairpin).
- La différence de température d'hybridation entre le couple d'amorces, ne doit pas excéder 2 à 3°C.

Les amorces utilisées durant ce travail sont :

- **BRCA1\_Ex11-1\_F/R dont la séquence est :**  
5'- GCCAGTTGGTTGATTCCACC -3' (Amorce 1 Forward (5'>3'))  
5'- CCTTACTTCCAGCCCCATCTG -3' (Amorce 1 Revers (5'>3'))
- **BRCA1\_11-2R/F dont la séquence est :**  
5'- GGGACTAATTCATGGTTGTTCC -3' (Amorce 2 Forward (5'>3'))  
5'- CCTAGAGCCTCCTTGATAC-3' (Amorce 2 Revers (5'>3'))

### Remarques

-Le premier couple d'allèle encadre une séquence de l'exon 11 de 404 pb (Fragment 1).

(Annexe 5)

-Le deuxième couple d'allèles encadre une séquence de l'exon 11 de 418 pb (Fragment 2). (Annexe 5)

### **1) Optimisation de la réaction PCR réalisée avec le couple d'amorces BRCA1\_Ex11-1\_F/ BRCA1\_Ex11-1\_R**

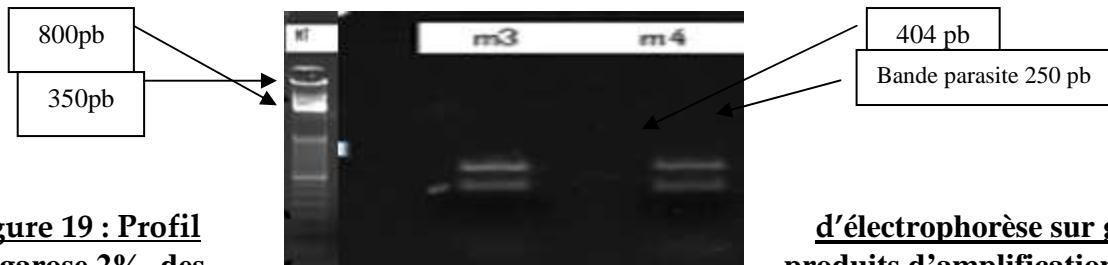
Après avoir choisi les couples d'amorces spécifiques du fragment 1 de l'exon 11 du gène BRCA1, il est nécessaire d'optimiser la réaction PCR, qui permettra d'amplifier les régions où la mutation existe.

Dans un premier temps, le protocole expérimental publié dans un article Croate a été adapté [126]. Le protocole est le suivant :

**Tableau XVI : Conditions de la réaction de PCR en utilisant le couple d'amorce BRCA1\_11-1R/F**

Conditions expérimentales			Programme PCR			
Réactif	Concentrat ion	V (µl)	Etape	T (°C)	Tem ps	Cycles
Tampon	10 X	2,5				
MgCl2	50mM	1	Dénaturation initiale	94 °C	8 min	1
Amorce s 11-1	dNTP	200 µM	Dénaturation	94°C	45 s	35
	11-1 F	10 mM				
11-1 R	10 mM	1	Hybridation	60°C	45 s	
			Elongation	72°C	45 s	
H2O	Qsp	17,3				
Taq	1 u/µl	0,2µl				
ADN	250 ng/µl	1	Elongation finale	72°C	10 min	1

L'amplification du gène BRCA1 en utilisant les amores BRCA1\_Ex11-1\_F/ BRCA1\_Ex11-1\_R, de deux patientes **m3 et m4** a donné le profil électrophorétique suivant :



**Figure 19 : Profil d'agarose 2% des PCR du gène BRCA1**

**d'électrophorèse sur gel produits d'amplification par (amores BRCA1\_Ex11-1\_F/ BRCA1\_Ex11-1\_R).**

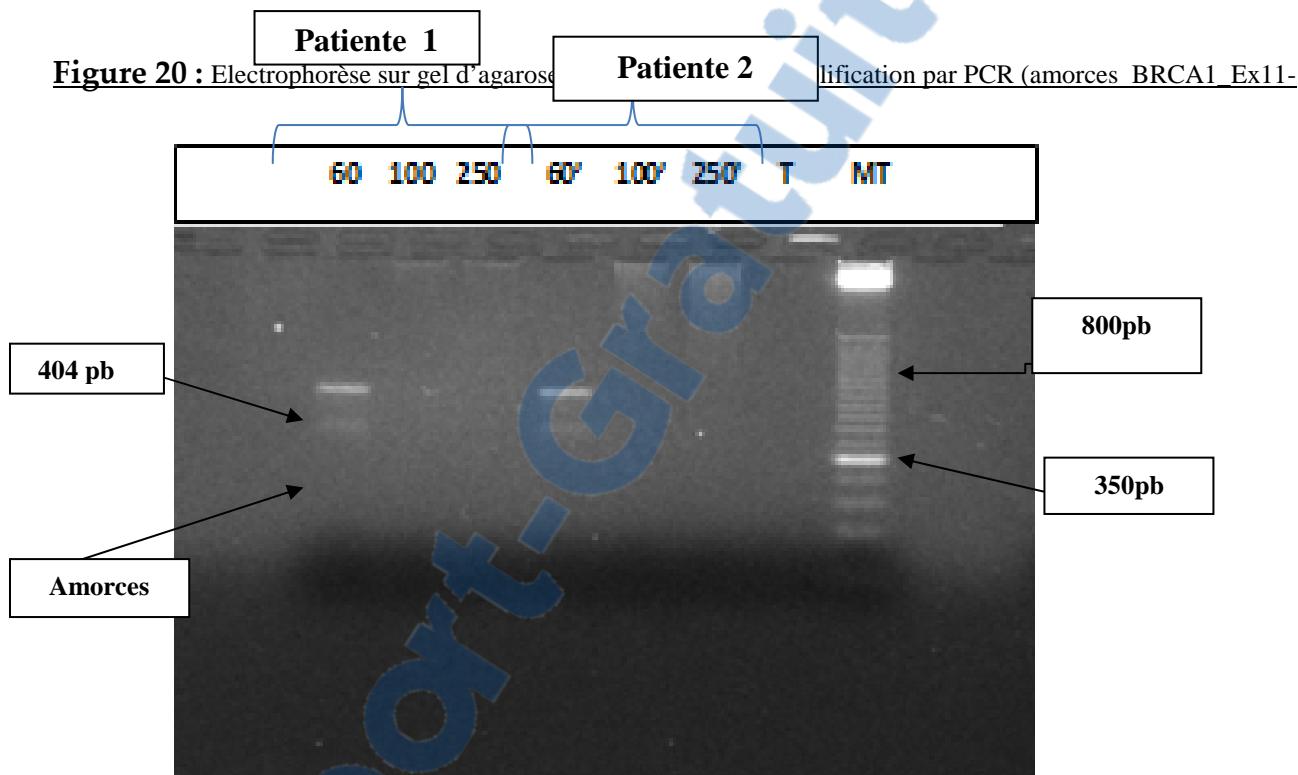
Les résultats montrent que les conditions adaptées permettent d'avoir une bande parasite supplémentaire, ceci montre que le protocole suivi nécessite encore des mises au point.

La modification de certains paramètres tels que les volumes, et les concentrations des réactifs, n'ont pas amélioré le résultat.

Pour cela, le protocole cité dans (le tableau X) dans la partie « matériel et méthodes » est celui qui a été adaptée.

Le premier essai a été réalisé à partir de l'ADN de deux patientes. Différentes concentrations d'ADN (250 ng/μl, 100 ng/μl, 60 ng/μl) ont été testées.

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure suivante :



T : témoin négatif

MT : marqueur de taille Lader (promega) (Annexe 6)

L'utilisation de différentes concentrations d'ADN montre que seule la concentration de 60 ng/μl a donné une bande visible sur le gel d'agarose. La spécificité de la séquence d'ADN amplifiée de taille 404pb a été confirmée par comparaison aux marqueurs de taille.

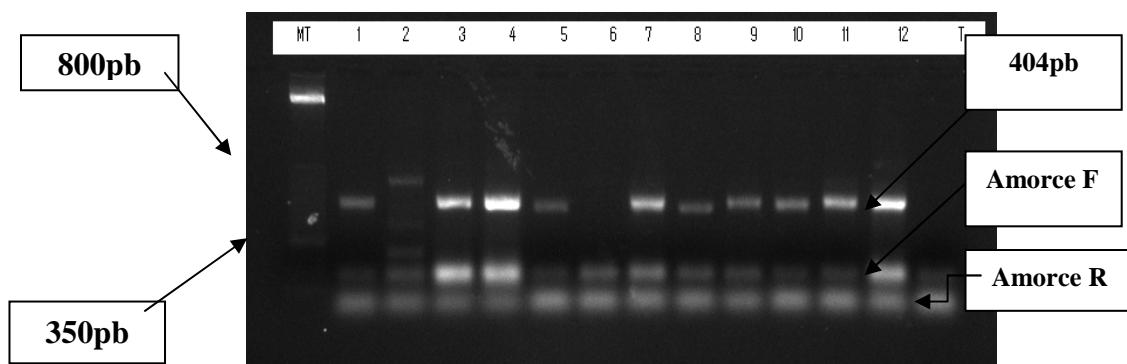
L'utilisation des deux autres concentrations d'ADN (100ng/μl et 250ng/μl) se traduit par une absence totale de la bande amplifiée. Ce résultat laisse conclure qu'une forte concentration d'ADN peut inhiber la réaction de PCR.

## ■ La réaction de PCR en utilisant les amorces à une concentration de 10 pmol/μl

Dans cet essai, le protocole utilisé est celui décrit dans les tableaux X et XI dans la partie « matériel et méthodes » mais en utilisant les amorces à une concentration de 10 pmol/μl.

La PCR a donné une amplification spécifique pour presque toutes les patientes en utilisant les amorces BRCA1\_Ex11-1\_F/ BRCA1\_Ex11-1\_R. Les produits d'amplification ont été visualisés sous UV après électrophorèse d'agarose et la spécificité des produits amplifiés (bande de 404 pb) a été confirmée par comparaison à des marqueurs de taille.

Le résultat de la réaction d'amplification est illustré dans la figure suivante :



**Figure 21 : Electrophorèse sur gel d'agarose 2% des produits d'amplification par PCR en utilisant les amorces BRCA1\_Ex11-1\_F/BRCA1\_Ex11-1\_R et avec une concentration d'amorces de 10 pmol/μl.**

T : témoin négatif

MT : marqueur de taille Lader (Proméga) ([Annexe6](#))

1+2+3+4.....+12 = patientes

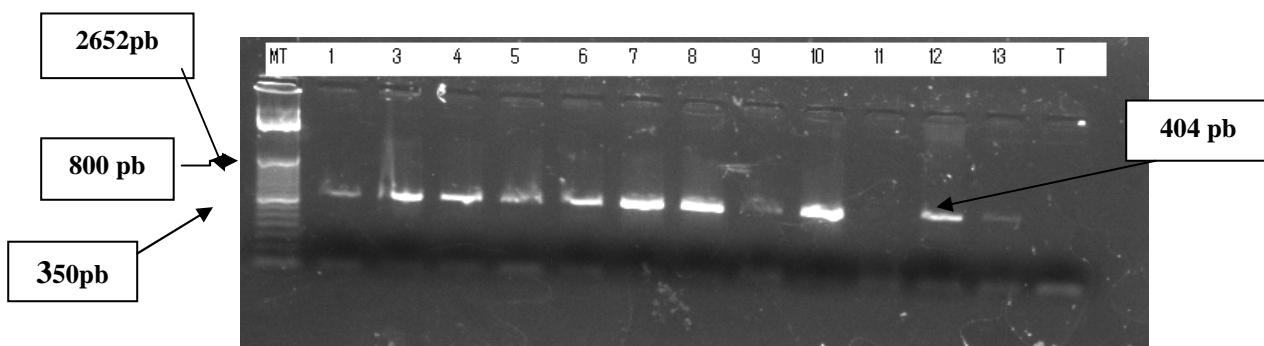
404 = bande amplifiée

Le résultat illustré dans le profil électrophorétique montre que le produit amplifié, dans le but d'être séquencé, ne contient pas de contaminants, et que la taille recherchée du produit d'amplification (404 pb) a été obtenue.

Par ailleurs, le profil montre que le couple d'amorce migre séparément. Cette observation peut être due à une hybridation aspécifique. Pour remédier à ce problème, une diminution de la concentration des amorces (8 pmol/μl) pourrait être favorable.

### Modification de la concentration des amorces :

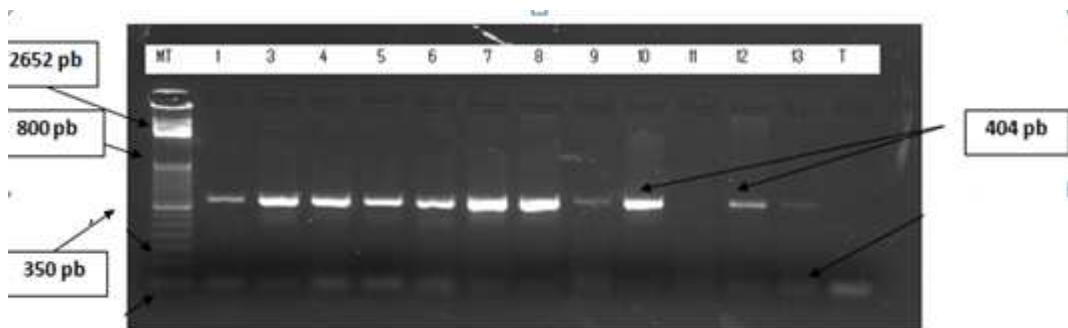
La même réaction que précédemment a été réalisée, mais avec une concentration d'amorces plus faible (8pmol / μl). Le résultat obtenu est illustré dan la figure ci-dessous :



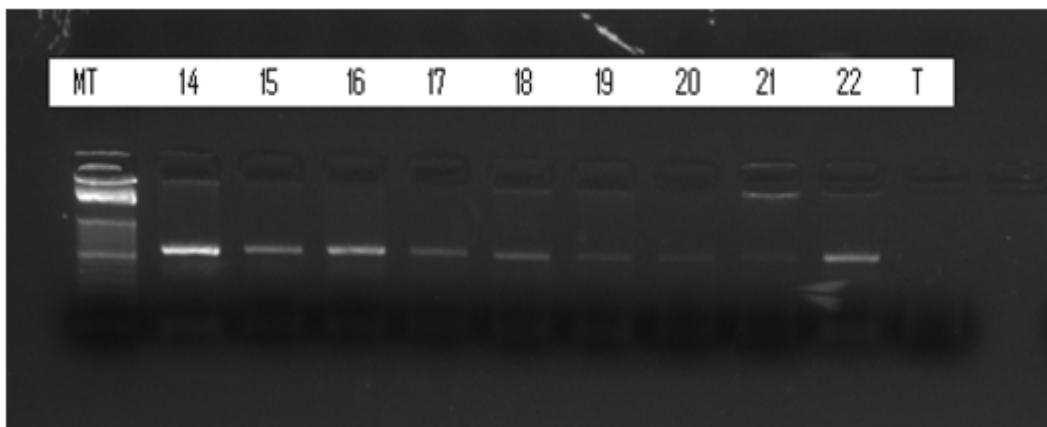
**Figure 22 :** Electrophorèse sur gel d'agarose 2% des produits d'amplification par PCR en utilisant les amores BRCA1\_Ex11-1\_F/ BRCA1\_Ex11-1\_R après modification de la concentration des amores.

Le résultat obtenu à partir de l'électrophorèse, montre que la diminution de la concentration des amores a été en faveur de la disparition du profil précédent (séparation des deux amores).

Les bandes n'étant pas bien claires, un changement de tampon de migration (TBE) a été réalisé. La modification de ce paramètre a adonné le profil électrophorétique suivant :



**Figure 23 :** Electrophorèse sur gel d'agarose 2% des produits d'amplification par PCR en utilisant les amores BRCA1\_Ex11-1\_F/ BRCA1\_Ex11-1\_R après changement de tampon de migration.





**Figure 24 : Electrophorèse sur gel d'agarose 2% des produits d'amplification par PCR en utilisant les amores BRCA1\_Ex11-1\_F/ BRCA1\_Ex11-1\_R après modification de tampon de migration.**

Les résultats obtenus montrent que l'utilisation d'un tampon de migration fraîchement préparé et filtré, permet d'avoir une meilleure visualisation des bandes, dont la taille correspond à celle recherchée et qui est 404 pb.

En résumé, les paramètres de la PCR mis au point consistent en une concentration d'ADN de 60 ng/ $\mu$ l et une concentration des amores de 8pmol / $\mu$ L avec une température d'hybridation des amores de 60°C.

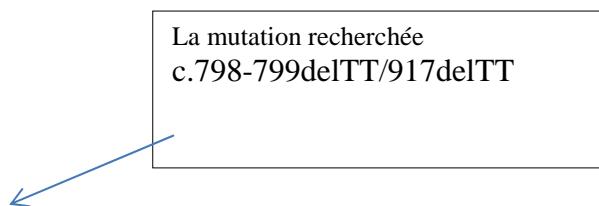
Le produit d'amplification par PCR étant de bonne qualité, le séquençage peut alors être réalisé.

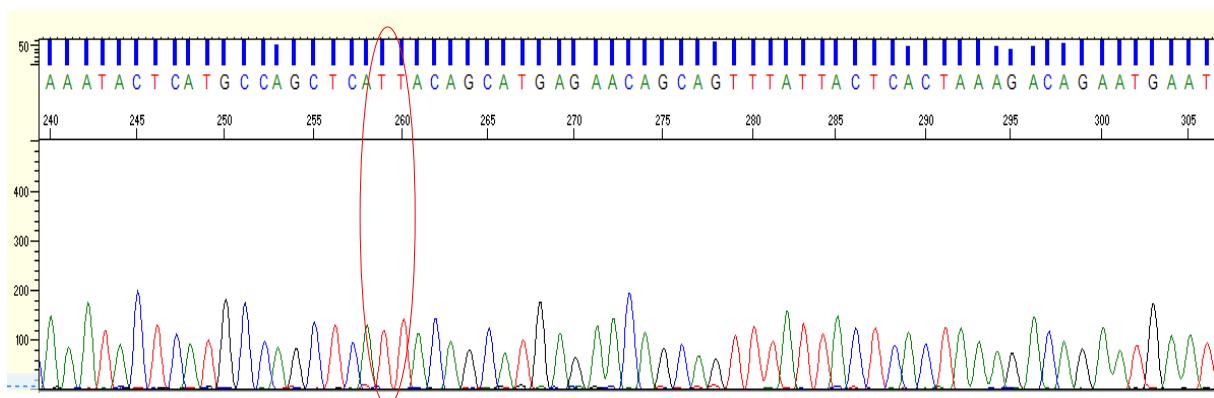
## **2) Séquençage des produits d'amplification obtenus par le couple d'amores BRCA1\_Ex11-1\_F/ BRCA1\_Ex11-1\_R**

Les ADN amplifiés correspondant à une séquence de l'exon 11 du gène BRCA1 et dont le contrôle par électrophorèse a été positif, ont été séquencés afin de mettre en évidence la présence ou l'absence des mutations recherchées touchant l'exon 11.

Les deux figures suivantes correspondent à un exemple des résultats du séquençage des fragments amplifiés par les couples d'amores BRCA1\_Ex11-1\_F/ BRCA1\_Ex11-1\_R.

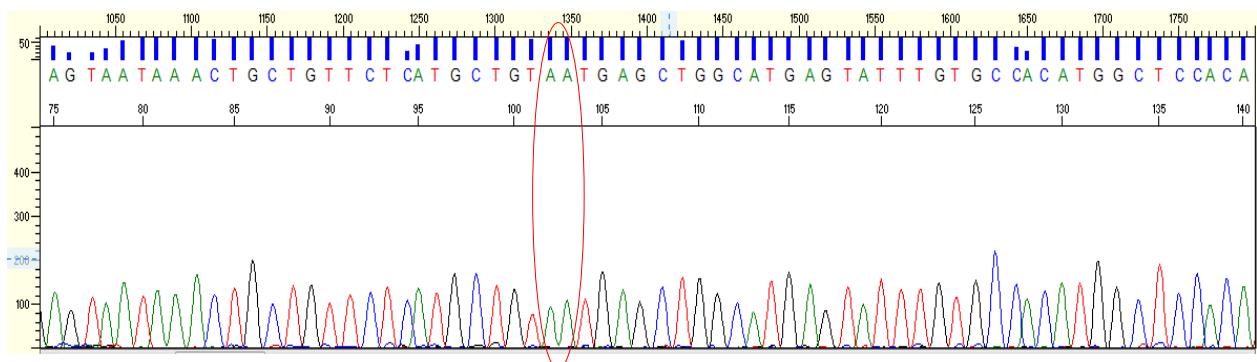
### Séquence amplifiée par le couple d'amores BRCA1\_Ex11-1\_F/ BRCA1\_Ex11-1\_R





**Figure 25 :** Electrophorégramme de la séquence amplifiée par le couple d'amorce BRCA1\_Ex11-1\_F/BRCA1\_Ex11-1\_R et séquencée par l'amorce BRCA1\_Ex11-1\_R de la patiente 19

#### Séquence amplifiée par le couple d'amorces BRCA1\_Ex11-1\_F/ BRCA1\_Ex11-1\_R



**Figure 26 :** Electrophorégramme de la séquence amplifiée par le couple d'amorce BRCA1\_Ex11-1\_F/BRCA1\_Ex11-1\_R et séquencée par l'amorce BRCA1\_Ex11-1\_R de la patiente 19

1

BLAST.

La figure suivante correspond au résultat de l'alignement de la séquence BRCA1\_Ex11\_1F/R avec la base de données (BLAST).



Homo sapiens breast cancer 1, early onset (BRCA1), transcript variant 1, mRNA  
Sequence ID: [ref|NM\\_007294.3|](#) Length: 7224 Number of Matches: 1

Range 1: 902 to 1209		GenBank	Graphics	▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
569 bits(308)	7e-160	308/308(100%)	0/308(0%)	Plus/Plus	
Query 1	GCTGCTTGTGAATTTCTGAGACGGATGTAACAAAATCTGAACATCATCAACCCAGTAAT			60	
Sbjct 902	GCTGCTTGTGAATTTCTGAGACGGATGTAACAAAATCTGAACATCATCAACCCAGTAAT			961	
Query 61	AATGATTGAAACACCACTGAGAACGGTGCAGCTGAGAGGCATCCAGAAAAGTATCAGGGT			120	
Sbjct 962	AATGATTGAAACACCACTGAGAACGGTGCAGCTGAGAGGCATCCAGAAAAGTATCAGGGT			1021	
Query 121	AGTTCTGTTCAAACCTGATGTGGAGCCATGTGGCACAAATACTCATGCCAGCTCAITTA			180	
Sbjct 1022	AGTTCTGTTCAAACCTGATGTGGAGCCATGTGGCACAAATACTCATGCCAGCTCAITTA			1081	
Query 181	CAGCATGAGAACAGCAGTTTATTACTCACTAAAGACAGAATGAATGTAGAAAAGGCTGAA			240	
Sbjct 1082	CAGCATGAGAACAGCAGTTTATTACTCACTAAAGACAGAATGAATGTAGAAAAGGCTGAA			1141	
Query 241	TTCTGTAATAAAAGCAAACAGCCTGGCTTAGCAAGGAGCCAACATAACAGATGGGCTGGA			300	
Sbjct 1142	TTCTGTAATAAAAGCAAACAGCCTGGCTTAGCAAGGAGCCAACATAACAGATGGGCTGGA			1201	
Query 301	AGTAAGGA 308				
Sbjct 1202	AGTAAGGA 1209				

Figure 27 : Alignement de la séquence amplifiée par le couple d'amorces **BRCA1\_Ex11-1\_F/BRCA1\_Ex11-1\_R** avec celle de la base de données (BLAST).

Après l'obtention de la séquence du gène étudié, et après l'alignement avec la séquence de la banque de données du logiciel « Blast », la comparaison de la séquence requête amplifiée par le couple d'amorces **BRCA1\_Ex11-1\_F/ R** avec celle de la banque de données du logiciel « Blast » montre un pourcentage d'identité de 100% avec la séquence attendue du gène **BRCA1**.

**Conclusion :** Sur les 22 patientes étudiées, aucune ne présente la mutation recherchée par le couple d'amorce utilisé. Aucune mutation de polymorphisme ou autres n'ont été détectées chez ces patientes

### 3) Optimisation de la réaction de polymérisation en chaîne en utilisant le deuxième couple d'amorce:

Dans cette partie, la PCR a été mise au point en utilisant le même protocole que celui adapté pour le premier couple d'amorce. Les conditions d'optimisation sont représentées dans le tableau XI dans la partie « matériel et méthodes ».

Les produits d'amplification ont été visualisés sous UV après électrophorèse d'agarose à 2%, et la spécificité des produits amplifiés (bande de 418pb) a été confirmée par comparaison à des marqueurs de taille.

Les résultats de migration du produit PCR après amplification est présenté ci-dessous :

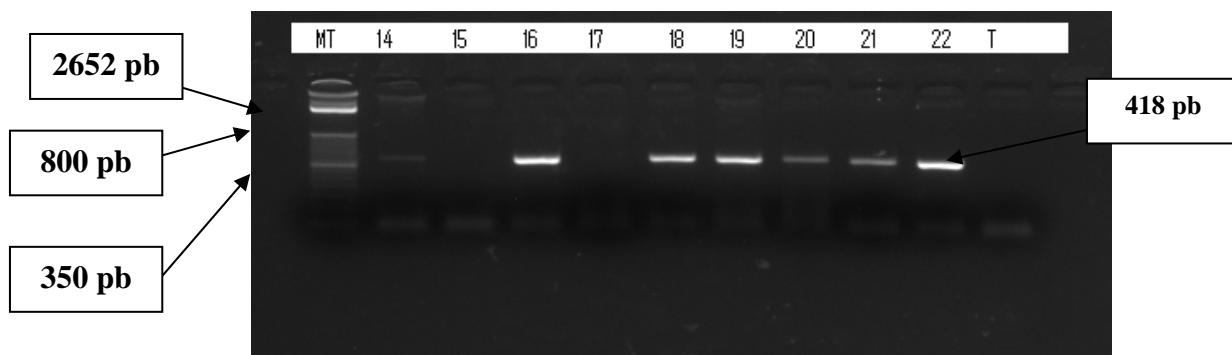


Figure 28 : Electrophorèse sur gel d'agarose 2% des produits d'amplification des 22 patientes par PCR en utilisant les amorces BRCA1\_Ex11-2\_F / BRCA1\_Ex11-2\_R

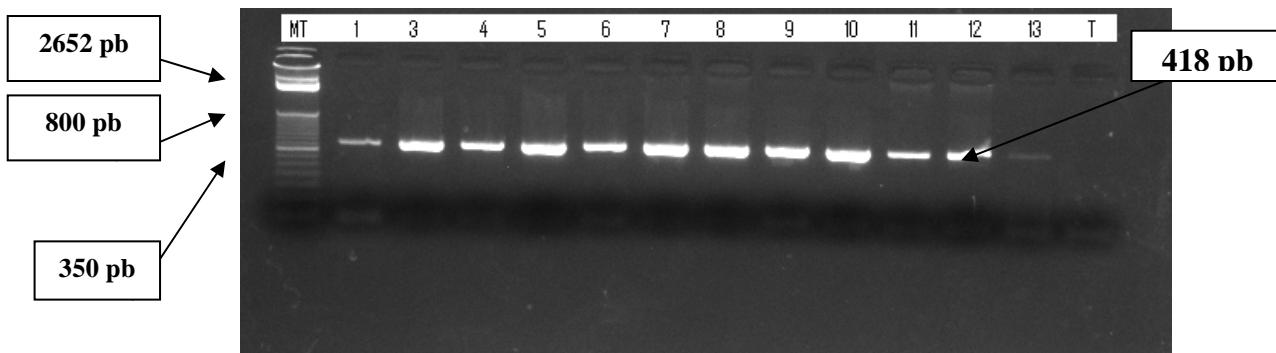
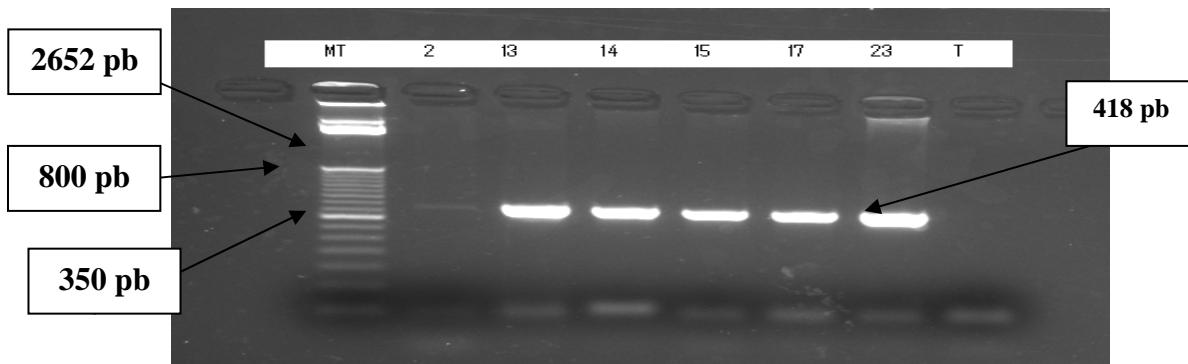


Figure 29 : Electrophorèse sur gel d'agarose 2% de la suite des produits d'amplification des 22 patientes par PCR en utilisant les amorces BRCA1\_Ex11-1\_F / BRCA1\_Ex11-1\_R



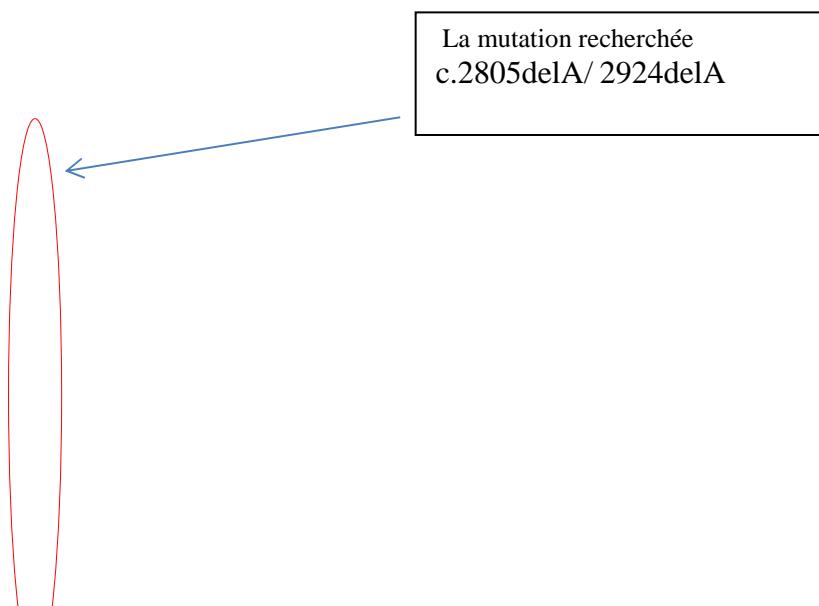
**Figure 30 : Electrophorèse sur gel d'agarose 2% des produits d'amplification des patientes dont on avait pas de bandes dans la PCR précédente en utilisant les amores BRCA1\_Ex11-2\_F/ BRCA1\_Ex11-2\_R**

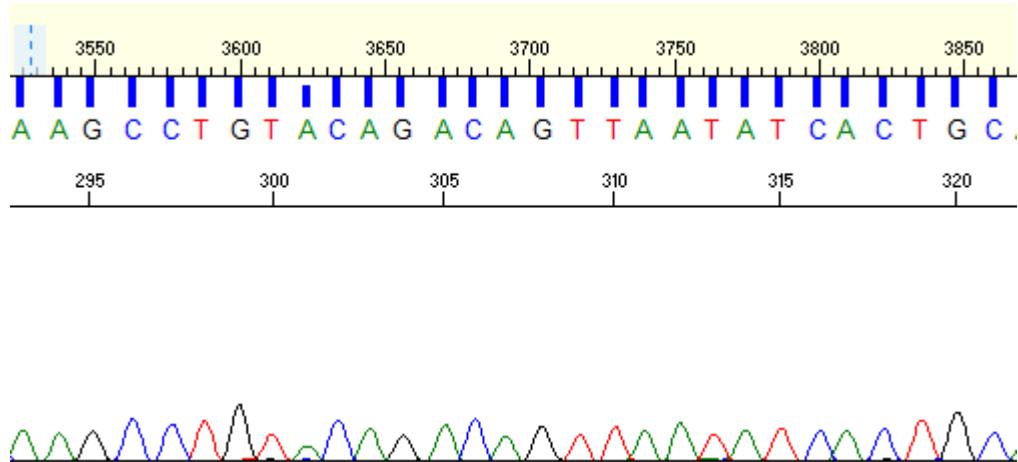
On observe des bandes dont la taille correspond bien à celle des bandes attendues (418pb).

#### 4) Séquençage des produits d'amplification obtenus par les couples d'amorces BRCA1\_Ex11-2\_F/ BRCA1\_Ex11-2\_R

Les ADN amplifiés correspondant à une séquence de l'exon 11 du gène BRCA1 et dont le contrôle par électrophorèse a été positif, ont été séquencés afin de mettre en évidence la présence ou l'absence des mutations recherchées touchant l'exon 11.

Les figures suivantes correspondent aux résultats du séquençage des fragments amplifiés par les couples d'amorces BRCA1\_Ex11-2\_F/ BRCA1\_Ex11-2\_R.





**Figure 31 :** Electrophorégramme de la séquence amplifiée par le couple d'amorce BRCA1\_Ex11-2\_F/BRCA1\_Ex11-2\_R et séquencée par l'amorce BRCA1\_Ex11-2\_F de la patiente 2

La figure suivante correspond au résultat de l'alignement de la séquence BRCA1\_Ex11\_2F/R avec la base de données (BLAST).

Homo sapiens breast and ovarian cancer susceptibility protein (BRCA1) mRNA, BRCA1-2201T/2430C/2731T/32  
 Sequence ID: [gb|AY751490.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) Length: 5524 Number of Matches: 1

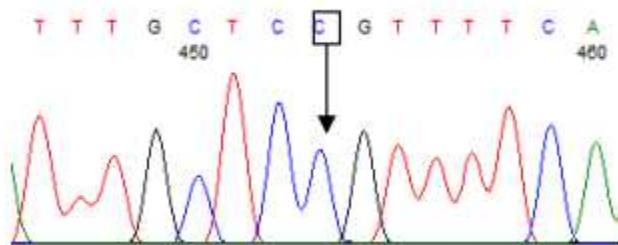
Range 1: 2497 to 2852		<a href="#">GenBank</a>	<a href="#">Graphics</a>	▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
658 bits(356)	0.0	356/356(100%)	0/356(0%)	Plus/Plus	
Query 2	TTGGGACATGAAGTTAACCAACAGTCGGAAACAAGCATAGAAATGGAAGAAAGTGAAC TT	61			
Sbjct 2497	TTGGGACATGAAGTTAACCAACAGTCGGAAACAAGCATAGAAATGGAAGAAAGTGAAC TT	2556			
Query 62	GATGCTCAGTATTG CAGAATA CATTCAAGGTTCAAAGGCCAGTCATTGCTCTGTT	121			
Sbjct 2557	GATGCTCAGTATTG CAGAATA CATTCAAGGTTCAAAGGCCAGTCATTGCTCTGTT	2616			
Query 122	TCAAATCCAGGAAATG CAGAAGAGGAATGTGCAACATCTCTGCCACTCTGGTCCTTA	181			
Sbjct 2617	TCAAATCCAGGAAATG CAGAAGAGGAATGTGCAACATCTCTGCCACTCTGGTCCTTA	2676			
Query 182	AAGAAACAAAAGTCCAAAAGTCACTTTGAATGTGAACAAAAGGAAGAAAATCAAGGAAG	241			
Sbjct 2677	AAGAAACAAAAGTCCAAAAGTCACTTTGAATGTGAACAAAAGGAAGAAAATCAAGGAAG	2736			
Query 242	AATGAGTCTAATATCAAGCCTGTACAGACAGTTAATATCACTGCAGGCTTCTGTGGTT	301			
Sbjct 2737	AATGAGTCTAATATCAAGCCTGTACAGACAGTTAATATCACTGCAGGCTTCTGTGGTT	2796			
Query 302	GGTCAGAAAGATAAGCCAGTTGATAATGCCAAATGTAGTATCAAAGGAGGCTCTAG	357			
Sbjct 2797	GGTCAGAAAGATAAGCCAGTTGATAATGCCAAATGTAGTATCAAAGGAGGCTCTAG	2852			

**Figure 32 :** Alignement de la séquence amplifiée par le couple d'amorces BRCA1\_Ex11-2\_F/BRCA1\_Ex11-2\_R avec celle de la base de données (BLAST).

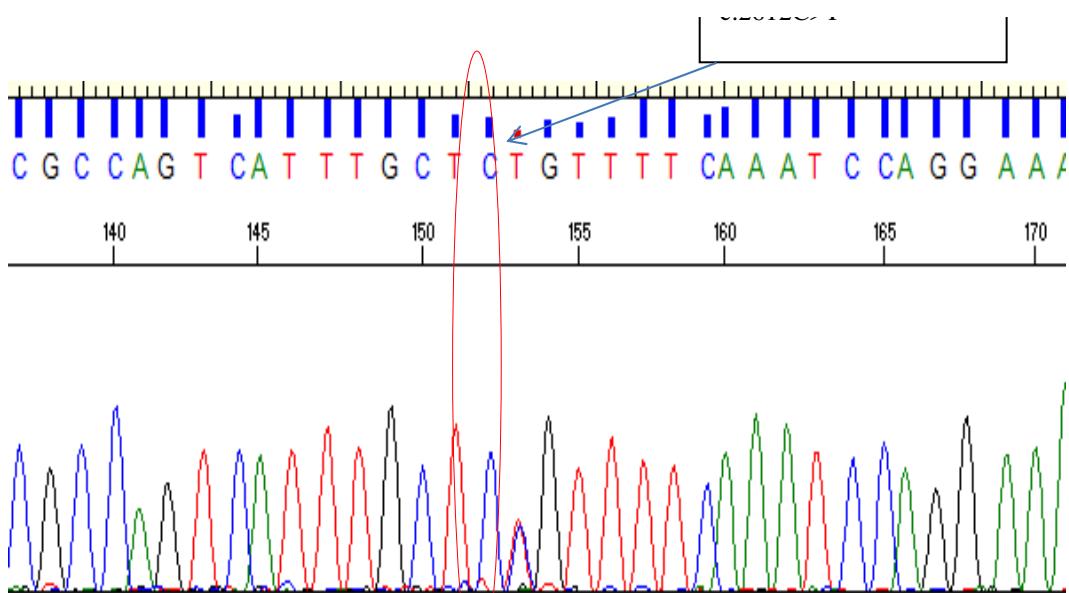
L'alignement avec la séquence de la banque de données montre que la séquence amplifiée par le couple d'amorces **BRCA1\_Ex11-2\_F/ R** présente un pourcentage d'identité de 100% avec la séquence attendue du gène **BRCA1**.

On peut conclure que les patientes sélectionnées ne présentent pas la mutation recherchée. Cependant, une substitution au niveau d'un autre codon a été mise en évidence.

#### Séquence amplifiée par le couple d'amorces BRCA1\_Ex11-2\_F/ BRCA1\_Ex11-2\_R



**Figure 33 :** Electrophorégramme de la séquence d'un type sauvage amplifiée par le couple d'amorce **BRCA1\_Ex11-2\_F/ BRCA1\_Ex11-2\_R** et séquencée par l'amorce **BRCA1\_Ex11-2\_F** mutation de



**Figure 34 :** Electrophorégramme de la séquence amplifiée par le couple d'amorce **BRCA1\_Ex11-2\_F/ BRCA1\_Ex11-2\_R** et séquencée par l'amorce **BRCA1\_Ex11-2\_F** de la **patiente 2**

#### Séquence amplifiée par le couple d'amorces **BRCA1\_Ex11-2\_F/ BRCA1\_Ex11-2\_R**

Le polymorphisme  
c.2612G>A

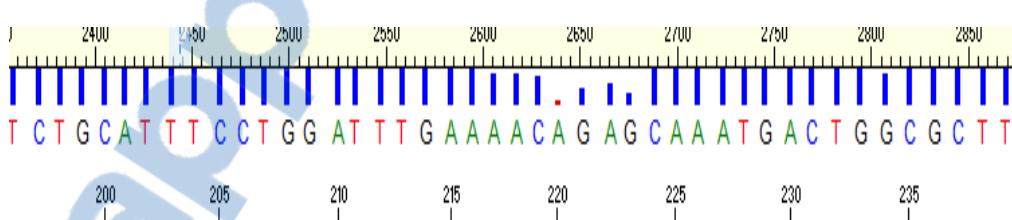
### horce BRCA1 Ex11-2 F/

## la patiente 2

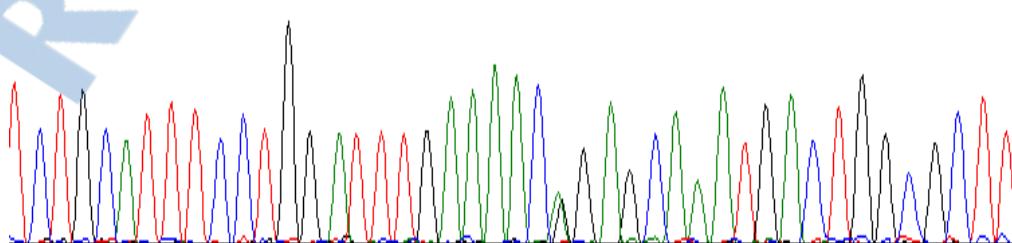
piens breast cancer 1, early onset (BRCA1), transcript variant 1, mRNA  
p: ref|NM\_007294.3| Length: 7224 Number of Matches: 1

Range 1: 2729 to 3084				<a href="#">GenBank</a>	<a href="#">Graphics</a>	<a href="#">▼ Next Match</a>	<a href="#">▲ Previous Match</a>
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand			
652 bits(353)		0.0	355/356(99%)	0/356(0%)		Plus/Plus	
Query 2	TTGGGACATGAAGTTAACCAACAGTCGGGAAACAAGCATAGAAATGGAAGAAAGTGAACCTT	61					
Sbjct 2729	TTGGGACATGAAGTTAACCAACAGTCGGGAAACAAGCATAGAAATGGAAGAAAGTGAACCTT	2788					
Query 62	GATGCTCAGTATTGCAAGAATACATTCAAGGTTCAAAAGCGCCAGTCATTIGCTCTGTTT	121					
Sbjct 2789	GATGCTCAGTATTGCAAGAATACATTCAAGGTTCAAAAGCGCCAGTCATTIGCTCCGTTT	2848					
Query 122	TCAAATCCAGGAAATGCAGAAGAGGAATGTGCAACATTCTCTGCCCACTCTGGGTCTTA	181					
Sbjct 2849	TCAAATCCAGGAAATGCAGAAGAGGAATGTGCAACATTCTCTGCCCACTCTGGGTCTTA	2908					
Query 182	AAGAAAACAAAGTCCAAAAGTCACTTTGAATGTGAACAAAAGGAAGAAAATCAAGGAAAG	241					
Sbjct 2909	AAGAAAACAAAGTCCAAAAGTCACTTTGAATGTGAACAAAAGGAAGAAAATCAAGGAAAG	2968					
Query 242	AATGAGTCTAATATCAAGCCTGTACAGACAGTTAATATCACTGCGAGGCTTCTGTGGTT	301					
Sbjct 2969	AATGAGTCTAATATCAAGCCTGTACAGACAGTTAATATCACTGCGAGGCTTCTGTGGTT	3028					
Query 302	GGTCAGAAAGATAAGCCAGTTGATAATGCCAAATGTAGTATCAAAGGAGGCTCTAG	357					
Sbjct 3029	GGTCAGAAAGATAAGCCAGTTGATAATGCCAAATGTAGTATCAAAGGAGGCTCTAG	3084					

la



## Figure 36 : Alignement de séquence amplifiée par le couple d'amorces





## 2\_F/BRCA1\_Ex11-2\_R dans BLAST

L’alignement de la séquence amplifiée avec le logiciel BLAST a montré une substitution du nucléotide C par le nucléotide T sur le codon 871. Cette substitution conduit au changement de l’acide aminé proline en leucine (annexe) ayant une importance fonctionnelle inconnue dans l’exon 11.

Il s’agit du polymorphisme **c.2612C>T** qui a été retrouvé chez 5 patientes sur 22, soit 20% des patientes étudiées. Cette altération n’est pas délétère comme il a été déjà décrit dans d’autres articles et chez d’autres populations. [\[127\]](#)

Ce type de substitutions est également retrouvé chez des patients sains [\[123\]](#).

## *Conclusion et Perspectives*



A travers l'étude réalisée dans le cadre de ce mémoire, l'importance du rôle joué par le gène BRCA1 dans le développement du cancer du sein et/ou de l'ovaire chez 22 patientes, sélectionnées selon une probabilité élevée du cancer héréditaire a été évalué.

Durant ce travail, les étapes suivantes ont été réalisées :

- ❖ La mise au point de la réaction de polymérisation en chaîne des deux couples d'amorces BRCA1\_Ex11-1F/R et BRCA\_Ex11-2 qui permettent l'amplification des fragments cibles du gène BRCA1.
- ❖ Séquençage des produits de PCR amplifiés par les paires d'amorces BRCA1\_Ex11-1F/R et BRCA\_Ex11-2.
- ❖ Confirmation de l'absence des deux mutations recherchées chez les 22 patientes sélectionnées.

Le diagnostic de prédisposition conduira à la mise en place d'une surveillance mammaire clinique bi -annuelle dès l'âge de 20 ans, puis d'une surveillance annuelle par imagerie dès l'âge de 30 ans, voire dès 25 ans si un premier diagnostic a eu lieu dans la famille avant l'âge de 34 ans.

Un test génétique peut être proposé si la probabilité de prédisposition du cas index est d'au moins 25%, ce qui correspond à une probabilité de détection d'une mutation comprise entre 10 et 16% selon qu'il s'agisse d'une famille de type cancer du sein seul ou cancer du sein et de l'ovaire. [38]

Pour élargir la surface de l'étude, et comme perspective, les recommandations suivantes peuvent être proposées :

- Augmenter la taille de l'échantillonnage pour les patientes.
- Centraliser l'étude.

Etant donné que le gène présente plusieurs mutations dans les différents introns et exons, le séquençage à haut débit permettant d'explorer tout le gène peut être proposé. Comme cette application reste irréalisable, une collaboration avec des équipes étrangères serait la bienvenue.

Il est également judicieux de penser à avoir recours à la technique MLPA. Cette variante de la réaction de polymérisation en chaîne multiplex qui permet d'amplifier plusieurs cibles avec seulement une seule paire d'amorces [123], pourrait améliorer les résultats du test génétique.





## *Annexe 1 :*

# *ANNEXES*

*Fiche  
de*

*consentement*

## UNITE DE GENETIQUE MEDICALE ET D'ONCOGENETIQUE

### **Banque d'ADN Maladie de .....**

Dossier Génétique :

Dossier clinique :

IP :

**Nom, Prénom** :  
**Date de naissance** :  
**Consanguinité** :  
**Origine père** :  
**Origine mère** :  
**Adresse** :  
**Tel** :  
**Médecin traitant** :



<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Fait à Fès, le .....

**Signature et cacher du médecin :**

موافقة مريض بعد التوعية من أجل الدراسة في الجينات  
لمرض ....

الاسم العائلي  
الاسم العائلي

أق رار المريض

اقر أنا الموقعاًناه .....  
موافقة إرادية على المشاركة في الدراسة الجينات لمرض .....  
بتاريخ ..... حرفي: .....  
التوقيع:

أق رار الطبيب

اقر أنا الطبيب بأنني شرحت بالقدر الوفيل للمريض طبيعة هذه الدراسة والهدف منها وأنه وافق بمحض إرادته .....  
بتاريخ ..... حرفي: .....

## Annexe 2

### Composition des produits utilisés

#### ❖ Lyse des hématies TE 20/5 : 1L



- 20 ml Tris-HCl pH 7,6 1 M
- 10 ml EDTA disodique pH 8 0,5 M
- H<sub>2</sub>O distillée

▪ **Tris HCl 1M pH 7,6**

- Tris base 121,1 g
- Eau distillée q.s.p 1 litre
- Le pH est ajusté à 7,6 par du HCl concentré (12N)
- Autoclaver

▪ **EDTA-Na<sub>2</sub> 0,5 M à pH 8**

- EDTA-Na<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O 186,12 g
- Eau distillée q.s.p 1 litre
- Ajuster le pH à 8 par du NaOH en pastilles
- Autoclaver et conserver à +4°C.

❖ **Lyse des globules blancs**

- 10 ml Tris-HCl pH 7,6 1 M
- 20 ml EDTA disodique pH 8 0,5 M
- 20 ml SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) 10%
- 10 ml NaCl 5 M

▪ **SDS à 10%**

- 25g de SDS + E.D q.s.p 250 ml
- Conserver à température ambiante

❖ **Préparation de la Protéinase K**

Pour 100 ml de tampon de stockage

50 ml	CaCl <sub>2</sub> 50 mM
50 ml	Tris-HCl 250 mM

Pour 10 ml de Protéinase K solution mère

- Ajouter 10 ml du tampon de reconstitution à 100 mg de protéinase K (Promega)
- Mettre 200 µl de la solution mère dans des tubes eppendorf de 1,5 ml
- Stocker à -20°C

▪ **Préparation du CaCl<sub>2</sub> 50 mM**

Dissoudre 1,375 g de CaCl<sub>2</sub> (PM= 110) dans 250 ml d'eau distillée

▪ **Préparation du Tris-HCl 250 mM**

- Prendre 25 ml de la solution Tris-HCl 1 M
- Compléter jusqu'à 100 ml

❖ **Solution de conservation de la méduse d'ADN (200 ml) TE 10/1 :**



- 
- 2 ml Tris-HCl pH 7,6 1 M
  - 400 µl EDTA disodique pH 8 0,5 M

❖ **BET( Bromure d'ethidium) à 10mg/ ml :**

- BET : 0.5g
- Eau distillé : qsp 50ml
- Laisser dissoudre
- Conserver à 4°C et à l'abri de la lumière

❖ **Gel d'agarose à 2% :**

- Agarose : 1g
- Tampon TAE 1X : 50ml
- Chauffer à ébullition
- Couler le gel dans la cuve d'électrophorèse

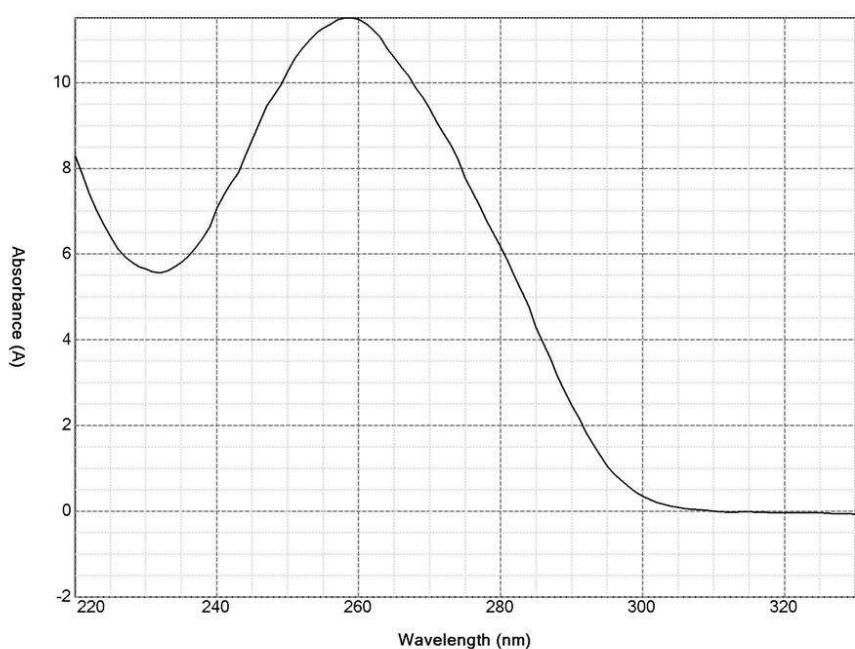
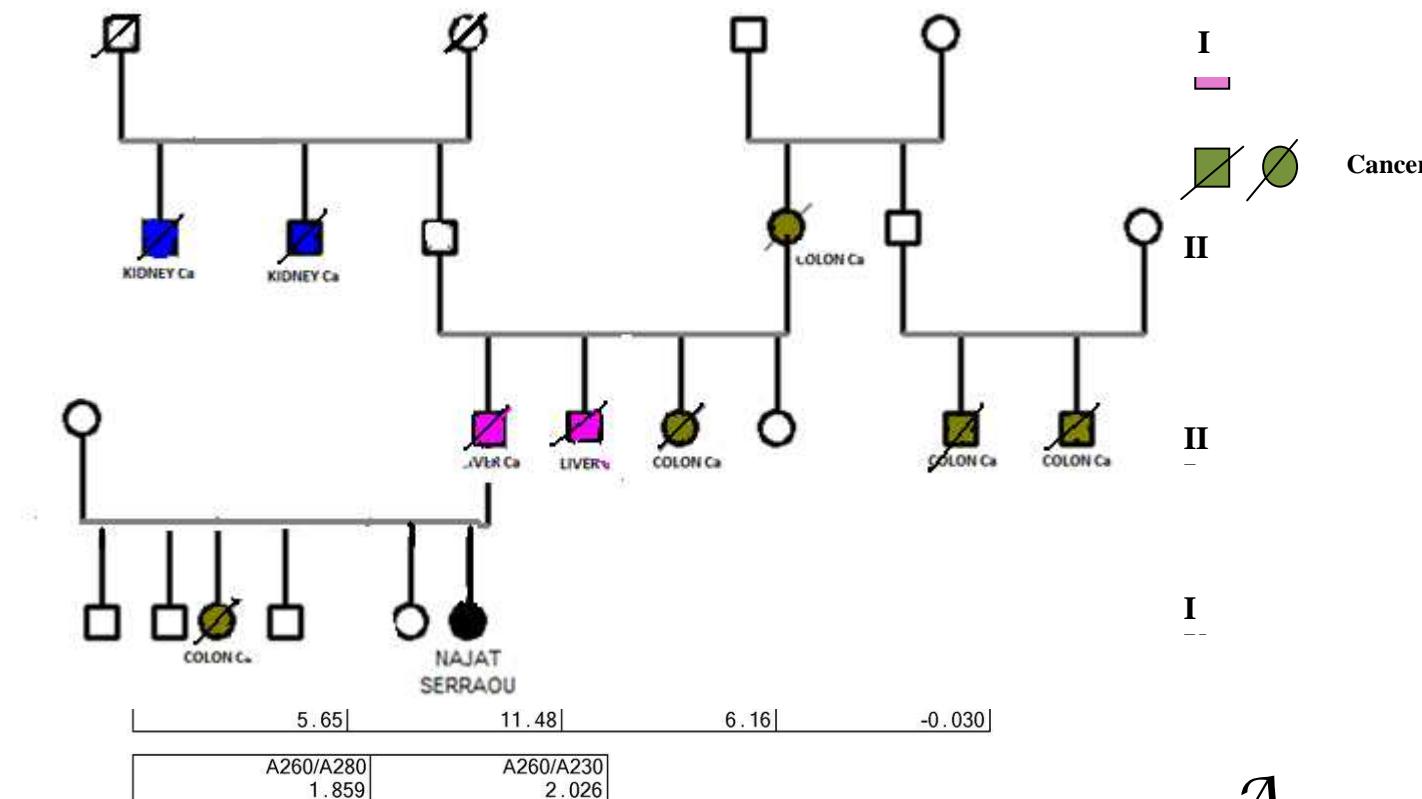
▪ **Tampon TAE (Tris-Acéteate-EDTA) 50X :**

- Tris-base : 242g
- EDTA 0.5M PH 8 : 100ml
- Acide acétique : 57ml
- Eau distillée : qsp 1000ml
- Alliquer et autoclaver
- Conserver à 4°C

❖ **Tampon de charge :**

- bleu de bromophénol : 0.1g
- sucre : 50g
- eau distillée : q. s .p 100ml
- conserver la solution à 4°C

## Annexe 3



Annexe 5



### EXON 11 3426 bp

```
taatatagccagttggattccaccctccaagggtatgaagtatgtatttttatgacaattcagtttgagttacccgtta
ttttgtatatttcagCTGCTTGTGAATTTCTGAGACGGATGTAACAAATACTGAAC
ATCATCAACCCAGTAATAATGATTGAACACCACTGAGAAGCGTGCAGCT
GAGAGGCATCCAGAAAAGTATCAGGGTAGTTCTGTTCAAACCTGCATGT
GGAGCCATGTGGCACAAATACTCATGCCAGCTCATTACAGCATGAGAAC
GCAGTTTATTACTCACTAAAGACAGAATGAATGTAGAAAAGGCTGAATT
TGTAATAAAAGCAAACAGCCTGGCTAGCAAGGAGCCAACATAACCAGAT
GGGCTGGAAGTAAGGAAACATG
```

AMORCES: F

**GCCAGTTGGTTGATTCCACC**

R

**CCTTACTTCCAGCCCATCTG**

**Mutation: c.798-799delTT/917delTT**

Fragment 2 de l'exon 11 du gène BRCA1



EXON 11 3426bp

GAAAACCCAA **GGGACTAATTCATGGTTGTTCC** AAAGATAATAGAAATGACACAGAA  
GGCTTTAAGTATCCATTGGGACATGAAGTTAACCAAGTCGGAAACAAGCATAGAA  
ATGGAAGAAAGTGAACTTGATGCTCAGTATTGAGAATACATTCAAGGTTCAAAG  
CGCCAGTCATTGCTCCGTTCAAATCCAGGAAATGCAGAAGAGGAATGTGCAACA  
TTCTCTGCCACTCTGGGTCTTAAAGAAACAAAGTCCAAAGTCACTTGAATGTG  
AACAAAAGGAAGAAAATCAAGGAAAGAATGAGTCTAATATCAAGCCTGTACAGACA  
GTTAATATCACTGCAGGTTCTGTGGTGGTCAGAAAGATAAGCCAGTTGATAATG  
CCAAATGTAGTATCAAAGGAGGCTCTAGGTTGTCTATCATCTCA

AMORCES: F

**GGGACTAATTCATGGTTGTTCC**

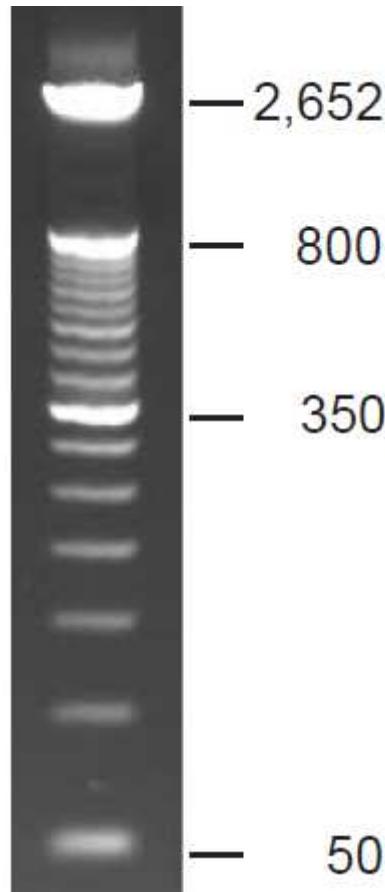
R

**CCTAGAGCCTCCTTGATAC**

**Mutation: c.2805delA/ 2924delA**

## Annexe 6

Photo du marqueur de taille 2652 DNA ladder 50pb (proméga)



## Annexe 7

Exon/ Intron	NT <sup>a</sup>	Base change	Codon	Amino acid change	Designation	Variation	BIC entry
11	c.2717	+A	906	fs 914stop	-	Frame shift	Novel
	c.1400	A>G	467	Lys - Arg.	K467R	polymorphism	Novel
	c.2082	C>T	694	Ser - Ser	Silent	polymorphism	Reported
	c.2311	T>C	771	Leu - Leu	Silent	Polymorphism	Reported
	c.2612	C<T	871	Pro - Leu	P871L	polymorphism	Reported
	c.3113	A>G	1038	Glu - Gly	E1038G	polymorphism	Reported
	c.3548	A>G	1183	Lys - Arg	K1183R	polymorphism	Reported
	Int.1	1822	C>T	-	-	polymorphism	Reported

<sup>a</sup>approved nucleotide number



Mutations et polymorphismes du gène BRCA 1 dans le nord du littoral Andhra Pradesh [127]

*Références  
Bibliographiques*



1. Stratton MR., Rahman N., 1992. *the emerging landscape of breast cancer: A personal perspective*. *Cancer Research.*, 52, 2371-83.
2. Durocher F., Guenard F., 2005. *Inherited susceptibility to breast cancer: accomplishments and challenges*. In: *Molecular genetics of cancer. Research Signpost.*, 9-93.
3. Sjöblom T., Jones S., Wood LD., 2006. *The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers*. *Science.*, 314, 268-74.
4. Stoppa Lyonnet., Stern M.H., 2010. *Prédispositions génétiques aux cancers: actualités et perspectives en 2010*. *Pathologie Biologie.*, 58, 324-330.
5. Claus E.B., Risch N.D., 1991. *Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study*. *Am J.Hum. Genet.*, 48, 232-242.
6. Parkin D.M. et al., 2002. *Cancer Incidence in Five Continents*. International Agency for Research on Cancer., France, Lyon. 155.
7. Moss SM., 1997. *Breast carcinoma mortality rates and screening*. *Cancer.*, 79, 1-2.
8. Guerin S., Doyon F., Hill C., 2009. *The frequency of cancer in France in 2006, mortality trends since 1950, incidence trends since 1980 and analysis of the discrepancies between these trends*. *Bull Cancer.*, 96, 517.
9. Stewart B.W., Kleihues P., 2005. *Le cancer dans le monde*. Lyon., IARC press.
10. Ferlay J. et al., 2004. International Agency for Research on Cancer (IARC). *GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide*. Lyon, France., IARC Press.



11. *Registre des cancers de la région du grand Casablanca 2004.*
12. *Couch FJ., De Shano M., Blackwood A., Calzone K., Stopfer J., Campeau L., Ganguly A., Rebbeck T. and Weber., 1997. BRCA1 mutations in women attending clinics that evaluate the risk of breast cancer. New Engl J Med., 336 (20), 1409 -1415.*
13. *Narod SA., Goldgar D., Cannon-Allbright L. et al., 1995. Risk modifiers in carriers of BRCA1 mutations. Int J cancer., 64 (6), 394-398.*
14. *Helzlsouer KJ., Harris EL., Parshad R. et al., 1995. Familial clustering of breast cancer: possible interaction between DNA repair proficiency and radiation exposure in the development of breast. Int J Cancer., 64 (1), 14-17.*
15. *Rosenberg L., Metzger LS., Palmer JR., 1993. Alcohol consumption and risk of breast cancer: a review of the epidemiologic evidence. Epidemiologic Reviews 15 (1):133-144.*
16. *Thune I., Brenn T., Lund E. et al., 1997. Physical activity and the risk of breast cancer. New Engl J Med., 336 (18), 1269-1275.*
17. *Pharoah PD., Day NE., Duffy S. et al, 1997. Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. Int J Cancer., 71 (5), 800-809.*
18. *Key TJ., Verkasalo., 2001. Epidemiology of breast cancer. Lancet Oncol., 2, 133-140.*
19. *Philips KA., Glendon G., Knight JA., 1999. Putting the risk of breast cancer in perspective. N Engl J Med., 340, 141-4.*
20. *Laplanche A., Benhamou E., 1991. Estimation de l'incidence des cancers en France. Bull Cancer., 78, 405-414.*
21. *Schraub S., Alauzet E., Schaffer P., Robillard., Menegoz F., 1992. Epidemiologie descriptive des cancers gynécologiques et mammaires. Rev Fr Gyn Obst., 87,*



---

577-585.

22. Claus EB., Risch NJ., Thompson WD., 1991. *Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study. Am Hum Genet.*, 48, 232-42.
23. Easton D., Peto J., 1990. *The contribution of inherited predisposition to cancer incidence. Cancer Surv.*, 9, 395-416.
24. Ponder B., 1990. *Inherited predisposition to cancer. Trends Genet.*, 6, 212-218.
25. 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.
26. Sobol H., Mazoyer S., Stoppa-Lyonnet D., Bignon Y., 1992. *Predisposition génétique au cancer. Lett cancer.*, 1 , 59-66.
27. Coupier P., Pujol , 2005. *Prédispositions héréditaires aux cancers gynécologiques. Hereditary predispositions to gynecological cancers. Gynécologie Obstétrique & Fertilité.*, 33, 851 - 856.
28. Mosor M., Ziokowska I., Pemak- Schwarz M., 2006. *Association of the heterozygous germline 1171V mutation of the NBS1 gene with childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia* , 20(8), 1454-1456.
29. Peto J., Mack TM., 2000. *High constant incidence in twins and other relatives of women with breast cancer. Nat genet.*, 26 (4), 411-4.
30. Lichtenstein P., Holm NV., 2000. *Environmental and heritable factors in the causation of cancer – analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland . N Engl J Med.*, 343 (2), 78 -85.
31. Berliner JL., Fay AM., 2007. *Practice Issues Subcommittee of the National Society of Risk assessment and genetic counseling for hereditary breast and ovarian Genet Couns.*, 16 (3), 241-60



- 
32. *Campeau PM., Foulkes WD., 2008. Hereditary brats cancer: new genetic developments, new therapeutic avenues. Hum Genet., 124,31-42*
33. *H. Sobol., D. Stoppa-Lyonnet., 2005. Prédispositions génétiques aux cancers : actualités et perspectives.*
34. *Vanderstichenlen Alice., 2002. Etude chez 98 patients du gène BRCA1 dans le dépistage de la prédisposition héréditaire au cancer du sein et ou de l'ovaire. Mémoire en sciences biomédicales cliniques. Centre de génétique humaine de l'UCL.*
35. *Eisinger F., Bressac B., Castaigne D. et al., 2004. Identification et prise en charge des prédisposition héréditaires aux cancers du sein et de l'ovaire . Bull Cancer., 91, 219-237.*
36. *Lidereau R., Eisinger F., Champeme M.H. et al., 2000. Major improvement in the efficacy of BRCA1 mutation screening using morphoclinical features of breast cancer. Cancer Res.,60, 1206-1210.*
37. *Marion Gauthier-Villars., Pascale this., Dominique Stoppa-Lyonnet., 2006. Tests de prédisposition génétique aux cancers du sein .Revue francophone des laboratoires.*
38. *Antoniou AC., Pharoah PD., McMullanG.,Day NE., Stratton MR.,Peto J. et al., 2002.A comprehensive model for familial breast cancer incorporating BRCA1, BRCA2 and other genes. Br J Cancer., 1, 76–83*
39. *Warner E., Foulkes W., Goodwin P., Meschino W., Blöndal J., Paterson C. et al., 1999. Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in unselected Ashkenazi Jewish women with breast cancer. J Natl Cancer Inst., 14 ,1241–1247.*
40. *Sunil R. Lakhani., Jocelyne Jacquemier., John P. Sloane., Barry A. Gusterson. et al, 1998. Multifactorial Analysis of Differences Between Sporadic Breast Cancers and Cancers Involving BRCA1 and BRCA2 Mutations. Oxford Journals Medicine JNCI J Natl Cancer Inst.,90, 1138-1145.*
41. *Lakhani SR., Van De Vijver MJ., Jacquemier J., Anderson TJ., Osin PP., McGuffog L., Easton DF.,2002. The Pathology of Familial Breast Cancer: Predictive Value of Immunohistochemical Markers Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, HER-2, and p53 in Patients With Mutations in BRCA1 and BRCA2. J Clin Oncol., ,20(9):2310-8*
42. *Agnès Chompret., Catherine Noguès., Dominique Stoppa-Lyonnet., 2007. Consultation d'oncogénétique pour le cancer du sein. La Presse Médicale.,36, 357-363.*



43. *H. Sobol., J. Jacquemier., D. Stoppa Lyonnet., F. Etsinger., D. Birnbaum., 2005. Prédisposition génétique aux cancers du sein et de l'ovaire: généralités et aspects cliniques.*
44. *Sobol. H., Jacquemier. J., Stoppa Lyonnet D., Etsinger.F., Birnbaum D., 2005.Caractéristiques des cancers du sein héréditaires liés aux gènes BRCA1 et BRCA2 : aspects moléculaires et morphologiques.*
45. *Miki Y., Swensen J., Shattuk-Eidens D., Futreal PA., Harshman K., Tavtigian S., Liu Q., Cochran C., Bennett LM., Ding W. et al., 1994. A strong candidate for the breast and ovarian susceptibility gene BRCA1. Science., 266, 66-71.*
46. *Kerangueven F., Essloux L., Dib A. et al., 1995 .Loss of heterozygosity and linkage analysis in breast carcinoma: indication for a putative third susceptibility gene on the short arm of chromosome 8. Oncogene., 10, 1023-1026.*
47. *Easton DF., Ford D., 1995. Bishop DT and breast Cancer Linkage Consortium. Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1 mutation carriers. Am J Hum Genet., 56, 265-271.*
48. *Jessyka Fortin., 2005. Analyses génomiques et transcriptionnelles des gènes de susceptibilité aux cancers du sein et/ ou de l'ovaire BRCA1 et BRCA2 chez les canadiennes françaises. Thèse de l'université LAVAL, Quebec.*
49. *Pellegrini L. et al., 2002. Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51- BRCA2 complex. Nature ., 420, 287-93*
50. *Rosen EM., Fan S., Pestell RG., Goldberg ID., 2003. BRCA1 gene in breast cancer. J Cell Physiol., 196, 19-41.*
51. *Deng CX., Scott F., 2000. Role of the tumor suppressor gene Brca1 in genetic stability and mammary gland tumor formation. Oncogene., 19, 1059-64.*
52. *Pellegrini L. et al., 2002. Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51- BRCA2 complex. Nature., 420, 287-93.*
53. *Connor F. et al., 1997. Tumorigenesis and a DNA repair defect in mice with a truncating Brca2 mutation. Nat Genet., 17, 423-30.*



54. *Lu M., Conzen S., Cole C., Arrick B., 1996. Characterization of functional messenger RNA splice variants of BRCA1 expressed in nonmalignant and tumor derived breast cells. Cancer Res., 56 , 4575-4581.*
55. *Venkitaraman AR., 2002.Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2.Cell., 108, 171-82.*
56. *Chen C-F., Li S., Chen P-L., Sharp ZD. Lee W-H. J., 1996 .the nuclear localization sequences of the BRCA1 protein interact with the importin-alpha subunit of the nuclear transport signal receptor. Biol.Chem., 271, 32863-32868.*
57. *venkitaraman AR., 2002.Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. Cell 25.,108 (2),171-182.*
58. *Bochar DA., Wang L., Beniya H. et al., 2000. BRCA1 is associated with a human SWI/SNF-related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer. Cell., 102,257-265.*
59. *Thompson ME., Jensen RA., Obermiller PS., Page DL., Holt JT., 1995. Decreased expression of BRCA1 accelerates growth and is often present during sporadic breast cancer progression. Nature Genet., 9, 444-450.*
60. *Roy A. Jensen., Marilyn E. Thompson., Thomas L. Jetton., Csilla I. Szabo., Riet van der Meer., Bassam Helou., Steven R. Tronick., David L. Page., Mary-Claire King.,Jeffrey T. Holt .,1996. BRCA1 is secreted and ixhibits properties of a granin. Nature Genetics., 12, 303 – 308.*
61. *Marquis ST., Rajan Y., Wynshaw-Boris A. et al.,1995.The developmental pattern of Breal expression implies a role in differentiation of the breast and other tissues. Nature Genet.,11, 17-26.*
62. *Cornelis RS., Neuhausen S Johansson .et al., 1995. High allele loss rates at17q12-q21 in breast and ovarian tumors from BRCA1-linked families. Genes Chrom Cancer., 13, 203-210.*
63. *Savitsky K., Bar-shira A., Gilad S. et al., 1995. A Single Ataxia Telangiectasia Gene with a product similar to PI-3 Kinase. Science., 268,1749-1753.*
64. *Vorechovsky C., Rasio D., Luo L. et al., 1996.The ATM gene and susceptibility to breast cancer: analysis of 38 breast tumors reveals no evidence for mutation. Cancer Res .,56, 2726-2732.*



65. Saurin A., Borden L., Boddy M., Freemont P., 1996. Does this have a familiar ring. *Trends Biochem Sci.*, 21, 208-214.
66. Abel KJ, Xu J., Yin GY., Lyons RH., Meisier MH., Weber BL., 1995. Mouse *Brcal*: localization, sequence analysis and identification of evolutionarily conserved domains. *Hum Mol Genet.*, 4, 2265-2273.
67. Sharan S., Morimatsu M., Albrecht U., Lim D., Regel E., Dinh C. et al., 1997. Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by *Rad51* in 144 mice lacking *Brcal*. *Nature*., 386, 804-810
68. Chu-Xia Deng., and Steven G., 2000. Brodie Roles of *BRCA1* and its interacting proteins. *BioEssays.*, 22, 728±737.
69. Scully R., Chen J., Plug A., Xiao Y., Weaver D., Feunteun J., Ashley T., Livingston DM. 1997. Association of *BRCA1* with *Rad 51* in mitotic and meiotic cells. *Cell.*, 88, 265±275.
70. Scully RC., Ochs RL., Keegan K., Hoekstra M., Feunteun J., and Livingston DM., 1997. Dynamic changes of *BRCA1* subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. *Cell.*, 90, 425±436.
71. Chen JJ., Silver D., Cantor S., Livingston DM., Scully R., 1999. *BRCA1*, *BRCA2*, and *Rad51* operate in a common DNA damage response pathway. *Cancer Res.*,;59, 1752s±1756s.
72. Zhong Q., Chen CF., Li S., Chen Y., Wang CC., Xiao J., Chen PL., Sharp ZD., Lee WH., 1999. Association of *BRCA1* with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. *Science.*, 285, 747±750.
73. Liu Y., Virshup., D. M., White., R. L., Hsu., L. C., 2002. Regulation of *BRCA1* phosphorylation by interaction with protein phosphatase 1alpha. *Cancer Res.*, 62, 6357-61.
74. El-Deiry., W. S., 2002. Transactivation of repair genes by *BRCA1*. *Cancer Biol Ther.*, 1, 490-1.
75. Boukamp. P. et al., 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol.*, 106, 761-71.



76. Takimoto R. et al., 2002. *BRCA1 transcriptionally regulates damaged DNA binding protein (DDB2) in the DNA repair response following UV-irradiation.* *Cancer Biol Ther.*, 1, 177-86.
77. Hartman AR. and Ford, JM., 2002. *BRCA1 induces DNA damage recognition factors and enhances nucleotide excision repair.* *Nat Genet.*, 32, 180-4.
78. Boukamp.P. et al., 1988. *Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line.* *J Cell Biol.*, 106, 761-71.
79. Jin.S. et al., 2000. *BRCA1 activation of the GADD45 promoter.* *Oncogene.*, 19, 4050-7.
80. Liu. Y., Virshup., D M., White RL.and Hsu LC., 2002. *Regulation of BRCA1 phosphorylation by interaction with protein phosphatase 1alpha.* *Cancer Res.*, 62, 6357-61.
81. Aprelikova O., Pace AJ., Fang B., Koller BH., & Liu ET., 2001. *BRCA1 is a selective co-activator of 14-3-3 sigma gene transcription in mouse embryonic stem cells.* *J BiolChem.*, 276, 25647-50 .
82. Paull TT. et al., 2000. *A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage.* *CurrBiol.*, 10, 886-95.
83. Hsu LC.and White RL., 1998. *BRCA1 is associated with the centrosome during mitosis.* *Proc Natl Acad Sci U S A .*, 95, 12983-8.
84. Hsu LC., Doan TP.and White RL., 2001. *Identification of a gamma-tubulin-binding domain in BRCA1.* *Cancer Res* 61., 7713-8.
85. Xu X. et al, 1999. *Centrosome amplification and a defective G2-M cell cycle checkpoint induce genetic instability in BRCA1 exon 11 isoform-deficient cells.* *Mol Cell.*, 3, 389-95.
86. Schlegel BP., Green VJ., Ladias JA. and Parvin JD., 2000. *BRCA1 interaction with RNA polymerase II reveals a role for hRPB2 and hRPB10alpha in activated transcription.* *ProcNatlAcadSci U S A.*, 97, 3148-53.
87. Anderson SF., Schlegel BP., Nakajima T., Wolpin ES. and Parvin JD., 1998. *BRCA1 protein is linked to the RNA polymerase II holoenzyme complex via RNA helicase A.* *Nat Genet.*, 19, 254-6.
88. Simon A. Gayther., Paul Russell., Patricia Harrington., Antonis C. Antoniou., Douglas F. Easton., and Bruce A. J. Ponder., 1999. *The Contribution of Germline BRCA1 and BRCA2*



*Mutations to Familial Ovarian Cancer: No Evidence for Other Ovarian Cancer-Susceptibility Genes.* Am J Hum Genet., 65(4), 1021–1029.

89. MacLachlan TK. et al., 2000. *BRCA1 effects on the cell cycle and the DNA damage response are linked to altered gene expression.* J BiolChem., 275, 2777-85.
90. SomasundaramK., 2003. *Breast cancer gene 1 (BRCA1): role in cell cycle regulation and DNA repair--perhaps through transcription.* J Cell Biochem., 88, 1084-91.
91. Shao N., Chai YL., Shyam E., Reddy P. and Rao VN., 1996. *Induction of apoptosis by the tumor suppressor protein BRCA1.* Oncogene., 13, 1-7.
92. Houvras Y. et al., 2000. *BRCA1 physically and functionally interacts with ATF1.* J BiolChem., 275, 36230-7.
93. Harkin DP. et al., 1999. *Induction of GADD 45 and JNK/SAPK-dependent apoptosis following inducible expression of BRCA1.* Cell., 97, 575-86.
94. Fan S. et al., 2002. *p300 Modulates the BRCA1 inhibition of estrogen receptor activity.* Cancer Res., 62, 141-51.
95. Yun J., Lee WH., 2003. *Degradation of transcription repressor ZBRK1 through the ubiquitin-proteasome pathway relieves repression of Gadd45a upon DNA damage.* Mol Cell Biol., 23, 7305-14.
96. Andres JL. et al., 1998. *Regulation of BRCA1 and BRCA2 expression in human breast cancer cells by DNA-damaging agents.* Oncogene., 16, 2229-41.
97. Arizti P. et al., 2000. *Tumor suppressor p53 is required to modulate BRCA1 expression.* Mol Cell Biol., 20, 7450-9.
98. Yoshida K. and Miki Y., 2004. *Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage.* Cancer Sci., 95, 866-71.
99. Wooster R., Bignell G., Lancaster J. et al., 1995. *Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2.* Nature., 378, 789-792.
100. Tagvitian S., Simard J., Rommens J. et al., 1996. *The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds.* Nature Genet., 12, 333-337.
101. Mazoyer S., Lalle P., Moiret C. et al., 1994. *Two germ-line mutations affecting the same nucleotide at codon 257 of p53 gene, a rare site for mutations.* Oncogene., 9, 1237-1239.



102. *Malkin D., Li F, Strong L. et al., 1990. Germ-line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. Science .,250,1233-1238.*
104. *Srivastava S., Zou Z., Piroollo K., Blattner W., Chang H.,1990. Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with LiFraumeni syndrome. Nature.,348, 747-749.*
105. *WangQ., Lasset C., SobolH., Ozturk M.,1996. Evidence of a hereditary p53 syndrome in cancer prone families. Int Cancer.,65,554-557.*
106. *Sun X., Johannsson O., Hakansson S. et al, 1996. A novel p53 germline alteration identified in a late onset breast cancer kindred. Oncogene., 13, 407-411.*
107. *Greenblatt MS., BennettWP.,Hollstein M., Harris C.,1994. Mutations in the p53 tumor suppressor gene : clue to cancer etiology and molecular pathogenesis. Cancer Res.,54, 4855-4878.*
108. *Finlay C., HindsP., Levine A.,1989. The p53 proto-oncogene can acts as a suppressor of transformation. Cell.,57, 1083-1093.*
109. *Sobol H., Birnbaum D., Eisinger F. 1994. Evidence for a third breast-cancer susceptibility gene. Lancet.,344, 1151-1152.*
110. *Kerangueven F., Essloux L., Dib A. et al., 1995 .Loss of heterozygosity and linkage analysis in breast carcinoma: indication for a putative third susceptibility gene on the short arm of chromosome 8. Oncogene.,10, 1023-1026*
111. *Nelen M., Padberg G., PettersE. et al., 1996. Localization of the gene for Cowden disease to chromosome 10q22-23.Nature Gene .,13, 114-116.*
112. *Kerangueven F., Eisinger F., Noguchi T.1996. et al .,Loss of heterozygosity in human breast carcinomas in the ataxia telangiectasia, Cowden disease andBRCA1 gene regions. Oncogene., 14, 339-347.*
113. *Wooster R., Mangion J., Eeles R. et al, 1992 .A germ-line mutation in the androgen receptor gene in two brothers with breast cancer and Reifenstein syndrome.Nature Genet., 2, 132-134.*
114. *Hutter P., Couturier A., Scotter. et al, 1996.Complex genetic predisposition to cancer in an extended HNPCC family with an ancestral hMLH1 mutation.J Med Genet., 33, 636-640.*



115. *Swift M., Reitnauer P., Morrell D., Chase C., 1987. Breast and other cancers in families with ataxia telangiectasia. N Engl Med., 316(12):1289-1294.*
116. *Kerangueven F., Nouguchi T., Wagniez V. et al., 1996. Multiple sites of loss of heterozygosity on chromosome arms 3p and 3q in human breast carcinomas. Oncology Rep., 3(3):313-316.*
117. *Negrini M., Rasio D., Hampton G. et al., 1995. Definition and refinement of chromosome 11 regions of loss of heterozygosity in breast cancer: identification of a new region at 11q23.3. Cancer Res., 55(15):3003-3007.*
118. *Eisinger F., Bressac B., Castaigne D., Cottu P., Lansac J., Lefranc JP. et al., 2004. Identification et prise en charge des prédispositions héréditaires aux cancers du sein et de l'ovaire (mise à jour 2004). Bull Cancer., 91(3):219-37.*
119. *Meunier M., Stoppa-Lyonnet D., 2005. Dépistage IRM du cancer du sein chez les femmes à haut risque: une avancée dans le dépistage. Med Sci (Paris)., 21(1):26-7.*
120. *Agnès Chompret., Catherine Noguès., Dominique Stoppa-Lyonnet., 2007. Consultation d'oncogénétique pour le cancer du sein. La Presse Médicale., 36(3):357-363.*
121. *Rebbeck TR., Friebel T., Lynch HT., Neuhausen S., Van't V., Garber JE. et al., 2004. Bilateral prophylactic mastectomy reduces breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: the PROSE Study Group. J Clin Oncol., 22(6):1055-62.*
122. *Eisen A., Lubinski J., Klijn J., Moller P., Lynch H., Offit K. et al., 2005. Breast cancer risk following bilateral oophorectomy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: an international casecontrolstudy. J Clin Oncol., 30(23):7491-6.*
123. *Amal Tazzitea., Hassan Jouhadi b., SellamaNadifi a., Paolo Aretini c., Elisabetta Falaschi c., Anita Collavoli c., Abdellatif Benider b., Maria Adelaide Caligo c., 2012. BRCA1 and BRCA2 germline mutations in Moroccan breast/ovarian cancer families: Novel mutations and unclassified variants. Gynecologic Oncology., 125(4):687-692.*
124. *PornpenPanomwan., 2006. screening of mutation of BRCA1 in Thai breast cancer patients by Single-Stranded Conformation Polymorphism (SSCP). Thesis (M.Pharm., Pharmaceutical Science) Prince of Songkla University.*
125. *Rozany Mucha Dufloth., Sílvia Carvalho., Juliana Karina Heinrich., Júlia Yoriko Shinzato., César Cabello dos Santos., Luiz Carlos Zeferino., Fernando Schmitt., 2005. Analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in Brazilian breast cancer patients with positive family history. Centro de Atenção*



*Integral à Saúde da Mulher, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil, and Institute of Pathology and Molecular Immunology, University of Porto, Porto, Portugal* *Sao Paulo Med J., 123(4), 192-7.*

*126. Sonja Levanat., Vesna Musani., Mirela Levacic Cvok. et al., 2012. Three novel BRCA1/BRCA2 mutation in breast/ovarian cancer families in Croatia*

*127. A. Vijayalakshmi1., V. Lakshmi1., P. Veerraju., 2011. Novel Sequence Variants and a High Frequency of Recurrent Polymorphisms in BRCA1 Gene in Breast Cancer Women of North Coastal Andhra Pradesh. Int J Hum Genet., 11(2), 127-133.*

**Lieu du stage : Laboratoire de génétique médicale de CHU Hassan II de Fes**



Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

**Nom et prénom: Hasna HAMDAOUI**

**Année Universitaire : 2012 - 2013**

**Titre: L'exploration de l'exon 11 du gène BRCA1 de la population du nord du Maroc**

#### **Résumé**

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez la femme. 5 à 10% des cancers du sein et/ ou de l'ovaire sont des formes héréditaires transmises selon le mode autosomique dominant et sont dues à une mutation dans les gènes de prédisposition au cancer du sein et/ ou de l'ovaire BRCA1 ou BRCA2. Le gène BRCA1, localisé en 17q21, s'étend sur près de 100 kb et code pour un ADN complémentaire de 5592 nucléotides. Le transcrit, code une protéine de 1863 AA qui joue un rôle majeur dans l'homéostasie du patrimoine génétique en participant à divers processus tels la réparation d'ADN, la recombinaison homologue et le contrôle de la division cellulaire.

Le travail présent a pour objectif l'évaluation de l'importance du rôle que joue le gène BRCA1 dans la carcinogenèse de 22 patientes marocaines non apparentées, ayant développé un cancer du sein et/ ou de l'ovaire et pour lesquelles un échantillon du sang avait été réceptionné dans notre laboratoire.

La sélection de ces 22 patientes s'est effectuée selon leur histoire personnelle et /ou familiale en retenant comme critères principaux, l'âge au diagnostic, la présence d'autres tumeurs, la bilatéralité du cancer du sein, l'atteinte d'un sujet de sexe masculin, la présence de cas de cancers du sein et ou de l'ovaire chez au moins un apparenté du premier ou du second degré du patient.



Etant donné la grande taille du gène, la stratégie moléculaire adaptée, consiste à rechercher les mutations qui ont déjà été identifiées chez la population marocaine par des études antérieures. La recherche d'autres mutations existantes sur les fragments amplifiés par la technique PCR et séquençage bidirectionnel a été également réalisée.

L'étude a permis de montrer l'absence des mutations sur l'exon 11. Toutefois, l'existence d'un polymorphisme chez 20% des patientes et qui n'a pas de conséquences phénotypiques a été identifié.

**Mots clés: Prédisposition ; BRCA1 ; Hérédité ; Cancer ; Familiale ; Gène ; Exon 11**