



HAL
open science

Cancer du sein triple négatif: histoire naturelle et étude des facteurs génétiques impliqués

Pierre Naïbo

► **To cite this version:**

Pierre Naïbo. Cancer du sein triple négatif: histoire naturelle et étude des facteurs génétiques impliqués. Sciences du Vivant [q-bio]. 2018. dumas-02023905

HAL Id: dumas-02023905

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02023905>

Submitted on 18 Feb 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**Faculté
de Médecine**

Aix*Marseille Université

**Cancer du sein triple négatif :
histoire naturelle et étude des facteurs génétiques impliqués**

T H È S E

Présentée et publiquement soutenue devant

LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MARSEILLE

Le 10 Octobre 2018

Par Monsieur Pierre NAÏBO

Né le 18 avril 1989 à Talence (33)

Pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

D.E.S. de BIOLOGIE MÉDICALE

Membres du Jury de la Thèse :

Monsieur le Professeur GONCALVES Anthony

Président

Monsieur le Professeur MORANGE Pierre-Emmanuel

Assesseur

Monsieur le Professeur KRAHN Martin

Assesseur

Monsieur le Professeur des Universités SOBOL Hagay

Assesseur



**Faculté
de Médecine**
Aix*Marseille Université

**Cancer du sein triple négatif :
histoire naturelle et étude des facteurs génétiques impliqués**

T H È S E

Présentée et publiquement soutenue devant

LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MARSEILLE

Le 10 Octobre 2018

Par Monsieur Pierre NAÏBO

Né le 18 avril 1989 à Talence (33)

Pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

D.E.S. de BIOLOGIE MÉDICALE

Membres du Jury de la Thèse :

Monsieur le Professeur GONCALVES Anthony

Président

Monsieur le Professeur MORANGE Pierre-Emmanuel

Assesseur

Monsieur le Professeur KRAHN Martin

Assesseur

Monsieur le Professeur des Universités SOBOL Hagay

Assesseur

AIX-MARSEILLE UNIVERSITE

Président : Yvon BERLAND

FACULTE DE MEDECINE

Doyen : Georges LEONETTI

Vice-Doyen aux Affaires Générales : Patrick DESSI
Vice-Doyen aux Professions Paramédicales : Philippe BERBIS

Asseseurs :

- * aux Etudes : Jean-Michel VITON
- * à la Recherche : Jean-Louis MEGE
- * aux Prospectives Hospitalo-Universitaires : Frédéric COLLART
- * aux Enseignements Hospitaliers : Patrick VILLANI
- * à l'Unité Mixte de Formation Continue en Santé : Fabrice BARLESI
- * pour le Secteur Nord : Stéphane BERDAH
- * aux centres hospitaliers non universitaires : Jean-Noël ARGENSON

Chargés de mission :

- * 1^{er} cycle : Jean-Marc DURAND et Marc BARTHET
- * 2^{ème} cycle : Marie-Aleth RICHARD
- * 3^{ème} cycle DES/DESC : Pierre-Edouard FOURNIER
- * Licences-Masters-Doctorat : Pascal ADALIAN
- * DU-DIU : Véronique VITTON
- * Stages Hospitaliers : Franck THUNY
- * Sciences Humaines et Sociales : Pierre LE COZ
- * Préparation à l'ECN : Aurélie DAUMAS
- * Démographie Médicale et Filiarisation : Roland SAMBUC
- * Relations Internationales : Philippe PAROLA
- * Etudiants : Arthur ESQUER

Chef des services généraux : * Déborah ROCCHICCIOLI

Chefs de service :

- * Communication : Laetitia DELOUIS
- * Examens : Caroline MOUTTET
- * Logistique : Joëlle FRAVEGA
- * Maintenance : Philippe KOCK
- * Scolarité : Christine GAUTHIER

DOYENS HONORAIRES

M. Yvon BERLAND
M. André ALI CHERIF
M. Jean-François PELLISSIER

PROFESSEURS HONORAIRES

MM	AGOSTINI Serge	MM	FIGARELLA Jacques
	ALDIGHERI René		FONTES Michel
	ALESSANDRINI Pierre		FRANCOIS Georges
	ALLIEZ Bernard		FUENTES Pierre
	AQUARON Robert		GABRIEL Bernard
	ARGEME Maxime		GALINIER Louis
	ASSADOURIAN Robert		GALLAIS Hervé
	AUFFRAY Jean-Pierre		GAMERRE Marc
	AUTILLO-TOUATI Amapola		GARCIN Michel
	AZORIN Jean-Michel		GARNIER Jean-Marc
	BAILLE Yves		GAUTHIER André
	BARDOT Jacques		GERARD Raymond
	BARDOT André		GEROLAMI-SANTANDREA André
	BERARD Pierre		GIUDICELLI Roger
	BERGOIN Maurice		GIUDICELLI Sébastien
	BERNARD Dominique		GOUDARD Alain
	BERNARD Jean-Louis		GOUIN François
	BERNARD Pierre-Marie		GRISOLI François
	BERTRAND Edmond		GROULIER Pierre
	BISSET Jean-Pierre		HADIDA/SAYAG Jacqueline
	BLANC Bernard		HASSOUN Jacques
	BLANC Jean-Louis		HEIM Marc
	BOLLINI Gérard		HOUEL Jean
	BONGRAND Pierre		HUGUET Jean-François
	BONNEAU Henri		JAQUET Philippe
	BONNOIT Jean		JAMMES Yves
	BORY Michel		JOUBE Paulette
	BOTTA Alain		JUHAN Claude
	BOURGEADE Augustin		JUIN Pierre
	BOUVENOT Gilles		KAPHAN Gérard
	BOUYALA Jean-Marie		KASBARIAN Michel
	BREMOND Georges		KLEISBAUER Jean-Pierre
	BRICOT René		LACHARD Jean
	BRUNET Christian		LAFFARGUE Pierre
	BUREAU Henri		LAUGIER René
	CAMBOULIVES Jean		LEVY Samuel
	CANNONI Maurice		LOUCHET Edmond
	CARTOUZOU Guy		LOUIS René
			LUCIANI Jean-Marie
	CHAMLIAN Albert		MAGALON Guy
	CHARREL Michel		MAGNAN Jacques
	CHAUVEL Patrick		MALLAN- MANCINI Josette
	CHOUX Maurice		MALMEJAC Claude
	CIANFARANI François		MATTEI Jean François
	CLEMENT Robert		MERCIER Claude
	COMBALBERT André		METGE Paul
	CONTE-DEVOLX Bernard		MICHOTEY Georges
	CORRIOL Jacques		MILLET Yves
	COULANGE Christian		MIRANDA François
	DALMAS Henri		MONFORT Gérard
	DE MICO Philippe		MONGES André
	DELARQUE Alain		MONGIN Maurice
	DEVIN Robert		MONTIES Jean-Raoul
	DEVRED Philippe		NAZARIAN Serge
	DJIANE Pierre		NICOLI René
	DONNET Vincent		NOIRCLERC Michel
	DUCASSOU Jacques		OLMER Michel
	DUFOUR Michel		OREHEK Jean
	DUMON Henri		PAPY Jean-Jacques
	FARNARIER Georges		PAULIN Raymond
	FAVRE Roger		PELOUX Yves
	FIECHI Marius		PENAUD Antony

MM PENE Pierre
PIANA Lucien
PICAUD Robert
PIGNOL Fernand
POGGI Louis
POITOUT Dominique
PONCET Michel
POUGET Jean
PRIVAT Yvan
QUILICHINI Francis
RANQUE Jacques
RANQUE Philippe
RICHAUD Christian
ROCHAT Hervé
ROHNER Jean-Jacques
ROUX Hubert
ROUX Michel
RUFO Marcel
SAHEL José
SALAMON Georges
SALDUCCI Jacques
SAN MARCO Jean-Louis
SANKALE Marc
SARACCO Jacques
SARLES Jean-Claude
SASTRE Bernard
SCHIANO Alain
SCOTTO Jean-Claude
SEBAHOUN Gérard
SERMENT Gérard
SERRATRICE Georges
SOULAYROL René
STAHL André
TAMALET Jacques
TARANGER-CHARPIN Colette
THOMASSIN Jean-Marc
UNAL Daniel
VAGUE Philippe
VAGUE/JUHAN Irène
VANUXEM Paul
VERVLOET Daniel
VIALETTES Bernard
WEILLER Pierre-Jean

PROFESSEURS HONORIS CAUSA

1967

MM. les Professeurs
DADI (Italie)
CID DOS SANTOS (Portugal)

1974

MM. les Professeurs
MAC ILWAIN (Grande-Bretagne)
T.A. LAMBO (Suisse)

1975

MM. les Professeurs
O. SWENSON (U.S.A.)
Lord J.WALTON of DETCHANT (Grande-Bretagne)

1976

MM. les Professeurs
P. FRANCHIMONT (Belgique)
Z.J. BOWERS (U.S.A.)

1977

MM. les Professeurs
C. GAJDUSEK-Prix Nobel (U.S.A.)
C.GIBBS (U.S.A.)
J. DACIE (Grande-Bretagne)

1978

M. le Président
F. HOUPHOUET-BOIGNY (Côte d'Ivoire)

1980

MM. les Professeurs
A. MARGULIS (U.S.A.)
R.D. ADAMS (U.S.A.)

1981

MM. les Professeurs
H. RAPPAPORT (U.S.A.)
M. SCHOU (Danemark)
M. AMENT (U.S.A.)
Sir A. HUXLEY (Grande-Bretagne)
S. REFSUM (Norvège)

1982

M. le Professeur
W.H. HENDREN (U.S.A.)

1985

MM. les Professeurs
S. MASSRY (U.S.A.)
KLINSMANN (R.D.A.)

1986

MM. les Professeurs
E. MIHICH (U.S.A.)
T. MUNSAT (U.S.A.)
LIANA BOLIS (Suisse)
L.P. ROWLAND (U.S.A.)

1987

M. le Professeur
P.J. DYCK (U.S.A.)

1988

MM. les Professeurs
R. BERGUER (U.S.A.)
W.K. ENGEL (U.S.A.)
V. ASKANAS (U.S.A.)
J. WEHSTER KIRKLIN (U.S.A.)
A. DAVIGNON (Canada)
A. BETTARELLO (Brésil)

1989

M. le Professeur
P. MUSTACCHI (U.S.A.)

1990	
MM. les Professeurs	J.G. MC LEOD (Australie) J. PORTER (U.S.A.)
1991	
MM. les Professeurs	J. Edward MC DADE (U.S.A.) W. BURGDORFER (U.S.A.)
1992	
MM. les Professeurs	H.G. SCHWARZACHER (Autriche) D. CARSON (U.S.A.) T. YAMAMURO (Japon)
1994	
MM. les Professeurs	G. KARPATI (Canada) W.J. KOLFF (U.S.A.)
1995	
MM. les Professeurs	D. WALKER (U.S.A.) M. MULLER (Suisse) V. BONOMINI (Italie)
1997	
MM. les Professeurs	C. DINARELLO (U.S.A.) D. STULBERG (U.S.A.) A. MEIKLE DAVISON (Grande-Bretagne) P.I. BRANEMARK (Suède)
1998	
MM. les Professeurs	O. JARDETSKY (U.S.A.)
1999	
MM. les Professeurs	J. BOTELLA LLUSIA (Espagne) D. COLLEN (Belgique) S. DIMAURO (U. S. A.)
2000	
MM. les Professeurs	D. SPIEGEL (U. S. A.) C. R. CONTI (U.S.A.)
2001	
MM. les Professeurs	P-B. BENNET (U. S. A.) G. HUGUES (Grande Bretagne) J-J. O'CONNOR (Grande Bretagne)
2002	
MM. les Professeurs	M. ABEDI (Canada) K. DAI (Chine)
2003	
M. le Professeur Sir	T. MARRIE (Canada) G.K. RADDI (Grande Bretagne)
2004	
M. le Professeur	M. DAKE (U.S.A.)
2005	
M. le Professeur	L. CAVALLI-SFORZA (U.S.A.)
2006	
M. le Professeur	A. R. CASTANEDA (U.S.A.)
2007	
M. le Professeur	S. KAUFMANN (Allemagne)

EMERITAT

2008

M. le Professeur	LEVY Samuel	31/08/2011
Mme le Professeur	JUHAN-VAGUE Irène	31/08/2011
M. le Professeur	PONCET Michel	31/08/2011
M. le Professeur	KASBARIAN Michel	31/08/2011
M. le Professeur	ROBERTOUX Pierre	31/08/2011

2009

M. le Professeur	DJIANE Pierre	31/08/2011
M. le Professeur	VERVLOET Daniel	31/08/2012

2010

M. le Professeur	MAGNAN Jacques	31/12/2014
------------------	----------------	------------

2011

M. le Professeur	DI MARINO Vincent	31/08/2015
M. le Professeur	MARTIN Pierre	31/08/2015
M. le Professeur	METRAS Dominique	31/08/2015

2012

M. le Professeur	AUBANIAC Jean-Manuel	31/08/2015
M. le Professeur	BOUVENOT Gilles	31/08/2015
M. le Professeur	CAMBOULIVES Jean	31/08/2015
M. le Professeur	FAVRE Roger	31/08/2015
M. le Professeur	MATTEI Jean-François	31/08/2015
M. le Professeur	OLIVER Charles	31/08/2015
M. le Professeur	VERVLOET Daniel	31/08/2015

2013

M. le Professeur	BRANCHEREAU Alain	31/08/2016
M. le Professeur	CARAYON Pierre	31/08/2016
M. le Professeur	COZZONE Patrick	31/08/2016
M. le Professeur	DELMONT Jean	31/08/2016
M. le Professeur	HENRY Jean-François	31/08/2016
M. le Professeur	LE GUICHAOUA Marie-Roberte	31/08/2016
M. le Professeur	RUFO Marcel	31/08/2016
M. le Professeur	SEBAHOUN Gérard	31/08/2016

2014

M. le Professeur	FUENTES Pierre	31/08/2017
M. le Professeur	GAMERRE Marc	31/08/2017
M. le Professeur	MAGALON Guy	31/08/2017
M. le Professeur	PERAGUT Jean-Claude	31/08/2017
M. le Professeur	WEILLER Pierre-Jean	31/08/2017

2015

M. le Professeur	COULANGE Christian	31/08/2018
M. le Professeur	COURAND François	31/08/2018
M. le Professeur	FAVRE Roger	31/08/2016
M. le Professeur	MATTEI Jean-François	31/08/2016
M. le Professeur	OLIVER Charles	31/08/2016
M. le Professeur	VERVLOET Daniel	31/08/2016

2016

M. le Professeur	BONGRAND Pierre	31/08/2019
M. le Professeur	BOUVENOT Gilles	31/08/2017
M. le Professeur	BRUNET Christian	31/08/2019
M. le Professeur	CAU Pierre	31/08/2019
M. le Professeur	COZZONE Patrick	31/08/2017
M. le Professeur	FAVRE Roger	31/08/2017
M. le Professeur	FONTES Michel	31/08/2019
M. le Professeur	JAMMES Yves	31/08/2019
M. le Professeur	NAZARIAN Serge	31/08/2019
M. le Professeur	OLIVER Charles	31/08/2017
M. le Professeur	POITOUT Dominique	31/08/2019
M. le Professeur	SEBAHOUN Gérard	31/08/2017
M. le Professeur	VIALETTES Bernard	31/08/2019

2017

M. le Professeur	ALESSANDRINI Pierre	31/08/2020
M. le Professeur	BOUVENOT Gilles	31/08/2018
M. le Professeur	CHAUVEL Patrick	31/08/2020
M. le Professeur	COZZONE Pierre	31/08/2018
M. le Professeur	DELMONT Jean	31/08/2018
M. le Professeur	FAVRE Roger	31/08/2018
M. le Professeur	OLIVER Charles	31/08/2018
M. le Professeur	SEBBAHOUN Gérard	31/08/2018

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

AGOSTINI FERRANDES Aubert	CHOSSEGROS Cyrille	GRIMAUD Jean-Charles
ALBANESE Jacques	<i>CLAVERIE Jean-Michel Surnombre</i>	GROB Jean-Jacques
ALIMI Yves	COLLART Frédéric	GUEDJ Eric
AMABILE Philippe	COSTELLO Régis	GUIEU Régis
AMBROSI Pierre	COURBIERE Blandine	GUIS Sandrine
ANDRE Nicolas	COWEN Didier	GUYE Maxime
ARGENSON Jean-Noël	CRAVELLO Ludovic	GUYOT Laurent
ASTOUL Philippe	CUISSET Thomas	GUYS Jean-Michel
ATTARIAN Shahram	CURVALE Georges	HABIB Gilbert
AUDOUIN Bertrand	DA FONSECA David	HARDWIGSEN Jean
AUQUIER Pascal	DAHAN-ALCARAZ Laetitia	HARLE Jean-Robert
AVIERINOS Jean-François	DANIEL Laurent	HOFFART Louis
AZULAY Jean-Philippe	DARMON Patrice	HOUVENAEGHEL Gilles
BAILLY Daniel	D'ERCOLE Claude	JACQUIER Alexis
BARLESI Fabrice	D'JOURNO Xavier	JOURDE-CHICHE Noémie
BARLIER-SETTI Anne	DEHARO Jean-Claude	JOUVE Jean-Luc
BARTHET Marc	DELPERO Jean-Robert	KAPLANSKI Gilles
BARTOLI Jean-Michel	DENIS Danièle	KARSENTY Gilles
BARTOLI Michel	<i>DESSEIN Alain Surnombre</i>	KERBAUL François
<i>BARTOLIN Robert Surnombre</i>	DESSI Patrick	KRAHN Martin
BARTOLOMEI Fabrice	DISDIER Patrick	LAFFORGUE Pierre
BASTIDE Cyrille	DODDOLI Christophe	LAGIER Jean-Christophe
BENSOUSSAN Laurent	DRANCOURT Michel	LAMBAUDIE Eric
BERBIS Philippe	DUBUS Jean-Christophe	LANCON Christophe
BERDAH Stéphane	DUFFAUD Florence	LA SCOLA Bernard
<i>BERLAND Yvon Surnombre</i>	DUFOUR Henry	LAUNAY Franck
BERNARD Jean-Paul	DURAND Jean-Marc	LAVIEILLE Jean-Pierre
BEROUD Christophe	DUSSOL Bertrand	LE CORROLLER Thomas
BERTUCCI François	<i>ENJALBERT Alain Surnombre</i>	<i>LE TREUT Yves-Patrice Surnombre</i>
BLAISE Didier	EUSEBIO Alexandre	LECHEVALLIER Eric
BLIN Olivier	FAKHRY Nicolas	LEGRE Régis
BLONDEL Benjamin	<i>FAUGERE Gérard Surnombre</i>	LEHUCHER-MICHEL Marie-Pascale
BONIN/GUILLAUME Sylvie	FELICIAN Olivier	LEONE Marc
BONELLO Laurent	FENOLLAR Florence	LEONETTI Georges
BONNET Jean-Louis	FIGARELLA/BRANGER Dominique	LEPIDI Hubert
BOTTA/FRIDLUND Danielle	FLECHER Xavier	LEVY Nicolas
BOUBLI Léon	FOURNIER Pierre-Edouard	MACE Loïc
BOYER Laurent	<i>FRANCES Yves Surnombre</i>	MAGNAN Pierre-Edouard
BREGEON Fabienne	FUENTES Stéphane	<i>MARANINCHI Dominique Surnombre</i>
BRETELLE Florence	GABERT Jean	<i>MARTIN Claude Surnombre</i>
BROUQUI Philippe	GAINNIER Marc	MATONTI Frédéric
BRUDER Nicolas	GARCIA Stéphane	MEGE Jean-Louis
BRUE Thierry	GARIBOLDI Vlad	MERROT Thierry
BRUNET Philippe	GAUDART Jean	METZLER/GUILLEMAIN Catherine
BURTEY Stéphane	GAUDY-MARQUESTE Caroline	MEYER/DUTOUR Anne
CARCOPINO-TUSOLI Xavier	GENTILE Stéphanie	MICCALEF/ROLL Joëlle
CASANOVA Dominique	GERBEAUX Patrick	MICHEL Fabrice
CASTINETTI Frédéric	GEROLAMI/SANTANDREA René	MICHEL Gérard
CECCALDI Mathieu	GILBERT/ALESSI Marie-Christine	MICHELET Pierre
CHABOT Jean-Michel	GIORGI Roch	MILH Mathieu
CHAGNAUD Christophe	GIOVANNI Antoine	MOAL Valérie
CHAMBOST Hervé	GIRARD Nadine	MONCLA Anne
CHAMPSAUR Pierre	GIRAUD/CHABROL Brigitte	MORANGE Pierre-Emmanuel
CHANEZ Pascal	GONCALVES Anthony	MOULIN Guy
CHARAFFE-JAUFFRET Emmanuelle	GORINCOUR Guillaume	MOUTARDIER Vincent
CHARREL Rémi	GRANEL/REY Brigitte	<i>MUNDLER Olivier Surnombre</i>
<i>CHARPIN Denis Surnombre</i>	GRANVAL Philippe	NAUDIN Jean
CHAUMOITRE Kathia	GREILLIER Laurent	NICOLAS DE LAMBALLERIE Xavier
CHIARONI Jacques	<i>GRILLO Jean-Marie Surnombre</i>	NICOLLAS Richard
CHINOT Olivier		OLIVE Daniel

OUAFIK L'Houcine
PAGANELLI Franck
PANUEL Michel
PAPAZIAN Laurent
PAROLA Philippe
PARRATTE Sébastien
PELISSIER-ALICOT Anne-Laure
PELLETIER Jean
PETIT Philippe
PHAM Thao
PIERCECCHI/MARTI Marie-Dominique
PIQUET Philippe
PIRRO Nicolas
POINSO François
RACCAH Denis
RAOULT Didier
REGIS Jean
REYNAUD/GAUBERT Martine
REYNAUD Rachel
RICHARD/LALLEMAND Marie-Aleth
RIDINGS Bernard Surnombre

ROCHE Pierre-Hugues
ROCH Antoine
ROCHWERGER Richard
ROLL Patrice
ROSSI Dominique
ROSSI Pascal
ROUDIER Jean
SALAS Sébastien
SAMBUC Roland Surnombre
SARLES Jacques
SARLES/PHILIP Nicole
SCAVARDA Didier
SCHLEINITZ Nicolas
SEBAG Frédéric
SEITZ Jean-François
SIELEZNEFF Igor
SIMON Nicolas
STEIN Andréas
TAIEB David
THIRION Xavier
THOMAS Pascal

THUNY Franck
TREBUCHON-DA FONSECA Agnès
TRIGLIA Jean-Michel
TROPIANO Patrick
TSIMARATOS Michel
TURRINI Olivier
VALERO René
VAROQUAUX Arthur Damien
VELLY Lionel
VEY Norbert
VIDAL Vincent
VIENS Patrice
VILLANI Patrick
VITON Jean-Michel
VITTON Véronique
VIEHWEGER Heide Elke
VIVIER Eric
XERRI Luc

PROFESSEUR DES UNIVERSITES

ADALIAN Pascal
AGHABABIAN Valérie
BELIN Pascal
CHABANNON Christian
CHABRIERE Eric
FERON François
LE COZ Pierre
LEVASSEUR Anthony
RANJEVA Jean-Philippe
SOBOL Hagay

PROFESSEUR CERTIFIE

BRANDENBURGER Chantal

PRAG

TANTI-HARDOUIN Nicolas

PROFESSEUR ASSOCIE DE MEDECINE GENERALE A MI-TEMPS

ADNOT Sébastien
FILIPPI Simon

PROFESSEUR ASSOCIE A TEMPS PARTIEL

BURKHART Gary

MAITRE DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

ACHARD Vincent (<i>disponibilité</i>)	FABRE Alexandre	NINOVE Laetitia
ANGELAKIS Emmanouil	FOLETTI Jean- Marc	NOUGAIREDE Antoine
ATLAN Catherine (<i>disponibilité</i>)	FOUILLOUX Virginie	OLLIVIER Matthieu
BARTHELEMY Pierre	FROMNOT Julien	OUDIN Claire
BARTOLI Christophe	GABORIT Bénédicte	OVAERT Caroline
BEGE Thierry	GASTALDI Marguerite	PAULMYER/LACROIX Odile
BELIARD Sophie	GELSI/BOYER Véronique	PERRIN Jeanne
BERBIS Julie	GIUSIANO Bernard	RANQUE Stéphane
BERGE-LEFRANC Jean-Louis	GIUSIANO COURCAMBECK Sophie	REY Marc
BEYER-BERJOT Laura	GONZALEZ Jean-Michel	ROBERT Philippe
BIRNBAUM David	GOURIET Frédérique	SABATIER Renaud
BONINI Francesca	GRAILLON Thomas	SARI-MINODIER Irène
BOUCRAUT Joseph	GRISOLI Dominique	SARLON-BARTOLI Gabrielle
BOULAMERY Audrey	GUENOUN MEYSSIGNAC Daphné	SAVEANU Alexandru
BOULLU/CIOCCA Sandrine	GUIDON Catherine	SECQ Véronique
BUFFAT Christophe	HAUTIER/KRAHN Aurélie	TOGA Caroline
CAMILLERI Serge	HRAIECH Sami	TOGA Isabelle
CARRON Romain	KASPI-PEZZOLI Elise	TROUSSE Delphine
CASSAGNE Carole	L'OLLIVIER Coralie	TUCHTAN-TORRENTS Lucile
CHAUDET Hervé	LABIT-BOUVIER Corinne	VALLI Marc
COZE Carole	LAFAGE/POCHITALOFF-HUVALE Marina	VELY Frédéric
DADOUN Frédéric (<i>disponibilité</i>)	LAGIER Aude (<i>disponibilité</i>)	VION-DURY Jean
DALES Jean-Philippe	LAGOUANELLE/SIMEONI Marie-Claude	ZATTARA/CANNONI Hélène
DAUMAS Aurélie	LEVY/MOZZICONACCI Annie	
DEGEORGES/VITTE Joëlle	LOOSVELD Marie	
DEL VOLGO/GORI Marie-José	MANCINI Julien	
DELLIAUX Stéphane	MARY Charles	
DESPLAT/JEGO Sophie	MASCAUX Céline	
DEVEZE Arnaud (<i>Disponibilité</i>)	MAUES DE PAULA André	
DUBOURG Grégory	MILLION Matthieu	
DUFOUR Jean-Charles	MOTTOLA GHIGO Giovanna	
EBBO Mikaël	NGUYEN PHONG Karine	

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

(mono-appartenants)

ABU ZINEH Mohammad	DEGIOANNI/SALLE Anna	POGGI Marjorie
BARBACARU/PERLES T. A.	DESNUES Benoît	RUEL Jérôme
BERLAND/BENHAIM Caroline		STEINBERG Jean-Guillaume
BOUCAULT/GARROUSTE Françoise	MARANINCHI Marie	THOLLON Lionel
BOYER Sylvie	MERHEJ/CHAUVEAU Vicky	THIRION Sylvie
COLSON Sébastien	MINVIELLE/DEVICTOR Bénédicte	VERNA Emeline

MAITRE DE CONFERENCES DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

GENTILE Gaëtan

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES DE MEDECINE GENERALE à MI-TEMPS

BARGIER Jacques
BONNET Pierre-André
CALVET-MONTREDON Céline
GUIDA Pierre
JANCZEWSKI Aurélie

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE à MI-TEMPS

REVIS Joana

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE à TEMPS-PLEIN

TOMASINI Pascale

PROFESSEURS DES UNIVERSITES et MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS
PROFESSEURS ASSOCIES, MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES mono-appartenants

ANATOMIE 4201

CHAMPSAUR Pierre (PU-PH)
LE CORROLLER Thomas (PU-PH)
PIRRO Nicolas (PU-PH)

GUENOUN-MEYSSIGNAC Daphné (MCU-PH)
LAGIER Aude (MCU-PH) disponibilité

THOLLON Lionel (MCF) (60ème section)

ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES 4203

CHARAFE/JAUFFRET Emmanuelle (PU-PH)
DANIEL Laurent (PU-PH)
FIGARELLA/BRANGER Dominique (PU-PH)
GARCIA Stéphane (PU-PH)
XERRI Luc (PU-PH)

DALES Jean-Philippe (MCU-PH)
GIUSIANO COURCAMBECK Sophie (MCU PH)
LABIT/BOUVIER Corinne (MCU-PH)
MAUES DE PAULA André (MCU-PH)
SECQ Véronique (MCU-PH)

**ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE ;
MEDECINE URGENCE 4801**

ALBANESE Jacques (PU-PH)
BRUDER Nicolas (PU-PH)
KERBAUL François (PU-PH)
LEONE Marc (PU-PH)
MARTIN Claude (PU-PH) Surnombre
MICHEL Fabrice (PU-PH)
MICHELET Pierre (PU-PH)
VELLY Lionel (PU-PH)

GUIDON Catherine (MCU-PH)

ANGLAIS 11

BRANDENBURGER Chantal (PRCE)

BURKHART Gary (PAST)

**BIOLOGIE ET MEDECINE DU DEVELOPPEMENT
ET DE LA REPRODUCTION ; GYNECOLOGIE MEDICALE 5405**

METZLER/GUILLEMAIN Catherine (PU-PH)

PERRIN Jeanne (MCU-PH)

BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE 4301

GUEDJ Eric (PU-PH)
GUYE Maxime (PU-PH)
MUNDLER Olivier (PU-PH) Surnombre
TAIEB David (PU-PH)

BELIN Pascal (PR) (69ème section)
RANJEVA Jean-Philippe (PR) (69ème section)

CAMMILLERI Serge (MCU-PH)
VION-DURY Jean (MCU-PH)

BARBACARU/PERLES Téodora Adriana (MCF) (69ème section)

**BIOSTATISTIQUES, INFORMATIQUE MEDICALE
ET TECHNOLOGIES DE COMMUNICATION 4604**

CLAVERIE Jean-Michel (PU-PH) Surnombre
GAUDART Jean (PU-PH)
GIORGI Roch (PU-PH)

CHAUDET Hervé (MCU-PH)
DUFOUR Jean-Charles (MCU-PH)

ANTHROPOLOGIE 20

ADALIAN Pascal (PR)

DEGIOANNI/SALLE Anna (MCF)
VERNA Emeline (MCF)

BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE ; HYGIENE HOSPITALIERE 4501

CHARREL Rémi (PU PH)
DRANCOURT Michel (PU-PH)
FENOLLAR Florence (PU-PH)
FOURNIER Pierre-Edouard (PU-PH)
NICOLAS DE LAMBALLERIE Xavier (PU-PH)
LA SCOLA Bernard (PU-PH)
RAOULT Didier (PU-PH)

ANGELAKIS Emmanouil (MCU-PH)
DUBOURG Grégory (MCU-PH)
GOURIET Frédérique (MCU-PH)
NOUGAIREDE Antoine (MCU-PH)
NINOVE Laetitia (MCU-PH)

CHABRIERE Eric (PR) (64ème section)
LEVASSEUR Anthony (PR) (64ème section)
DESNUES Benoit (MCF) (65ème section)
MERHEJ/CHAUVEAU Vicky (MCF) (87ème section)

BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE 4401

BARLIER/SETTI Anne (PU-PH)
ENJALBERT Alain (PU-PH) Surnombre
GABERT Jean (PU-PH)
GUIEU Régis (PU-PH)
OUAFIK L'Houcine (PU-PH)

BUFFAT Christophe (MCU-PH)
FROMNOT Julien (MCU-PH)
MOTTOLA GHIGO Giovanna (MCU-PH)
SAVEANU Alexandru (MCU-PH)

BIOLOGIE CELLULAIRE 4403

ROLL Patrice (PU-PH)

GASTALDI Marguerite (MCU-PH)
KASPI-PEZZOLI Elise (MCU-PH)
LEVY-MOZZICONNACCI Annie (MCU-PH)

CARDIOLOGIE 5102

AVIERINOS Jean-François (PU-PH)
BONELLO Laurent (PU PH)
BONNET Jean-Louis (PU-PH)
CUISSSET Thomas (PU-PH)
DEHARO Jean-Claude (PU-PH)
FRANCESCHI Frédéric (PU-PH)
HABIB Gilbert (PU-PH)
PAGANELLI Franck (PU-PH)
THUNY Franck (PU-PH)

CHIRURGIE DIGESTIVE 5202

BERDAH Stéphane (PU-PH)
HARDWIGSEN Jean (PU-PH)
LE TREUT Yves-Patrice (PU-PH) Surnombre
SIELEZNEFF Igor (PU-PH)

BEYER-BERJOT Laura (MCU-PH)

CHIRURGIE GENERALE 5302

GIUSIANO Bernard (MCU-PH)
MANCINI Julien (MCU-PH)

ABU ZAINEH Mohammad (MCF) (5ème section)
BOYER Sylvie (MCF) (5ème section)

CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE 5002

ARGENSON Jean-Noël (PU-PH)
BLONDEL Benjamin (PU-PH)
CURVALE Georges (PU-PH)
FLECHER Xavier (PU-PH)
PARRATTE Sébastien (PU-PH)
ROCHWERGER Richard (PU-PH)
TROPIANO Patrick (PU-PH)

OLLIVIER Matthieu (MCU-PH)

CANCEROLOGIE ; RADIOTHERAPIE 4702

BERTUCCI François (PU-PH)
CHINOT Olivier (PU-PH)
COWEN Didier (PU-PH)
DUFFAUD Florence (PU-PH)
GONCALVES Anthony (PU-PH)
HOUVENAEGHEL Gilles (PU-PH)
LAMBAUDIE Eric (PU-PH)
MARANINCHI Dominique (PU-PH) *Surnombre*
SALAS Sébastien (PU-PH)
VIENS Patrice (PU-PH)

SABATIER Renaud (MCU-PH)

CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIOVASCULAIRE 5103

COLLART Frédéric (PU-PH)
D'JOURNO Xavier (PU-PH)
DODDOLI Christophe (PU-PH)
GARIBOLDI Vlad (PU-PH)
MACE Loïc (PU-PH)
THOMAS Pascal (PU-PH)

FOUILLOUX Virginie (MCU-PH)
GRISOLI Dominique (MCU-PH)
TROUSSE Delphine (MCU-PH)

CHIRURGIE VASCULAIRE ; MEDECINE VASCULAIRE 5104

ALIMI Yves (PU-PH)
AMABILE Philippe (PU-PH)
BARTOLI Michel (PU-PH)
MAGNAN Pierre-Edouard (PU-PH)
PIQUET Philippe (PU-PH)

SARLON-BARTOLI Gabrielle (MCU-PH)

HISTOLOGIE, EMBRYOLOGIE ET CYTOGENETIQUE 4202

GRILLO Jean-Marie (PU-PH) *Surnombre*
LEPIDI Hubert (PU-PH)

ACHARD Vincent (MCU-PH) *disponibilité*
PAULMYER/LACROIX Odile (MCU-PH)

DERMATOLOGIE - VENEREOLOGIE 5003

BERBIS Philippe (PU-PH)
GAUDY/MARQUESTE Caroline (PU-PH)
GROB Jean-Jacques (PU-PH)
RICHARD/LALLEMAND Marie-Aleth (PU-PH)

DUSI

COLSON Sébastien (MCF)

ENDOCRINOLOGIE ,DIABETE ET MALADIES METABOLIQUES ; GYNECOLOGIE MEDICALE 5404

BRUE Thierry (PU-PH)
CASTINETTI Frédéric (PU-PH)

EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE ET PREVENTION 4601

AUQUIER Pascal (PU-PH)
BOYER Laurent (PU-PH)
CHABOT Jean-Michel (PU-PH)
GENTILE Stéphanie (PU-PH)
SAMBUC Roland (PU-PH) *Surnombre*
THIRION Xavier (PU-PH)

DELPERO Jean-Robert (PU-PH)
MOUTARDIER Vincent (PU-PH)
SEBAG Frédéric (PU-PH)
TURRINI Olivier (PU-PH)

BEGE Thierry (MCU-PH)
BIRNBAUM David (MCU-PH)

CHIRURGIE INFANTILE 5402

GUYS Jean-Michel (PU-PH)
JOUVE Jean-Luc (PU-PH)
LAUNAY Franck (PU-PH)
MERRROT Thierry (PU-PH)
VIEHWEGER Heide Elke (PU-PH)

CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE ET STOMATOLOGIE 5503

CHOSSEGROS Cyrille (PU-PH)
GUYOT Laurent (PU-PH)

FOLETTI Jean-Marc (MCU-PH)

CHIRURGIE PLASTIQUE,

RECONSTRUCTRICE ET ESTHETIQUE ; BRÛOLOGIE 5004

CASANOVA Dominique (PU-PH)
LEGRE Régis (PU-PH)

HAUTIER/KRAHN Aurélie (MCU-PH)

GASTROENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE ; ADDICTOLOGIE 5201

BARTHET Marc (PU-PH)
BERNARD Jean-Paul (PU-PH)
BOTTA-FRIDLUND Danielle (PU-PH)
DAHAN-ALCARAZ Laetitia (PU-PH)
GEROLAMI-SANTANDREA René (PU-PH)
GRANDVAL Philippe (PU-PH)
GRIMAUD Jean-Charles (PU-PH)
SEITZ Jean-François (PU-PH)
VITTON Véronique (PU-PH)

GONZALEZ Jean-Michel (MCU-PH)

GENETIQUE 4704

BEROUD Christophe (PU-PH)
KRAHN Martin (PU-PH)
LEVY Nicolas (PU-PH)
MONCLA Anne (PU-PH)
SARLES/PHILIP Nicole (PU-PH)

NGYUEN Karine (MCU-PH)
TOGA Caroline (MCU-PH)
ZATTARA/CANNONI Hélène (MCU-PH)

GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE ; GYNECOLOGIE MEDICALE 5403

AGOSTINI Aubert (PU-PH)
BOUBLI Léon (PU-PH)
BRETELLE Florence (PU-PH)
CARCOPINO-TUSOLI Xavier (PU-PH)
COURBIERE Blandine (PU-PH)
CRAVELLO Ludovic (PU-PH)
D'ERCOLE Claude (PU-PH)

BERBIS Julie (MCU-PH)
LAGOUANELLE/SIMEONI Marie-Claude (MCU-PH)

MINVIELLE/DEVICTOR Bénédicte (MCF)(06ème section)
TANTI-HARDOUIN Nicolas (PRAG)

IMMUNOLOGIE 4703

KAPLANSKI Gilles (PU-PH)
MEGE Jean-Louis (PU-PH)
OLIVE Daniel (PU-PH)
VIVIER Eric (PU-PH)

FERON François (PR) (69ème section)

BOUCRAUT Joseph (MCU-PH)
DEGEORGES/VITTE Joëlle (MCU-PH)
DESPLAT/JEGO Sophie (MCU-PH)
ROBERT Philippe (MCU-PH)
VELY Frédéric (MCU-PH)

BOUCAULT/GARROUSTE Françoise (MCF) 65ème section)

MALADIES INFECTIEUSES ; MALADIES TROPICALES 4503

BROUQUI Philippe (PU-PH)
LAGIER Jean-Christophe (PU-PH)
PAROLA Philippe (PU-PH)
STEIN Andréas (PU-PH)

MILLION Matthieu (MCU-PH)

MEDECINE INTERNE ; GERIATRIE ET BIOLOGIE DU VIEILLISSEMENT ; MEDECINE GENERALE ; ADDICTOLOGIE 5301

BONIN/GUILLAUME Sylvie (PU-PH)
DISDIER Patrick (PU-PH)
DURAND Jean-Marc (PU-PH)
FRANCES Yves (PU-PH) Surnombre
GRANEL/REY Brigitte (PU-PH)
HARLE Jean-Robert (PU-PH)
ROSSI Pascal (PU-PH)
SCHLEINITZ Nicolas (PU-PH)

EBBO Mikael (MCU-PH)

GENTILE Gaëtan (MCF Méd. Gén. Temps plein)

ADNOT Sébastien (PR associé Méd. Gén. à mi-temps)
FILIPPI Simon (PR associé Méd. Gén. à mi-temps)

BARGIER Jacques (MCF associé Méd. Gén. À mi-temps)
BONNET Pierre-André (MCF associé Méd. Gén à mi-temps)
CALVET-MONTREDON Céline (MCF associé Méd. Gén. à temps plein)
GUIDA Pierre (MCF associé Méd. Gén. à mi-temps)
JANCZEWSKI Aurélie (MCF associé Méd. Gén. À mi-temps)

NUTRITION 4404

DARMON Patrice (PU-PH)
RACCAH Denis (PU-PH)
VALERO René (PU-PH)

ATLAN Catherine (MCU-PH) disponibilité
BELIARD Sophie (MCU-PH)

MARANINCHI Marie (MCF) (66ème section)

ONCOLOGIE 65 (BIOLOGIE CELLULAIRE)

CHABANNON Christian (PR) (66ème section)
SOBOL Hagay (PR) (65ème section)

OPHTALMOLOGIE 5502

DENIS Danièle (PU-PH)
HOFFART Louis (PU-PH)
MATONTI Frédéric (PU-PH)
RIDINGS Bernard (PU-PH) Surnombre

HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION 4701

BLAISE Didier (PU-PH)
COSTELLO Régis (PU-PH)
CHIARONI Jacques (PU-PH)
GILBERT/ALESSI Marie-Christine (PU-PH)
MORANGE Pierre-Emmanuel (PU-PH)
VEY Norbert (PU-PH)

GELSI/BOYER Véronique (MCU-PH)
LAFAGE/POCHITALOFF-HUVALE Marina (MCU-PH)
LOOSVELD Marie (MCU-PH)

POGGI Marjorie (MCF) (64ème section)

MEDECINE LEGALE ET DROIT DE LA SANTE 4603

LEONETTI Georges (PU-PH)
PELISSIER/ALICOT Anne-Laure (PU-PH)
PIERCECCHI/MARTI Marie-Dominique (PU-PH)

BARTOLI Christophe (MCU-PH)
TUCHTAN-TORRENTS Lucile (MCU-PH)

BERLAND/BENHAIM Caroline (MCF) (1ère section)

MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION 4905

BENSOUSSAN Laurent (PU-PH)
VITON Jean-Michel (PU-PH)

MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL 4602

LEHUCHER/MICHEL Marie-Pascale (PU-PH)

BERGE-LEFRANC Jean-Louis (MCU-PH)
SARI/MINODIER Irène (MCU-PH)

NEPHROLOGIE 5203

BERLAND Yvon (PU-PH) Surnombre
BRUNET Philippe (PU-PH)
BURTEY Stéphanne (PU-PH)
DUSSOL Bertrand (PU-PH)
JOURDE CHICHE Noémie (PU PH)
MOAL Valérie (PU-PH)

NEUROCHIRURGIE 4902

DUFOUR Henry (PU-PH)
FUENTES Stéphane (PU-PH)
REGIS Jean (PU-PH)
ROCHE Pierre-Hugues (PU-PH)
SCAVARDA Didier (PU-PH)

CARRON Romain (MCU PH)
GRAILLON Thomas (MCU PH)

NEUROLOGIE 4901

ATTARIAN Sharham (PU PH)
AUDOIN Bertrand (PU-PH)
AZULAY Jean-Philippe (PU-PH)
CECCALDI Mathieu (PU-PH)
EUSEBIO Alexandre (PU-PH)
FELICIAN Olivier (PU-PH)
PELLETIER Jean (PU-PH)

PEDOPSYCHIATRIE; ADDICTOLOGIE 4904

DA FONSECA David (PU-PH)
POINSO François (PU-PH)

OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE 5501

DESSI Patrick (PU-PH)
FAKHRY Nicolas (PU-PH)
GIOVANNI Antoine (PU-PH)
LAVIELLE Jean-Pierre (PU-PH)
NICOLLAS Richard (PU-PH)
TRIGLIA Jean-Michel (PU-PH)

DEVEZE Arnaud (MCU-PH) Disponibilité

REVIS Joana (MAST) (Orthophonie) (7ème Section)

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE 4502

DESSEIN Alain (PU-PH) Surnombre

CASSAGNE Carole (MCU-PH)
L'OLLIVIER Coralie (MCU-PH)
MARY Charles (MCU-PH)
RANQUE Stéphane (MCU-PH)
TOGA Isabelle (MCU-PH)

PEDIATRIE 5401

ANDRE Nicolas (PU-PH)
CHAMBOST Hervé (PU-PH)
DUBUS Jean-Christophe (PU-PH)
GIRAUD/CHABROL Brigitte (PU-PH)
MICHEL Gérard (PU-PH)
MILH Mathieu (PU-PH)
REYNAUD Rachel (PU-PH)
SARLES Jacques (PU-PH)
TSIMARATOS Michel (PU-PH)

COZE Carole (MCU-PH)
FABRE Alexandre (MCU-PH)
OUDIN Claire (MCU-PH)
OVAERT Caroline (MCU-PH)

PSYCHIATRIE D'ADULTES ; ADDICTOLOGIE 4903

BAILLY Daniel (PU-PH)
LANCON Christophe (PU-PH)
NAUDIN Jean (PU-PH)

CHOLOGIE - PSYCHOLOGIE CLINIQUE, PSYCHOLOGIE SOCIALE 16

AGHABABIAN Valérie (PR)

RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE 4302

BARTOLI Jean-Michel (PU-PH)
CHAGNAUD Christophe (PU-PH)
CHAUMOITRE Kathia (PU-PH)
GIRARD Nadine (PU-PH)
GORINCOUR Guillaume (PU-PH)
JACQUIER Alexis (PU-PH)
MOULIN Guy (PU-PH)
PANUEL Michel (PU-PH)
PETIT Philippe (PU-PH)
VAROQUAUX Arthur Damien (PU-PH)
VIDAL Vincent (PU-PH)

REANIMATION MEDICALE ; MEDECINE URGENCE 4802

GAINNIER Marc (PU-PH)
GERBEAUX Patrick (PU-PH)
PAPAZIAN Laurent (PU-PH)
ROCH Antoine (PU-PH)

HRAIECH Sami (MCU-PH)

RHUMATOLOGIE 5001

GUIS Sandrine (PU-PH)
LAFFORGUE Pierre (PU-PH)
PHAM Thao (PU-PH)
ROUDIER Jean (PU-PH)

**PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE -
PHARMACOLOGIE CLINIQUE; ADDICTOLOGIE 4803**

BLIN Olivier (PU-PH)
FAUGERE Gérard (PU-PH) Surnombre
MICALLEF/ROLL Joëlle (PU-PH)
SIMON Nicolas (PU-PH)

BOULAMERY Audrey (MCU-PH)
VALLI Marc (MCU-PH)

PHILOSOPHIE 17

LE COZ Pierre (PR) (17ème section)

PHYSIOLOGIE 4402

BARTOLOMEI Fabrice (PU-PH)
BREGON Fabienne (PU-PH)
MEYER/DUTOUR Anne (PU-PH)
TREBUCHON/DA FONSECA Agnès (PU-PH)

BARTHELEMY Pierre (MCU-PH)
BONINI Francesca (MCU-PH)
BOULLU/CIOCCA Sandrine (MCU-PH)
DADOIN Frédéric (MCU-PH) (disponibilité)
DEL VOLGO/GORI Marie-José (MCU-PH)
DELLIAUX Stéphane (MCU-PH)
GABORIT Bénédicte (MCU-PH)
REY Marc (MCU-PH)

LIMERAT/BOUDOURESQUE Françoise (MCF) (40ème section) Retraite 1/5/2018
RUEL Jérôme (MCF) (69ème section)
STEINBERG Jean-Guillaume (MCF) (66ème section)
THIRION Sylvie (MCF) (66ème section)

PNEUMOLOGIE; ADDICTOLOGIE 5101

ASTOUL Philippe (PU-PH)
BARLESI Fabrice (PU-PH)
CHANEZ Pascal (PU-PH)
CHARPIN Denis (PU-PH) Surnombre
GREILLIER Laurent (PU-PH)
REYNAUD/GAUBERT Martine (PU-PH)

MASCAUX Céline (MCU-PH)

TOMASINI Pascale (Maitre de conférences associé des universités)

THERAPEUTIQUE; MEDECINE D'URGENCE; ADDICTOLOGIE 4804

AMBROSI Pierre (PU-PH)
BARTOLIN Robert (PU-PH) Surnombre
VILLANI Patrick (PU-PH)

DAUMAS Aurélie (MCU-PH)

UROLOGIE 5204

BASTIDE Cyrille (PU-PH)
KARSENTY Gilles (PU-PH)
LECHEVALLIER Eric (PU-PH)
ROSSI Dominique (PU-PH)

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord le Professeur SOBOL de m'avoir accueilli dans son équipe durant ma dernière année d'internat et de m'avoir proposé ce sujet de thèse. J'ai beaucoup appris à travers toutes les réunions auxquelles j'ai pu assister au sein du service concernant la gestion d'un laboratoire d'oncogénétique moléculaire, les interactions avec les industries et la nécessité constante d'anticiper quels seront les besoins de demain afin de toujours pouvoir s'adapter.

Je remercie le Dr Jean-Marc EXTRA de m'avoir permis de composer sur ce sujet.

Je remercie le Pr GONCALVES d'avoir accepté de présider ma thèse. Je remercie le Pr MORANGE et le Pr KRAHN d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie Audrey et Violaine qui m'ont formé pendant ces deux semestres ainsi que toute l'équipe du laboratoire. Un grand merci à Cornel et Tetsuro, qui m'ont accompagné tout le long de ce travail de thèse.

Je remercie toute l'équipe du service d'oncogénétique clinique pour leur aide.

Je remercie Quentin pour son aide quant aux traitements des données bio-informatiques.

Je remercie tous ceux qui m'ont aidé dans cette thèse et que j'ai oublié de citer, ainsi que tous ceux qui m'ont formé, encadré et accompagné durant ces 10 années d'études.

Je n'oublie pas tous les internes que j'ai pu rencontrer durant mon internat à Marseille, Baba et Popo la fine équipe d'hémato Nord ; Bassam, Momo et Chloé en immuno ; Jérémie et Damien pour les discussions philosophiques à l'internat et à tous les autres Florence, Sophie, Nicolas, Charlène, Xavier, Baidy... et j'en oublie c'est sûr.

Un gros clin d'œil à Yassine, « mon collègue » depuis le premier jour de stage en tant qu'externe en médecine à Bordeaux. Une pensée pour Louis le petit surdoué de la promo. Un abrazo à tous les étudiants en médecine Erasmus qui m'ont fait vivre la plus belle année de mon externat : José, Alfonso, Pablo, Giulia, Marcella, Vera...

Un grand merci à JB qui m'a permis de décrocher le concours dès la première année !

Je remercie mes parents pour m'avoir toujours soutenu dans cette longue route qui m'a amené jusqu'à Marseille pour devenir médecin. De m'avoir encouragé à faire le maximum durant toute ma scolarité et permis de voyager à travers le monde. Merci d'avoir relu ma thèse depuis Majorque maman !

Une pensée particulière pour mamie Louise qui fait la meilleure «pasta» du monde et qui représente pour moi force et de courage. Une pensée émue pour mamie Jacqueline et papi Italo. Une pensée pour papi Jacques.

Une grosse pensée pour ma sœur Léa et mes frères Mathieu et Thomas, qui m'ont gâtés de pleins de petits neveux et de nièces durant mes études de médecine : Charlotte, Thadée, Jules, Zélie et Nils. En espérant pouvoir profiter un maximum d'eux à l'avenir et croquer la vie à pleins dents à leur côté.

Une pensée pour toutes mes tantes, mes oncles, mes cousines et mes cousins, en attendant la prochaine « cousinade » pour fêter ça.

Une pensée pour Françoise et ces délicieuses crêpes bretonnes, et Pascal qui m'a offert le luxe de descendre sur Marseille avec « la Caddie ».

Je remercie Brigitte, Pierre et Georges, pour leur soutien durant notre internat à Marseille et l'aide qu'ils nous ont apportés.

Je remercie les locaux de l'étape : Anne-Marie et Michel, Alice, Laurène, Myriam et Yannick qui nous ont accueillis chaleureusement durant ces 5 années à Marseille, et sans qui l'aventure n'aurait pas du tout été la même, et qui font désormais partie de la famille.

«Un baci» pour Chiara, Teresa et Matteo qui nous ont donné un petit air de dolce vita sur la baie de Naples, et avec qui j'espère partager encore de nombreux repas en l'honneur de notre passion commune pour la bonne bouffe.

Un « big-up » aux copains de Floirac et de toujours Guigui, Rémi, Léo, Léo M, Jojo, Mathieu, Nicolas et aux frontaliers Totor, Guillaume, Pierre, Fafa, Richou, Rémi, Antoine pour toutes les bonnes soirées qu'on a passé ensemble.

Un grand merci à Annie et Jean-Jacques, Philippe et Valérie, Anne-Marie et Bernard, Alain et Françoise chez qui la porte a toujours été ouverte à Floirac, et qui m'ont permis de passer de très bons moments et de bonnes vacances en leur compagnie.

Une dédicace aux vieux briscards Jo, Gaël, Natou, Lolo, Pascalou, Léo, Dédé, Rémi, Anna...et au petit Piero !

La bise à mes potes du lycée Philippeuuu, Adrien, Kevin, Alban.

Et enfin je remercie bien évidemment Steph d'être à mes côtés depuis maintenant 6ans. On s'est embarqué mutuellement, il y a 5 ans dans cette aventure marseillaise. Je n'oublierai pas la découverte des baignades dans la méditerranée après une bonne journée de boulot, les magnifiques calanques et les champs de lavandes, dles magnifiques paysages des gorges du Verdon, du massif de l'Esterel ou encore la vue de Marseille depuis le Garlaban... Même si l'internat n'a pas toujours été facile, il en ressort pleins de belles choses, avec de nouvelles amitiés et pleins de beaux voyages qui n'ont fait que renforcer notre complicité. Je suis très fière de toi, j'espère que tu t'épanouiras dans ton nouveau travail fraîchement décroché, tu le mérites plus que n'importe qui d'autre. Je suis convaincu que l'avenir nous réserve de belles surprises et que nous allons être heureux à Lyon ! L'aventure continue dans la capitale gastronomique...PURA VIDA !!!

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION	6
II. DONNEES GENERALES	8
A. Généralités en oncogénétique	8
1. Le processus d'oncogénèse	8
2. Du gène à la protéine	10
B. La consultation en oncogénétique : indication, déroulement et impact sur la prise en charge clinique du patient.....	13
1. Cancers sporadiques et cancers avec prédisposition héréditaire	14
2. La consultation d'oncogénétique	14
3. Gènes impliqués en oncogénétique dans les cancers du sein	19
4. Mesures mises en place à la suite d'une consultation d'oncogénétique.....	23
a) Prescription d'une analyse génétique	23
b) Mesures mises en place en cas de mutation identifiée : exemple du syndrome sein-ovaire	24
c) Mesures mises en place dans les cas où il n'y a pas de mutation identifiée	26
C. Principales techniques utilisées dans les laboratoires de génétique	27
1. Techniques d'analyse au niveau de la séquence nucléotidique	28
a) Techniques de base en biologie moléculaire	28
b) Techniques d'analyse au niveau des gènes et de l'expression des gènes	38
c) Techniques d'analyse au niveau de la cellule/tissu.....	40
d) La qualité en laboratoire de biologie moléculaire	42
D. Le cancer du sein triple négatif	43
1. Généralités sur les cancers du sein	43
a) Epidémiologie.....	43
b) Classification des cancers du sein	43
c) Prise en charge du cancer du sein	49
d) Cancer du sein et oncogénétique.....	49
2. Le cancer du sein triple négatif	49
a) Principales caractéristiques du cancer du sein triple-négatif	50
b) Classification spécifique des CSTN	53
3. CSTN et oncogénétique	57
4. Traitements du CSTN	57
a) Traitements loco-régionaux	57
b) Traitements systémiques	57
c) Les thérapies ciblées	58
d) Nouvelles pistes thérapeutiques.....	58

III. DONNEES PERSONNELLES	61
A. MATERIEL ET METHODES	61
1. Patients.....	61
2. Critères d’inclusion et d’exclusion du PHRC SA03 :.....	61
3. Justification de l’essai.....	61
4. Objectif primaire de l’étude	62
5. Objectifs secondaires de l’étude	62
6. Perspectives.....	62
7. Données complémentaires utilisées pour l’analyse des résultats	63
a) Données récupérées auprès du centre investigateur	63
b) Données récupérées pour l’analyse des antécédents familiaux dans les dossiers cliniques des patientes incluses.....	63
B. Analyse des échantillons	64
C. Résultats	65
IV. SYNTHESE/DISCUSSION	73
A. Synthèse	73
B. Discussion	83
V. CONCLUSION	88
VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	92
VII. ANNEXES.....	95
1. Extraction de l’ADN	101
2. Double purification de l’ADN.....	101
3. Préparation de l’ADN.....	101
4. Séquençage haut-débit	101
a) Phase 1 : préparation de l’ADN génomique	101
b) Phase 2 : capture des régions d’intérêt.....	101
c) Phase 3 : séquençage sur le MISEQ (Illumina)	102
5. Analyse des données	102
6. Annotation nucléotidiques	102

LISTES DES FIGURES ET TABLES

- Figure 1 :** Etudes des relations génotype phénotype dans le rétinoblastome
- Figure 2 :** Caryotype humain
- Figure 3 :** Schéma simplifié de la transcription, de l'épissage et de la traduction d'un gène
- Figure 4 :** Comparaison entre le pourcentage de risque de développer un cancer du sein chez les femmes mutées *BRCA* et les femmes de la population générale
- Figure 5 :** Comparaison des risques de développer un cancer du sein et un cancer de l'ovaire chez les patientes mutées *BRCA1* et *BRCA2*
- Figure 6 :** Schéma simplifié du principe du séquençage Sanger
- Figure 7 :** Schéma expliquant les différentes techniques de séquençage
- Figures 8 et 9 :** Schéma expliquant l'amplification et l'indexation de la librairie en NGS
- Figures 10 et 11 :** Schémas montrant le principe de la capture et de l'amplification
- Figure 12 :** Schéma comparant la cinétique de développement des connaissances en génétique par rapport aux données bio-informatiques générées
- Figure 13 :** Schéma du processus d'une analyse par NGS avec intégration des filtres bio-informatiques
- Figure 14 :** Les paramètres qualités utilisés en NGS
- Figure 15 :** Les techniques d'analyse au niveau des gènes et de l'expression des gènes
- Figure 16 :** Les techniques d'analyse au niveau de la cellule
- Figure 17 :** Schéma expliquant la technique par puce à ADN
- Figure 18 :** Coupe anatomique de la glande mammaire et d'un canal
- Figure 19 :** Coupe histologique du tissu mammaire
- Figure 20 :** Comparaison des paramètres de survie sans progression et de survie entre les CSTN et non CSTN
- Figure 21 :** Spectre des cancers du sein TN
- Figure 22 :** Distribution des sous types moléculaire au sein des CSTN et des sous types IHC au sein des basal-like
- Figure 23 :** Classification de Lehmann en 2011 puis 2016 des CSTN en sous-types moléculaire
- Figure 24 :** Algorithme permettant de définir 5 sous-groupes « cliniques » au sein des CSTN afin de correspondre à leur sensibilité thérapeutique
- Figure 25 :** Répartition des mutations retrouvées dans les gènes *BRCA1/BRCA2* en fonction du gène et du type
- Figure 26 :** Répartition des effectifs en fonction de l'âge au diagnostic et du statut génétique
- Figure 27 :** Répartition des mutations identifiées dans les gènes *BRCA1/BRCA2* et courbe de pourcentage de mutations détectées dans les gènes *BRCA1/BRCA2* par tranche d'âge
- Figure 28 :** Histogramme montrant le pourcentage de détection de mutation dans les gènes *BRCA* par tranche d'âge et en fonction de l'histoire familiale dans l'essai SA03

- Figure 29 :** Histogramme permettant de définir critère âge pour analyse des gènes *BRCA* dans les CSTN et table de distribution des effectifs dans l'étude de Engel et al
- Figure 30 :** Comparaison globale des mutations retrouvées entre les CSTN et les non CSTN
- Figure 31 :** Comparaison détaillée des mutations retrouvées entre les CSTN et les non CSTN
- Figure 32 :** Courbes représentant le risque de développer un cancer du sein et un CSTN selon le gène muté
-
- Tableau 1 :** Comparaison de la pCR en fonction du statut TN et de la chimiothérapie utilisée
- Tableau 2 :** Comparaison des effectifs en termes d'âge, du score Manchester 3 et des antécédents familiaux
- Tableau 3 :** Caractéristiques histologiques et stades des CSTN selon statut mutationnel
- Tableau 4 :** Données de survie et de rechute selon statut mutationnel *BRCA*
- Tableau 5 :** Comparaison données de survie et de rechute entre les mutés *BRCA* et les non mutés
- Tableau 6 :** Récapitulatif pourcentage de mutations *BRCA* dans les CSTN dans les différentes études
- Tableau 7 :** Récapitulatif des proportions de mutés *BRCA* retrouvées dans différentes études
- Tableau 8 :** Comparaison moyenne âge au diagnostic des CSTN dans les différentes études
- Tableau 9 :** Synthèse des mutations retrouvées dans des CSTN sur différentes études
- Tableau 10 :** Synthèse des mutations retrouvées dans l'étude de Buys et al sur les cancers du sein non TN

ABREVIATIONS

A :	Adénine
ADN :	Acide DesoxyriboNucléique
ADNc :	ADN complémentaire
AMM :	Autorisation de Mise sur le Marché
BL1 :	Basal-like 1
BL2 :	Basal-like 2
BLIA :	Basal-like/immune activated
BLIS :	Basal-like/immunesuppressed
BOADICEA :	Breast and Ovarian Analysis of Disease Incidence and Carrier Estimation Algorithm
BRCA :	BReast CAncer
C :	Cytosine
CIQ :	Contrôles Interne de Qualité
CNST :	Cancer Non Specific Type
CNV :	Copy Number Variation
COFRAC :	Comité français d'accréditation
CSB :	Cancer du sein de type basal
CSNTN :	Cancer du Sein non triple négatif
CSNTN :	Cancer du sein non-TN
CSTN :	Cancer du sein triple négatif
ddNTP :	didésoxyribonucléotide
dNTP :	désoxyribonucléotide
DRCI :	Département de la Recherche Clinique et de l'Innovation
EEQ :	Evaluation Externe de la Qualité
FDA :	Food and Drug Administration
FISH :	Fluorescence in situ hybridization (Hybridation in Situ)
G :	Guanine
GGC :	Groupe Génétique et Cancer
HER2 :	Human Epidermal Growth Factor 2
HerMION :	Hereditary Mediterranean Integrated Oncogenetic Network
HR :	Homologous Recombination
IHC :	Immunohistochimie
IM :	Immunomodulatory
INCa :	Institut National du Cancer
IPC :	Institut Paoli-Calmettes
LAR :	Luminal androgen receptor
M :	Mesenchymal
MLPA :	Multi Ligation-dependant Probe Amplification
MSL :	Mesenchymal stem-like
NGS :	Next Generation Sequencing
pCR :	Pathological Complete Response
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PHRC :	Programme Hospitalier de Recherche Clinique
RA :	Récepteur aux androgènes
RCP :	Réunion de Concertation Pluridisciplinaire
RGT :	Réarrangements de grande taille
RH :	Récepteurs hormonaux
RO :	Récepteur aux Œstrogènes
RP :	Récepteur à la Progestérone
SBR :	Scarff Bloom et Richardson
SNP :	Single Nucleotide Polymorphism
SUMO :	Small Ubiquitine like Modifier
T :	Thymine
TMA :	Tissue micro-array
TN :	Triple négatif
TNM :	Tumor-Node-Metastasis
U :	Uracile
VEGF :	Vascular endothelial growth factor
VSI :	Variant de Signification Inconnu

I. INTRODUCTION

Le cancer du sein est le premier des cancers incidents chez la femme, devant le cancer du côlon et le cancer du poumon. Il représente plus de 18% des décès par cancer chez les femmes. La prise en charge du cancer du sein peut comporter différentes approches thérapeutiques prenant en compte de nombreux facteurs comme le type histologique, les caractéristiques immuno-histochimiques, le stade Tumor-Node-Metastasis (TNM) de la tumeur mais également l'état général du patient ou la présence d'une mutation dans un gène de prédisposition au cancer du sein. A ce jour, il existe des traitements locorégionaux (chirurgie et radiothérapie), des traitements systémiques (chimiothérapies) et des traitements ciblés (hormothérapie, anticorps anti HER2). Ces différents traitements peuvent être utilisés seuls ou en association selon le type de tumeur, le contexte clinique et la stratégie adoptée par l'oncologue.

Le cancer du sein peut, dans 10% des cas, rentrer dans le cadre d'un syndrome de prédisposition héréditaire, avec notamment le syndrome de prédisposition aux cancers du sein et de l'ovaire lorsqu'une mutation constitutionnelle est présente au niveau des gènes *BRCA1* et *BRCA2*. Lorsqu'un cancer se développe dans le cadre d'un syndrome de prédisposition héréditaire cela implique une prise en charge spécifique pour la patiente et les apparentés porteurs de la mutation. Il est donc important d'identifier « les familles à risque » pour assurer une prise en charge spécifique car leur risque de développer un cancer est plus élevé que pour un individu de la population générale.

Un type de cancer du sein suscite beaucoup d'intérêt depuis une quinzaine d'années : Le cancer du sein triple-négatif (CSTN), qui est défini par l'absence d'expression des récepteurs hormonaux, et l'absence d'amplification/surexpression de l'oncoprotéine Her2, représentent 12 à 17% des cancers du sein. Des caractéristiques spécifiques ont permis d'individualiser cette entité comme l'âge jeune au diagnostic, le taux élevé de rechute et un mauvais pronostic en terme de survie, et ce malgré une bonne chimiosensibilité. Malgré son association fréquente au sous-type basal, les CSTN sont très hétérogène d'un point de vue histo-moléculaire, ce qui complique leur prise en charge thérapeutique avec des profils de

sensibilité distincts. Les CSTN présentent des similarités avec les cancers développées dans le cadre d'une mutation constitutionnelle dans le gène *BRCA 1*, ce qui laisse présager de nouvelles pistes thérapeutiques potentielles.

Le but de cette étude est d'explorer les différentes caractéristiques génétiques des CSTN qui pourraient être exploitables pour améliorer la prise en charge clinique des patients (histoire naturelle de la maladie, type histologique, caractéristiques tumorales, profil moléculaire de la tumeur, présence d'une mutation constitutionnelle).

II. DONNEES GENERALES

A. GENERALITES EN ONCOGENETIQUE

1. Le processus d'oncogénèse

Le cancer est lié à une prolifération anarchique et incontrôlée de cellules. C'est une maladie multifactorielle (facteurs environnementaux, facteurs hormonaux, prédisposition génétique, mode de vie...) qui est déterminée par une accumulation d'altérations génétiques au sein de la cellule. Il existe au sein des tissus un équilibre entre la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire : c'est l'homéostasie tissulaire. Cet équilibre repose sur différents signaux (hormones, facteurs de croissance, cellules voisines...) qui sont sous la responsabilité de multiples gènes. Lorsque cet équilibre est perturbé cela peut aboutir à l'apparition de cellules cancéreuses qui prolifèrent de manière incontrôlée (résistance à l'apoptose et à la sénescence par réactivation de la télomérase), qui deviennent insensibles aux signaux extérieurs (notamment antiprolifératifs) et qui peuvent disséminer dans d'autres parties du corps (métastases).

Dans le domaine de l'oncogénétique il y a deux catégories de gènes auxquelles nous nous intéressons particulièrement : les proto-oncogènes, qui stimulent la prolifération des cellules cancéreuses, et les gènes suppresseurs de tumeurs, qui freinent cette prolifération. Dans les gènes suppresseurs ils existent des gènes dits « gènes réparateurs » car ils corrigent les anomalies génétiques qui surviennent au fil du temps dans notre génome afin d'éviter l'apparition de mutation.

Pour chacun de nos gènes nous possédons deux allèles. En ce qui concerne les proto-oncogènes si un seul des deux allèles est muté, cela peut suffire à stimuler la prolifération tumorale car cela va avoir un effet activateur direct. Contrairement aux proto-oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs doivent subir une inactivation des deux allèles pour entraîner une prolifération tumorale non contrôlée. En effet si un seul des deux allèles est inactif, le second allèle est suffisant pour assurer la réparation de l'Acide DesoxyriboNucléique (ADN) des cellules endommagées.

En travaillant sur les rétinoblastomes (type de tumeur oculaire), Knudson a remarqué que les rétinoblastomes héréditaires apparaissent à un âge jeune et souvent de manière bilatérale par rapport aux rétinoblastomes ne survenant pas dans un contexte héréditaire (c'est-à-dire sporadique). Il émet alors l'hypothèse qu'un seul gène est en jeu, et que c'est le même dans les deux cas que le rétinoblastome soit héréditaire ou sporadique. Il suppose alors que pour qu'une cellule devienne cancéreuse il faut que celle-ci subisse une inactivation des 2 allèles d'un même gène (« double-hit ») dans le cadre des gènes suppresseurs de tumeurs. C'est à partir de cette hypothèse qu'est née « la théorie du double-hit de Knudson ».

Dans le cadre d'un syndrome de prédisposition héréditaire le premier allèle est défectueux au niveau constitutionnel (c'est-à-dire défectueux dans toutes les cellules de l'individu) et il faut qu'il y ait atteinte du second allèle au niveau du tissu (somatique) pour entraîner la maladie. C'est pourquoi lorsque l'on a une prédisposition héréditaire, l'apparition de la maladie n'est pas une certitude (notion de pénétrance qui est la probabilité de développer une maladie quand on est porteur d'une mutation) mais le risque est plus grand car un des deux allèles est déjà déficient contrairement aux individus de la population générale. Cela explique l'âge d'apparition plus précoce de la maladie et son caractère bilatéral dans le cadre du rétinoblastome héréditaire. En l'absence de prédisposition génétique, il y a inactivation du premier allèle au niveau somatique, puis si le second allèle est inactivé dans la même cellule, il y aura apparition du cancer.

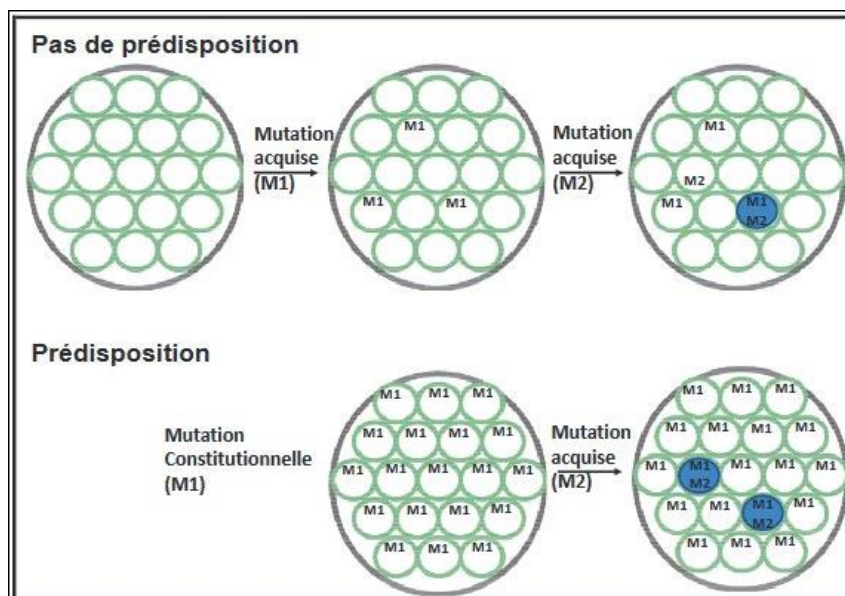


Figure 1: Etudes des relations génotype-phénotype dans le rétinoblastome d'après Laurent Castera (les cellules bleues sont celles qui vont développer un rétinoblastome).

Ces altérations génétiques au niveau somatique ou constitutionnel peuvent apparaître durant la réplication du génome ou bien par action de facteurs extérieurs (radiations ionisantes, exposition à des toxiques, virus ...) qui vont engendrer des mutations dans notre génome. Ces mutations peuvent entraîner soit une perte de fonction de la protéine codée par le gène (cas des gènes suppresseurs de tumeurs), soit un gain de fonction de la protéine codée par le gène (cas des proto-oncogènes).

Une mutation constitutionnelle est le plus souvent héritée d'un des deux parents, et elle est transmissible à la descendance. Si elle n'est pas héritée, on parle de mutation *de novo*, ce qui signifie que la mutation est apparue chez l'individu sans que celle-ci ne soit présente chez ses parents, mais cela est rare (variable selon les gènes). On peut également retrouver des cas de mutations dites en mosaïque, lorsque la mutation est apparue dans les premiers stades du développement embryonnaire, l'individu est alors composé d'un mélange de cellules normales et de cellules mutées (le pourcentage varie selon le stade du développement où la mutation est apparue).

Mais le processus de cancérogénèse ne se limite pas à ce phénomène, c'est un processus multifactoriel qui implique l'accumulation de nombreux événements. C'est pourquoi il est difficile de trouver un lien unique entre les différents cancers et sur lequel on pourrait se concentrer pour trouver une thérapeutique efficace. L'oncogénétique, même si elle ne répond pas à toutes les questions, a permis d'établir un lien unique entre les différents cancers au sein d'une même famille, ce qui va permettre de mettre en place une prise adaptée à la famille.

2. Du gène à la protéine

Chez l'homme, l'information génétique est contenue dans le noyau des cellules au sein des molécules d'ADN. Chaque personne possède 23 paires de chromosomes, dont une paire de chromosome sexuel (chromosome X et Y) déterminant le sexe génétique de l'individu. Chaque paire est composée d'un allèle hérité de la mère et d'un allèle hérité de du père. Chaque chromosome est constitué de parties codantes (exons), de parties non codantes (introns) et de séquences répétées. Au sein de chaque chromosome il y a plusieurs

centaines voire milliers de gènes. On estime qu'il y a entre 20000 et 30000 gènes dans le génome humain à ce jour.

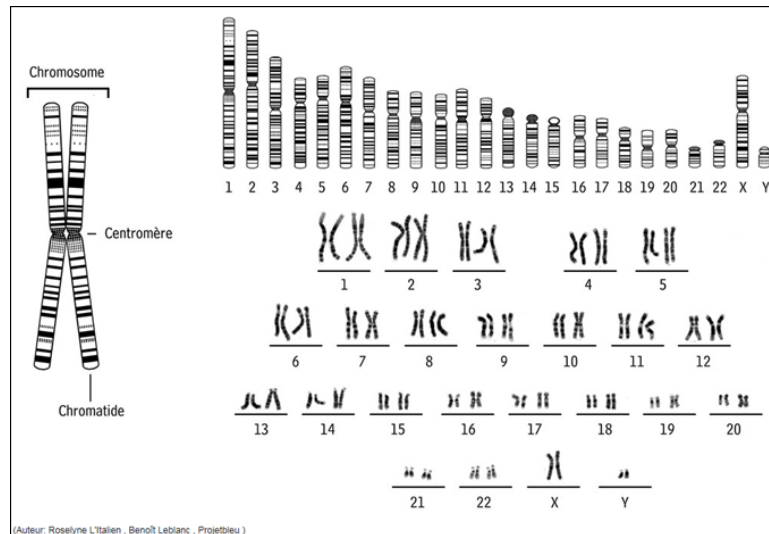


Figure 2 : caryotype humain (1).

Un gène est un fragment d'ADN qui code pour une protéine. Il est constitué à la fois d'exons et d'introns. L'ADN quant à lui est une molécule bicaténaire, constituée d'une suite de bases complémentaires qui peut être considéré comme un long texte rédigé à l'aide de quatre lettres correspondant à quatre bases : adénine (A), thymine (T), cytosine (C) et guanine (G). L'information génétique dépend de l'ordre d'enchaînement de ces bases.

Les bases ne peuvent s'apparier qu'ainsi : adénine avec thymine, guanine avec cytosine. L'ADN est situé dans le noyau mais la synthèse des protéines a lieu dans le cytoplasme au contact des ribosomes. La molécule qui transmet l'information génétique du noyau vers les ribosomes s'appelle l'ARNmessenger, il est synthétisé de la transcription. Lors de cette étape seules les séquences exoniques sont conservées, les séquences introniques sont quant à elles coupées à l'aide du spliceosome.

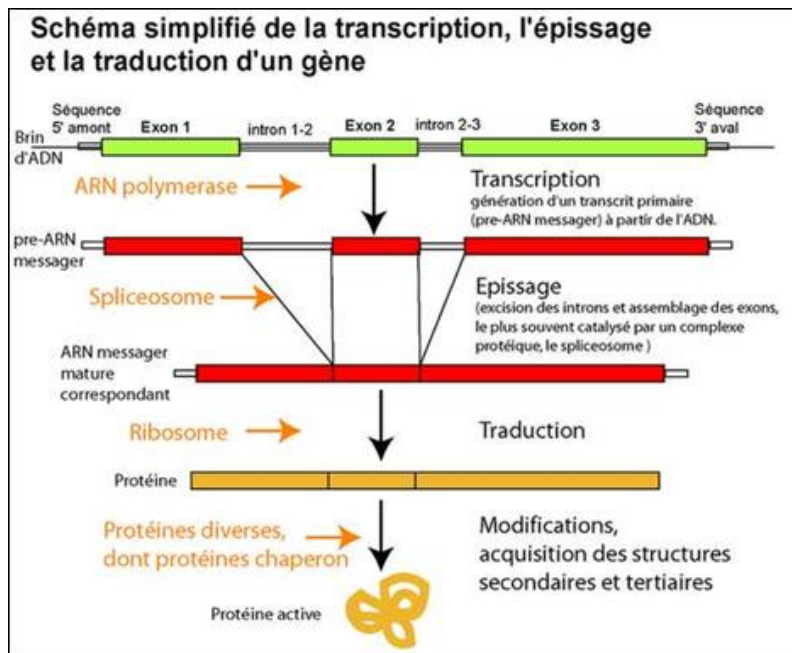


Figure 3 : Schéma simplifié de la transcription, de l'épissage et de la traduction d'un gène (2).

Les ARN messagers sont constitués, comme l'ADN, par un enchaînement de nucléotides sauf qu'une des quatre bases est différente : l'uracile remplace la thymine. Les ARN sont simple-brin contrairement à l'ADN qui est double-brin. L'ARN messenger sert de matrice à la production de protéines au cours de la traduction. C'est le nombre et l'enchaînement de ces acides aminés qui détermineront les propriétés de la protéine. Il existe donc un dictionnaire d'assemblage qui permet à partir des triplets de nucléotides (codon) de déterminer à quel acide aminé ce triplet correspond : c'est le code génétique. Il est universel, commun à tous les êtres vivants, de la bactérie à l'homme, chez les animaux comme chez les végétaux. Il y a 64 codons mais seulement 20 acides aminés sont utilisés pour la synthèse des protéines. Ainsi plusieurs codons codent pour un même acide aminé : on dit que le code génétique est dégénéré. D'autre part, 3 codons ne codent pas pour un acide aminé, mais commandent l'arrêt de la synthèse de la protéine, ce sont les codons-stop. Afin de décrire les mutations on utilise l'écriture génomique en « c. » suivi de l'écriture protéique en « p. » : par exemple la mutation dans le gène BRCA 2 « c.2612C>A, p.Ser871* » se lit substitution d'une Cytosine par une Adénine au niveau de la base 2612 du gène BRCA2, avec pour conséquence au niveau protéique la formation d'un codon STOP à la place de l'acide aminé 871 qui est code normalement pour une Sérine.

Parfois lors de la réplication de l'ADN il peut y avoir des erreurs, une base est remplacée par une autre. Il existe alors des systèmes de réparation (sous le contrôle des gènes dit réparateurs), qui visent à corriger ces erreurs. Lorsque ce système de réparation ne parvient pas à corriger cette anomalie, il y a formation d'un variant (base différente de la séquence de référence). Comme le code génétique est redondant cela peut aboutir au même acide aminé, et n'avoir aucune conséquence fonctionnelle sur la protéine, mais dans d'autres cas cela peut avoir une incidence délétère sur la protéine (faux-sens, apparition d'un codon stop ...). On parle alors de mutation ponctuelle ou de variant délétère. Par ailleurs, on peut perdre un allèle d'un gène en entier ou seulement une partie : c'est une délétion. Le phénomène inverse est également possible avec un gain de matériel génétique, on parle alors de duplication. Les délétions ou duplications de grand segment de gènes sont regroupés sous le terme de réarrangements de grande taille.

Une autre possibilité est l'apparition d'une mutation dans une région intronique, donc non codante, mais qui pourra modifier l'épissage selon sa position dans l'intron et la base modifiée. Dans certains cas, cela peut aboutir à un saut de un ou plusieurs exons, il y a alors une perte de séquence codante qui peut aboutir à une protéine tronquée non fonctionnelle.

Le travail du biologiste en génétique est d'identifier ces variations, et de déterminer si elles sont responsables ou non de la maladie du patient.

B. LA CONSULTATION EN ONCOGENETIQUE : INDICATION, DEROULEMENT ET IMPACT SUR LA PRISE EN CHARGE CLINIQUE DU PATIENT

L'oncogénétique est une spécialité médicale relativement récente puisqu'elle a fait son apparition il y a une trentaine d'années à partir d'un constat simple : certaines familles présentaient de nombreux cas de cancers de même type au fil des générations sans que l'on puisse trouver d'explication à cette agrégation. Il est alors émise l'hypothèse que certains facteurs héréditaires pourraient favoriser le développement de certains types de cancers et expliquer alors une partie de ces agrégations familiales.

1. Cancers sporadiques et cancers avec prédisposition héréditaire

La grande majorité des cancers sont dits « sporadiques », c'est-à-dire qu'ils surviennent sans prédisposition particulière, leur origine provenant de multiples facteurs tels que l'environnement, le mode de vie (consommation tabagique, alcool, exposition amiante...), les antécédents personnels (irradiation...) et le hasard. Cela représenterait environ 90% des cancers. On a vu précédemment que dans le cas des cancers sporadiques les altérations génétiques se trouvent uniquement au sein du tissu tumoral.

Il est estimé à ce jour que 5 à 10% des cancers sont eux liés à une prédisposition héréditaire (que la mutation soit identifiée ou non), c'est à-dire qu'il existe une altération génétique dans toutes les cellules de l'individu qui induit un risque accru de développer un cancer chez cet individu par rapport à un individu de la population générale.

2. La consultation d'oncogénétique

L'enjeu d'une consultation d'oncogénétique est d'identifier les patients qui possèdent un risque élevé de développer un cancer rentrant dans le cadre d'une prédisposition héréditaire, et ceci afin de pouvoir mettre en place des mesures de surveillance et/ou préventives chez ces patients.

L'oncogénétique est une activité très encadrée sur le point légal puisqu'elle a trait aux caractéristiques génétiques des personnes. Elle rentre dans le cadre diagnostique de la loi dite de bioéthique du 29 juillet 1994 qui nécessite notamment :

- Une autorisation des laboratoires pour pratiquer ce type d'analyse
- Un agrément des biologistes délivrant les résultats de ces analyses
- La déclaration d'équipes pluridisciplinaires comprenant des compétences cliniques et génétiques
- La signature d'un consentement libre et éclairé par le patient avant la réalisation d'un test génétique
- La remise des résultats en main propre dans le cadre d'une consultation d'oncogénétique
- L'obligation d'information aux apparentés lorsque qu'une mutation est identifiée

Lors du parcours de soin d'un patient atteint d'un cancer, celui-ci peut se voir diriger vers une consultation d'oncogénétique si des éléments propres à son histoire familiale (plusieurs cas de cancers évocateur d'un syndrome) et/ou personnelle (âge jeune au diagnostic, type histologique de la tumeur, cancer bilatéral...) peuvent faire émettre l'hypothèse d'un cancer de type héréditaire. Avant d'effectuer toute analyse génétique il va donc y avoir une consultation d'oncogénétique afin de déterminer si on retient une indication d'analyse moléculaire. C'est une étape importante car à partir des informations récoltées on va choisir quelle personne sera testée en premier dans une famille et sur quels gènes va porter l'analyse en fonction des types de cancers développés dans la famille. Pour cela on va dessiner un arbre généalogique en consultation avec le patient, et plusieurs critères vont être utilisés pour déterminer si les pathologies développées dans la famille peuvent être en lien avec une prédisposition héréditaire :

- **Age d'apparition des différents cancers** : un âge jeune étant un argument en faveur d'une prédisposition héréditaire
- **Sexe des personnes affectées** : par exemple le cancer du sein est très rare chez l'homme donc la présence d'un cancer du sein chez un homme dans une famille renforce fortement la suspicion d'une prédisposition héréditaire. A l'inverse si un homme n'a pas développé la maladie cela n'a pas la même signification que si c'est une femme, car la pénétrance de la maladie est bien plus faible chez l'homme
- **Spectre des cancers développés dans la famille** pour évoquer un syndrome : exemple syndrome sein-ovaire, syndrome de Lynch (cancer colon, cancer de l'endomètre...)
- **Type histologique des cancers développés** : par exemple on retrouvera plutôt des cancers de l'ovaire séreux de haut grade dans le syndrome de prédisposition sein-ovaire alors que ce sera plutôt des cancers de l'ovaire à cellules claires ou endométrioïdes dans le syndrome de Lynch
- **Caractéristiques de la tumeur** : instabilité microsatellitaire pour le syndrome de Lynch, statut triple négatif (TN) dans le cancer du sein
- **Caractère bilatéral ou multifocal des atteintes** : en faveur d'une prédisposition héréditaire

- **Sévérité de l'atteinte** : une atteinte sévère est en faveur d'une prédisposition héréditaire
- **Etude de la ségrégation** de ces cancers pour déterminer si cela peut correspondre au mode de transmission du gène suspecté (autosomique dominant, récessif...)
- **Modélisation des risques** grâce à des algorithmes comme Manchester3 ou BRCA PRO permettant d'estimer la probabilité dans la branche paternelle et maternelle d'une mutation *BRCA* dans le cadre du syndrome sein-ovaire à partir des antécédents personnels et familiaux.

Si une analyse génétique est retenue il faut alors identifier le meilleur cas-index, c'est-à-dire la personne chez qui on estime avoir le plus de chances de trouver une mutation, et donc celle à qui on proposera en premier une analyse génétique. Le choix du cas-index est crucial, car la première analyse dans une famille va être plus longue et plus complexe à analyser que les éventuelles analyses ultérieures. En effet, chez le cas-index on va réaliser une analyse sur tous les gènes susceptibles d'expliquer le phénotype du patient et une grande partie de chaque gène sera analysée (tous les exons et de petites parties introniques). On parle d'analyse complète. Si une mutation est identifiée chez le cas-index on pourra alors rechercher facilement cette mutation chez ses apparentés par la suite car on sait sur quel gène se trouve la mutation et sa position exacte. Il est alors inutile d'explorer d'autres gènes que celui potentiellement muté, et seul l'exon ou la partie intronique où se trouve la mutation sera analysée : on parle d'analyse ciblée.

En général, pour choisir le meilleur cas-index on sélectionne le membre de la famille ayant développé le cancer (appartenant au spectre du syndrome suspecté) à l'âge le plus jeune ou le cancer le plus caractéristique du syndrome à âge égal. Dans certains cas le meilleur cas-index n'est pas accessible (décès, refus de faire l'analyse génétique...) il faut donc choisir une autre personne, en évaluant bien si une analyse chez cette personne nous permettra d'avoir un argument assez fort pour trancher sur le lien entre les cancers développés dans la famille et le caractère héréditaire.

Dans de nombreux cas en consultation, une patiente indemne vient consulter parce que par exemple la mère et la tante sont décédées d'un cancer du sein. Cette patiente est anxieuse et voudrait faire une analyse génétique afin de savoir si elle présente un risque plus important que la population générale de développer un cancer du sein au vu de ses antécédents familiaux. Le problème est que, comme cette personne est indemne, et qu'il est impossible d'effectuer des analyses chez la mère ou la tante comme elles sont décédées, si on ne retrouve pas de mutation chez cette patiente on ne pourra pas trancher si c'est parce qu'elle n'a pas hérité de la mutation (éventuellement portée par sa mère et sa tante) ou si les cancers du sein développés par sa mère et sa tante sont des cancers sporadiques (sans lien avec une prédisposition génétique). Et si par exemple cette patiente a eu une sœur, on ne peut pas éliminer que celle-ci ne soit pas porteuse de l'éventuelle mutation familiale avec le résultat négatif de la patiente. Il faudra donc refaire une analyse complète chez la sœur si on veut être sûr que celle-ci n'est pas porteuse d'une mutation. Comme les analyses moléculaires sont des analyses qui coûtent chères et qui nécessitent la mobilisation de moyens importants, il est indispensable de bien cibler les patientes pour lesquelles la probabilité de trouver une mutation est la plus haute. Pour cela il existe des recommandations permettant de définir dans quels cas une analyse génétique peut-être prescrite selon le syndrome de prédisposition héréditaire suspecté. Dans le cas du syndrome sein-ovaire on peut s'aider d'algorithmes pour évaluer la probabilité de trouver une mutation dans les gènes *BRCA* (Manchester3 et *BRCAPRO*) selon la configuration familiale (quelles personnes affectées dans la famille, à quel âge et par quel type de cancer). En général, on dit que l'on peut retenir l'indication d'une analyse génétique quand cette probabilité dépasse les 10% mais ce n'est pas un seuil absolu car il faut prendre en compte les spécificités de chaque algorithme afin de pouvoir interpréter au mieux leurs résultats (quels gènes sont intégrés, sur quel modèle de pénétrance, est-ce que les liens de parenté sont pris en compte, est-ce que les résultats d'analyses génétiques déjà effectuées dans la famille sont pris en compte...).

Il n'est pas rare en consultation de voir des patients pour lesquels ils manquent des informations essentielles pour juger de la pertinence d'une analyse génétique (arbre généalogique non informatif, informations non documentées/incertaines sur les pathologies tumorales développées dans la famille, cas-index décédé avant d'avoir pu réaliser des

analyses génétiques, contexte familial tendu rendant la communication des informations impossible entre les membres de la famille...). Il est alors possible de discuter de ces dossiers en Réunion de Concertation Pluridisciplinaires (RCP) afin de trancher sur l'utilité d'une analyse génétique, de l'indication d'une chirurgie prophylactique ou de l'inclusion dans un réseau de surveillance pour les personnes considérées comme à haut risque génétique. Ces RCP peuvent avoir lieu entre praticiens de l'Institut Paoli-Calmettes (IPC) mais aussi avec des praticiens extérieurs à l'établissement.

Quand une analyse génétique est retenue, il faut expliquer clairement au patient ce que l'on va rechercher par cette analyse génétique avant qu'il décide s'il donne son consentement pour réaliser cette analyse. Il faut l'informer des gènes sur lesquels va porter l'analyse, et quelles sont les conséquences en terme de risque tumoral et de prise en charge, cela va voir sur lui-même et sa famille, si une mutation est identifiée. La recherche de mutation constitutionnelle se fait en général sur un prélèvement sanguin pour l'analyse dite initiale. Lorsqu'une mutation est identifiée, on confirme toujours ce résultat sur un deuxième prélèvement indépendant, le plus souvent ce prélèvement est réalisé lors de la consultation et consiste en quelques gouttes de sang au bout du doigt recueillies sur un papier buvard (on parle d'analyse confirmatoire). L'analyse confirmatoire peut également se faire sur un prélèvement salivaire ou un second prélèvement sanguin indépendant.

Il est important de savoir si la maladie rentre dans le cadre d'une prédisposition génétique non seulement pour la patiente mais aussi pour ses apparentés.

C'est important pour la patiente car si elle est porteuse d'une mutation, elle présente un risque accru de développer un cancer par rapport aux individus de la population générale : risque accru de développer un nouveau cancer de même type ou un autre type de cancer appartenant au syndrome de prédisposition (exemple cancer de l'ovaire dans le syndrome sein-ovaire). C'est également important de l'informer du risque de transmission à sa descendance : 50% de risque de transmettre la mutation à ses enfants. En effet la personne porte la mutation dans toutes ses cellules sur une des deux allèles du gène qu'elle possède, donc lors de la formation des gamètes elle aura une chance sur deux de transmettre l'allèle muté.

Il est important de faire la recherche de la mutation chez les apparentés qui le souhaitent, afin d'identifier de quelle branche familiale vient cette mutation. Ainsi on pourra proposer une analyse au maximum d'apparentés ayant potentiellement pu hériter de la mutation au fil des générations. On établit alors deux catégories d'apparentés dans la famille : les apparentés porteurs de la mutation et les apparentés non porteurs de la mutation. Des mesures de prévention et dépistage seront mises en place pour les porteurs de la mutation alors que les apparentés n'ayant pas hérité de la mutation, et qui possède donc le même risque qu'une personne de la population générale de développer un cancer, ne nécessiteront pas de suivi particulier sur le plan de la prédisposition héréditaire. Cela permettra d'éviter de les exposer à des irradiations par des examens d'imagerie non inutiles, ou d'avoir un suivi clinique contraignant non nécessaire dans leur cas.

Avec l'essor des thérapies ciblées, une consultation d'oncogénétique peut également être demandée dans le cadre d'un test théranostique, permettant d'avoir accès à un traitement spécifique selon le type de cancer et le gène muté si on identifié une mutation dans certains gènes. Un exemple avec les antiPARP Olaparib® dans le cancer de l'ovaire séreux de haut grade, où l'on va rechercher une mutation dans les gènes *BRCA* au niveau constitutionnel et/ou somatique, ce qui peut, en fonction d'autres facteurs, aboutir à la prescription de ce traitement ciblé chez les patientes porteuses d'une mutation.

3. Gènes impliqués en oncogénétique dans les cancers du sein

Dans le cadre du cancer du sein, deux gènes ont tout d'abord été mis en évidence et recherchés en laboratoire de routine : les gènes *BRCA 1* et *BRCA 2*. Ces deux gènes sont impliqués dans le système de réparation des cassures double-brin de l'ADN, ils appartiennent à une classe des gènes suppresseurs de tumeurs. 2 personnes sur 1000 seraient porteurs d'une mutation dans les gènes *BRCA1* et *BRCA2*.

Sur 100 cancers du sein il est estimé à ce jour que :

- 5% sont liés à une prédisposition monogénique de transmission autosomique dominante avec forte pénétrance (type *BRCA1-BRCA2*)
- 15% sont liés à une susceptibilité multigénique avec une faible pénétrance et une interaction gènes-environnement
- 80% sont des cancers sporadiques

Le risque de développer un cancer du sein est plus important en cas de mutation dans le gène *BRCA1* (risque cumulé à 70 ans allant de 51 % à 75 %) qu'en cas de mutation dans le gène *BRCA2* (risque cumulé à 70 ans allant de 33 à 55 %) (3). Il existe un risque accru de 3 à 5 fois supérieur de développer un cancer du sein controlatéral quand on est porteur d'une mutation dans les gènes *BRCA*. Par comparaison, une femme de la population générale a 10% de risque de développer un cancer du sein durant sa vie.

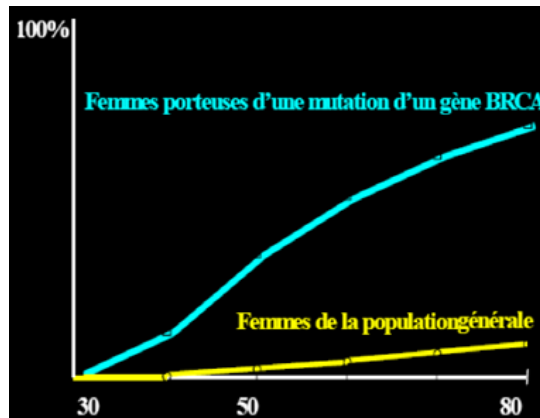


Figure 4 : Comparaison entre le pourcentage de risque de développer un cancer du sein chez les femmes mutées *BRCA* et les femmes de la population générale.

Une mutation dans le gène *BRCA1* expose à un risque plus élevé de cancer de l'ovaire qu'une mutation dans le gène *BRCA2* (cf figure 5). Dans les mutations du gène *BRCA2* on voit plus souvent des cancers de la prostate et du sein chez l'homme, et des cancers du pancréas.

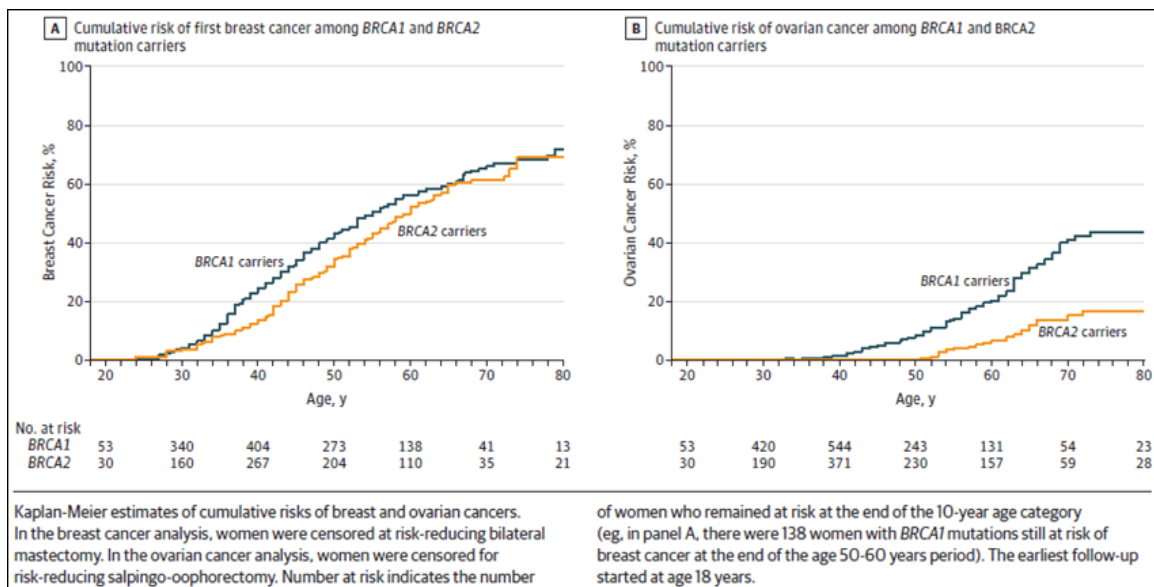


Figure 5 : Comparaison des risques de développer un cancer du sein et un cancer de l'ovaire chez les patientes mutées *BRCA1* et *BRCA2* d'après l'étude de Kuchenbaecker et al sur 10.000 patientes (4).

Avec le développement des nouvelles technologies en biologie moléculaire et l'avancée des connaissances en oncogénétique, il est maintenant prouvé que d'autres gènes sont impliqués dans le cancer du sein comme le gène *PALB2*, le gène *PTEN* ou encore le gène *CDH1*.

Actuellement au laboratoire de l'IPC le panel de gènes étudiés dans le cadre de la prédisposition au cancer du sein est un panel de 13 gènes défini par le Groupe Génétique Cancer (GGC) qui comportent des gènes participant à la prédisposition aux cancers du sein et de l'ovaire. Il comporte des gènes qui prédisposent seulement au cancer du sein comme le gène *PALB2*, des gènes qui prédisposent au cancer du sein et de l'ovaire comme les gènes *BRCA1-BRCA2*, le gène *P53* qui prédispose à de nombreuses pathologies tumorales à des âges jeunes (tumeurs cérébrales, sarcome, cortico-surrénalome, leucémie à des âges très précoces) dont le cancer du sein, et des gènes dont les spectres d'expression contiennent le cancer du sein comme *PTEN* (cancer de la thyroïde) et *CDH1* (cancer de l'estomac). Sont également présent des gènes plutôt associés aux cancers de l'ovaire comme les gènes *MMR (MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2)* et le gène *EPCAM* impliqués dans le syndrome de Lynch (cancer digestif, cancer de l'endomètre, cancer des voies urinaires...), et les gènes *RAD51C* et *RAD51D*.

En plus du spectre des cancers développés dans une famille, le type histologique de la tumeur peut également orienter vers un gène. Par exemple les cancers du sein de type médullaire sont plus souvent associés à une mutation dans le gène *BRCA1* alors que les cancers du sein de type lobulaire sont plus associés à des mutations dans le gène *CDH1*.

Afin de rechercher de nouveaux gènes de prédisposition au cancer du sein, et mieux caractériser les gènes moins connus que les gènes *BRCA*, il va falloir accumuler des données par le biais de grandes études moléculaires afin de déterminer :

- si en fonction du gène dans lequel on retrouve une mutation, on identifie un phénotype clinique particulier et si cela peut s'intégrer à un syndrome de prédisposition héréditaire
- si une mutation dans ce gène est plus souvent rattachée à un type histologique de cancer du sein (exemple cancer du sein lobulaire et *CDH1*)

- quelle est la pénétrance associée à une mutation dans ce gène
- s'il existe des différences de de phénotype et de pronostic selon le type de mutation et la position de la mutation dans le gène (exemple du gène APC qui prédispose aux cancers coliques avec polypose, et dont le phénotype clinique et la sévérité de l'atteinte varie selon la position de la mutation dans le gène)
- s'il existe une association de variants qui donne la maladie mais que le variant à lui seul n'est pas délétère.

A ce jour on identifie moins de mutations que ce à quoi on pourrait s'attendre. Ainsi près de 80% des formes familiales de cancer du sein restent inexplicables. Ceci peut s'expliquer par l'existence d'autres gènes prédisposant au cancer du sein/ovaire qui ne sont pas encore recherchés en routine ou non identifiés, l'existence de faux négatifs (on ne peut pas encore identifier ces mutations avec les techniques actuelles), la présence d'une mutation dans des zones non explorées par les techniques actuelles (zones introniques profondes...), la conjonction de plusieurs facteurs génétiques qui à eux seuls ne peuvent pas être impliqués directement dans la maladie, mais qui associés à d'autres altération génétiques ou à des facteurs environnementaux pourraient participer la survenue de la maladie.

Il est important de comprendre que dans les cas où une analyse génétique s'avère négative cela signifie négatif à un instant T pour l'exploration de tel gène avec telle technique. Un résultat négatif ne signifie pas forcément qu'il n'y a pas de prédisposition héréditaire. En effet il se peut qu'une mutation existe dans un gène que l'on ne connaît pas à ce jour ou que la mutation n'est pas identifiable par les techniques actuelles. Il est important d'estimer alors le risque résiduel, c'est-à-dire le risque que le cancer développé par le patient soit tout de même lié à une prédisposition héréditaire malgré la négativité des analyses génétiques effectuées afin de mettre en place une surveillance spécifique de type haut-risque génétique si nécessaire.

4. Mesures mises en place à la suite d'une consultation d'oncogénétique

a) *Prescription d'une analyse génétique*

A la fin de la consultation d'oncogénétique, le médecin peut prescrire :

- Une demande d'analyse complète constitutionnelle par panel de gènes (pour le cas-index le plus souvent)
- Une demande de recherche de mutation récurrente constitutionnelle, qui est une mutation que l'on retrouve plus fréquemment au sein d'une population le plus souvent isolée géographiquement. On appelle cela l'effet fondateur, il est lié à la présence d'un ancêtre commun. Par exemple à l'IPC nous recevons des demandes d'analyses de l'île de la Réunion où il existe une mutation récurrente dans le gène *BRCA2* : c.2612C>A, p.Ser871*. La recherche de cette mutation récurrente permet de faire un pré-screening avant de lancer une analyse par panel. En effet si la mutation récurrente est identifiée inutile de lancer le panel. Si on ne retrouve pas la mutation récurrente le biologiste ou le clinicien peut demander un panel si l'arbre généalogique et les modélisations sont en faveur.
- Une demande d'analyse ciblée constitutionnelle : confirmation d'une mutation identifiée sur une analyse initiale ou recherche de la mutation chez les apparentés de la mutation identifiée chez le cas-index
- Une demande d'analyse des gènes *BRCA* au niveau tumoral pour l'accès aux anti-PARP dans les cancers de l'ovaire séreux de haut grade.

Quand l'analyse demandée est une analyse somatique l'oncologue médical peut prescrire lui-même la recherche de mutation dans les gènes *BRCA* sans passer par une consultation d'oncogénétique, c'est une analyse à visée thérapeutique. Une analyse génétique constitutionnelle afin d'identifier une prédisposition héréditaire ce sera obligatoirement prescrit par un onco-généticien, après recueil du consentement éclairé du patient pendant la consultation.

Lorsque cette prescription arrivera au laboratoire, le rôle du biologiste sera de valider la prescription, c'est-à-dire vérifier la bonne indication de l'analyse génétique dans la famille, le choix de la personne testée, le choix du panel de gènes et le choix de la technique (peut-être différent selon l'urgence de la demande par exemple car les délais vont varier selon les techniques utilisées). Il vérifiera également que le consentement a bien été recueilli et que le médecin prescripteur est agréé pour les demandes au niveau constitutionnel. Dans un souci de stratégie coût-efficacité le biologiste peut mettre en attente une analyse si celle-ci ne lui semble pas pertinente. Il informera alors le prescripteur et le dossier pourra être revu dans une RCP pour conclure sur l'indication ou non d'une analyse.

***b) Mesures mises en place en cas de mutation identifiée :
exemple du syndrome sein-ovaire***

1. Dépistage

Pour la patiente et les apparentés qui sont porteurs de la mutation familiale on peut mettre en place des mesures de dépistage adaptées en définissant :

- **L'âge de début** : en général 5 à 10 ans avant le cancer le plus précoce dans la famille
- **Le rythme** : annuel, tous les 2 ans ...
- **Le type d'examen** : examen clinique, imagerie (mammographie, IRM, échographie)

2. Prévention

Il n'existe pas à ce jour de médicament permettant d'empêcher l'apparition d'un cancer donc le dépistage et les mesures prophylactiques restent les meilleures options. Dans le cadre du syndrome-sein ovaire il est proposé chez les patientes porteuses d'une mutation dans les gènes *BRCA* de mettre en place des mesures de dépistage/surveillance adaptées et/ou de recourir à ce qu'on appelle une chirurgie de réduction de risque. Dans le cadre du syndrome sein-ovaire deux types de chirurgie peuvent-être envisagés :

- **La mastectomie bilatérale prophylactique** qui consiste à retirer les deux glandes mammaires, avec reconstruction ou non, selon le souhait de la patiente. L'opération se fait le plus souvent en deux temps (pour réduire le risque per et post-opératoire).

Après l'opération il est quand même nécessaire de continuer un suivi clinique et par imagerie car il est impossible d'enlever la glande mammaire dans sa totalité car il reste toujours des petits bouts de tissus mammaires pouvant potentiellement se transformer en cancer. Mais cela fait diminuer de manière très significative le risque d'apparition d'un nouveau cancer du sein.

- **L'annexectomie prophylactique** qui consiste à retirer chirurgicalement les ovaires et les trompes. Elle est proposée à partir de 40 ans généralement (car risque faible de développer un cancer de l'ovaire avant cet âge-là). Cela réduit également le risque de cancer du sein (par suppression de l'imprégnation hormonale qui est impliquée dans les cancers du sein hormono-dépendants chez les femmes pré-ménopausées). C'est une opération beaucoup moins délicate au niveau chirurgical, qui se fait par coelioscopie. Pour éviter une ménopause induite trop précoce chez les femmes à risque de développer un cancer de l'ovaire, il est également possible de proposer une fimbriectomie, qui consiste à retirer les trompes et une petite partie de l'ovaire. En effet, il a été prouvé que c'est à partir de la trompe que le cancer de l'ovaire se développe, cela permet donc de réduire significativement le risque de cancer de l'ovaire sans induire une ménopause trop précoce. Dans un deuxième temps la patiente bénéficiera d'une ovariectomie totale.

Bien évidemment ces mesures nécessitent de multiples consultations dans le parcours de soin (consultation avec chirurgien, anesthésiste, oncologue, psychologue) afin d'évaluer les bénéfices-risques entre la surveillance et la chirurgie prophylactique selon les patientes. Par exemple le fait que la patiente soit ménopausée ou non pour la chirurgie ovarienne, ou le fait que le projet parental soit accompli....

3. Accès à une thérapie ciblée

Dans le cadre du cancer sévère de haut grade de l'ovaire chez la femme, il est maintenant possible en France d'avoir accès à une thérapie ciblée si l'on est porteur d'une mutation dans les gènes *BRCA* au niveau constitutionnel ou somatique. Chez les patientes sensibles aux sels de platine et qui répondent à la chimiothérapie, l'oncologue pourra décider de mettre la patiente sous anti-PARP en traitement d'entretien. Le principe est simple, les

enzymes PARP sont impliquées dans la réparation de l'ADN simple-brin alors que les enzymes *BRCA* sont impliquées dans la réparation de l'ADN double-brin. Les cellules tumorales sont déficientes au niveau des gènes *BRCA*, le système de réparation double-brin ne fonctionne donc pas. Si on ajoute, avec ce traitement, une inhibition des enzymes permettant de réparer l'ADN simple-brin, on élimine préférentiellement les cellules tumorales qui ne peuvent plus réparer les lésions simple ou double-brin présentes sur leur ADN: c'est ce qu'on appelle « la létalité synthétique ». Les cellules non mutées *BRCA* au niveau somatique, qui correspondent aux cellules non cancéreuses auront quant à elles beaucoup plus de chances de survie car un des allèles *BRCA* fonctionne toujours pour la réparation de l'ADN double-brin.

c) Mesures mises en place dans les cas où il n'y a pas de mutation identifiée

Ce n'est pas parce que l'on n'a pas identifiée de mutation constitutionnelle que l'on ne peut rien apporter de plus dans la prise en charge des patients. En effet comme on l'a vu précédemment une personne peut ne pas être porteuse de mutation constitutionnelle mais être considérée comme à « un haut risque génétique » pour différentes raisons.

Pour nous aider dans la prise en charge, il existe des algorithmes permettant d'évaluer le risque de survenue de cancer du sein ou de l'ovaire au fil du temps pour chaque patient en fonction des cancers survenues dans la famille et de la disposition familiale (par exemple le modèle « Breast and Ovarian Analysis of Disease Incidence and Carrier Estimation Algorithm » BOADICEA). Cela permet en fonction des modélisations, d'inclure les patients dans des programmes de surveillance haut risque génétique même en l'absence de mutation identifiée (par exemple à partir d'un risque cumulé entre 20 et 80 ans $\geq 20\%$ de faire un cancer du sein on peut proposer une inclusion. Cela permet également de poser des indications éventuelles de chirurgie prophylactique (par exemple une annexectomie prophylactique pour le cancer de l'ovaire pourra être discuté si on retrouve un risque cumulé entre 20 et 80 ans $\geq 3\%$).

Pour les surveillances de type haut risque génétique il existe dans la région PACA, le réseau HerMION (Hereditary Mediterranean Integrated Oncogenetic Network), qui a pour but

d'améliorer la prise en charge médicale des sujets à haut risque génétique de cancers gynécologiques et digestifs, en coordonnant les différents acteurs médicaux (radiologue, gastro-entérologue, onco-généticien, chirurgien...) et en homogénéisant les pratiques par le biais de recommandations données aux différents praticiens. Ce réseau a également pour but de recueillir des données de suivi sur le long terme afin de pouvoir adapter les recommandations si nécessaire.

Il y a également des Réunion de Concertation Pluridisciplinaire (RCP) mensuelle réunissant des oncologues, des chirurgiens, des radiologues, des onco-généticiens, des anatomopathologistes, des psychiatres... au sein de l'IPC afin de définir au mieux la prise en charge des patientes et leurs familles lorsque celles-ci sont considérées comme à haut risque de développer un cancer du sein.

C. PRINCIPALES TECHNIQUES UTILISEES DANS LES LABORATOIRES DE GENETIQUE

Afin d'effectuer les recherches utiles au clinicien pour poser un diagnostic en génétique plusieurs techniques sont utilisées. On distingue les techniques de cytogénétique permettant de rechercher des anomalies de grande taille au niveau du génome (analyse de type caryotype ou Fluorescent In Situ Hybridation (FISH)), des techniques de biologie moléculaire permettant d'identifier des mutations de petite taille (séquençage Sanger, recherche de réarrangements de grande taille (RGT) par Multi Ligation-dependant Probe Amplification (MLPA)). Les dernières techniques développées sont à la frontière entre ces deux domaines avec les puces à ADN et le séquençage haut-débit (Next-Generation-Sequencing (NGS)). Les analyses en génétique peuvent chercher à identifier directement l'anomalie au niveau du gène ou bien au niveau de la protéine pour laquelle il code (exemple de l'immunohistochimie).

1. **Techniques d'analyse au niveau de la séquence nucléotidique (une base à quelques centaines de bases)**

a) ***Techniques de base en biologie moléculaire***

1. **Le séquençage Sanger**

Le séquençage Sanger consiste à amplifier des séquences génomiques sélectionnées à l'aide d'un couple d'amorce qui vient encadrer la zone qui nous intéresse, puis à l'amplifier à l'aide d'une ADN polymérase sur le principe de la polymérase chain reaction (PCR). Il faut ensuite déterminer la séquence génomique en recréant le brin complémentaire grâce au système de complémentarité des bases (cf figure 6). Chaque brin complémentaire va être reformé à l'aide d'un mélange de désoxynucléotides (dNTP) (base normale) et de didésoxynucléotides (ddNTP) (base marquée par un fluorochrome qui arrête l'élongation du brin complémentaire lorsqu'il est incorporé). Ainsi l'incorporation aléatoire de ces deux types de bases à chaque étape d'élongation, va créer au fil de la réaction, des brins de taille différente marqués par une base fluorescente à chaque extrémité. On va ensuite pouvoir les faire migrer sur un gel (séparation par la taille) et identifier la dernière base de chaque brin afin de déterminer la séquence d'ADN. Après traitement informatique, il suffit de comparer cette séquence à la séquence de référence afin de déterminer s'il existe des variations dans la séquence du patient : variation ponctuelle (changement d'une seule base), délétion/insertion d'une ou plusieurs bases, duplication d'une ou plusieurs bases... Cette technique est essentiellement utilisée pour les analyses ciblées, la recherche de mutation récurrente et la confirmation des mutations retrouvées en NGS. Mais elle peut être aussi utilisée lorsque le clinicien demande un délai de rendu de résultat rapide, comme par exemple dans le cadre d'une indication thérapeutique car une analyse isolée est facilement réalisable en Sanger mais pas en NGS (pour des raisons de coût et de temps incompressible inhérent au type de technique utilisée en NGS). Le délai de rendu de résultat moyen se situe entre 1 et 2 mois pour ce type d'analyse.

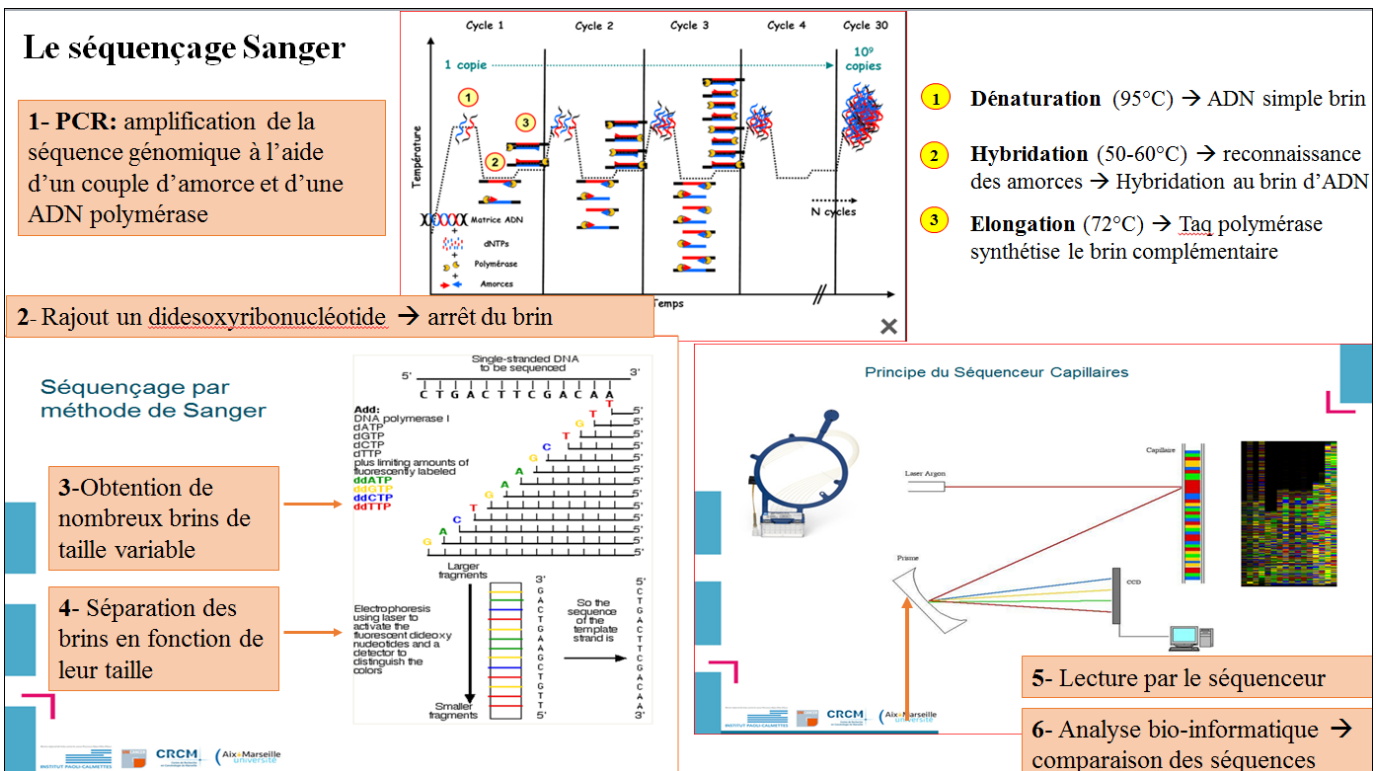


Figure 6 : schéma simplifié du séquençage Sanger (5)(6).

2. La MLPA

Pour identifier des variations du génome de plus grande taille, une des principales techniques utilisées est la MLPA qui permet, grâce à un système de ligation de sonde de savoir si une région génomique est délétée ou dupliquée : on appelle cela un réarrangement de grande taille RGT. Cette méthode, comme le séquençage Sanger, est utilisée pour des analyses ciblées ou pour la confirmation de RGT retrouvés en NGS. Le délai de rendu de résultat se situe entre 1 à 2 mois.

3. Le séquençage haut-débit

Le séquençage haut-débit ou NGS, est une nouvelle technique permettant de séquencer de nombreux gènes pour plusieurs patients en même temps. Il offre la possibilité de détecter à la fois les mutations ponctuelles et les RGT ainsi que les mosaïques. Cependant on va voir que les deux méthodes précédentes sont très robustes et reste indispensable dans un laboratoire de biologie moléculaire à l'heure actuelle. En effet même si le NGS est une technique vraiment efficace lorsqu'on a des effectifs importants à analyser sur les mêmes

panels de gènes, le temps technique et l'interprétation des résultats restent fastidieuses. Pour que le NGS soit rentable au niveau du coût par analyse, il faut pouvoir utiliser les kits disponibles en entier (souvent désignés pour 48 ou 96 échantillons), ce qui nécessite d'avoir un nombre de demandes conséquentes et rapprochées dans le temps. En effet il n'est pas possible de lancer une manipulation technique de NGS pour un ou deux patients avec les machines actuelles, car cela ne serait pas rentable d'un point de vue de coût et de temps technicien. Le NGS est donc plus efficace que le séquençage Sanger seulement dans certaines situations. Dès que le nombre de patients est faible, que le nombre de gènes à explorer est petit et que les délais de rendu de résultat doivent être courts le séquençage Sanger est plus avantageux que le NGS. Il est donc nécessaire pour le biologiste, de choisir quelle technique est la mieux adaptée pour ce que l'on recherche dans le délai imparti.

(a) Principe du NGS

Le principe du NGS est basé sur le même principe que le Sanger, ce sont juste les modalités d'émission du signal permettant de lire la base qui diffèrent selon les technologies utilisées.

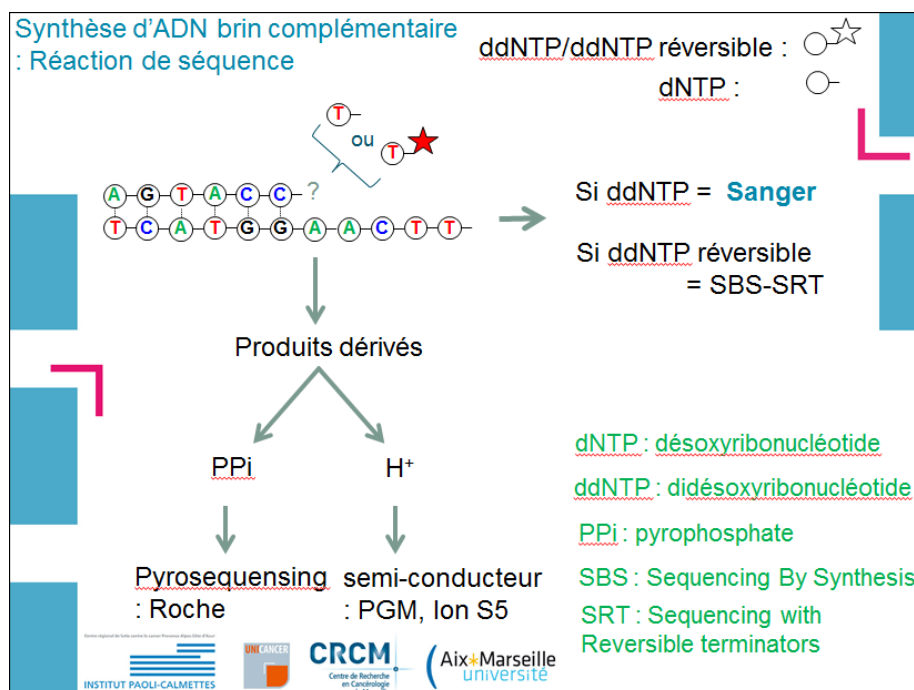
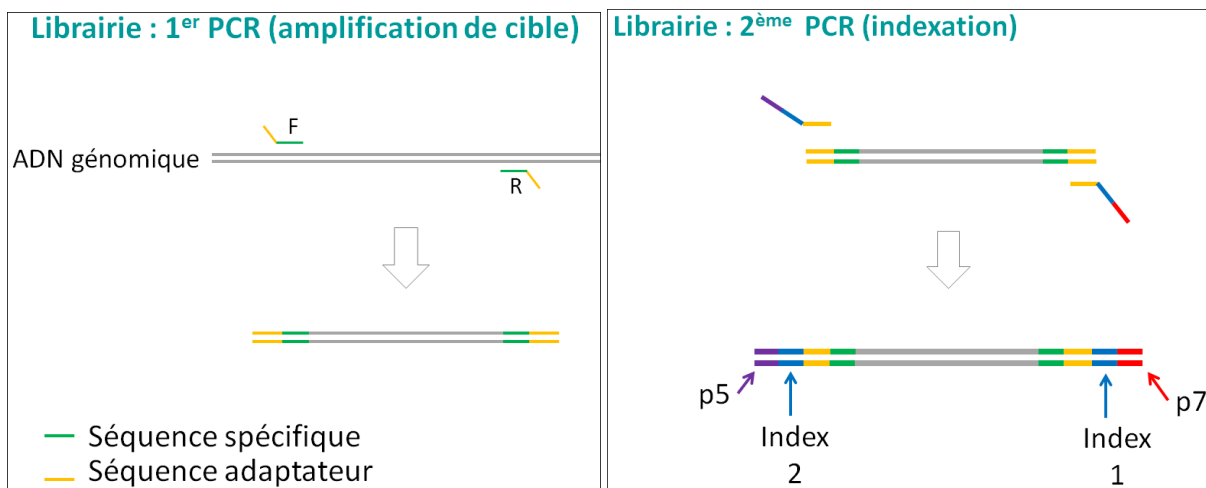


Figure 7 : schéma expliquant les différentes techniques de séquençage (6).

En Sanger on utilise des ddNTP marqués par un fluorochrome qui arrête l'élongation ; la technologie d'Illumina (« Sequencing by Synthesis ») utilise le même principe que pour le séquençage Sanger sauf que le ddNTP est réversible (c'est-à-dire qu'après que le signal ait été lu le fragment qui bloque l'élongation va être détaché afin de pouvoir poursuivre l'élongation du brin) ; Roche et Thermofisher utilisent des produits dérivés, respectivement les pyrophosphates et les ions H⁺ (cf figure 7).

Contrairement à la technique Sanger, le NGS permet de séquencer plusieurs gènes de patients différents en même temps par l'utilisation de « tags » ou « barcode », qui sont des petites séquences assignées en début de manipulation technique à chaque patient (cf index 1 et index 2 sur la figure 8). Une séquence adaptateur va venir se coller aux couples d'amorces (séquence spécifique) qui sélectionnent la région d'intérêt, ce qui permettra ensuite de lier les index (permettant de relier chaque amplicon à un patient) et les séquences universelles (permettant d'initier la synthèse du brin complémentaire) (cf figure 8 et 9). Au laboratoire de l'IPC nous utilisons des kits nous permettant de traiter 45 patients sur 27 gènes par manipulation technique en constitutionnel.



Figures 8 et 9 : schéma expliquant l'amplification et l'indexation de la librairie en NGS (6).

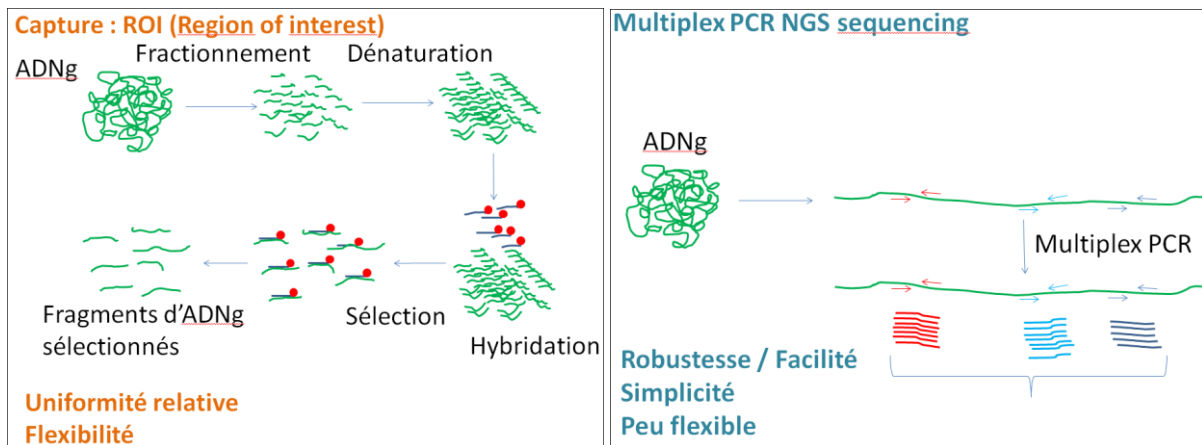
Par exemple au laboratoire de l'IPC, pour séquencer le gène *BRCA1*, qui est composé de 22 exons en séquençage Sanger, 28 couples d'amorces différents vont être utilisés afin de pouvoir couvrir toutes les séquences exoniques de ce gène (en effet pour des contraintes de taille certains exons sont trop grands pour être séquencés avec un seul couple d'amorces).

Ce qui signifie que pour ce seul gène il faudra faire 28 manipulations techniques différentes pour chaque patient. Le séquençage Sanger est donc une technique très robuste mais très chronophage. Pour donner un ordre de comparaison pour séquencer les quelques 3 milliards de bases du génome humain avec la technique Sanger il aura fallu la collaboration de nombreuses équipes à travers le monde, 13 années et un coût avoisinant les 3 milliards de dollars. Aujourd'hui avec le séquençage haut-débit (NGS), il est possible de séquencer un génome entier pour environ 1000 dollars en un à plusieurs jours (selon les techniques et machines). Les délais de rendu de résultat pour une analyse par NGS se situent aux alentours de 9 mois, ce délai pouvant être abaissé à 4-6 mois en cas d'urgence.

(b) Différentes approches en NGS

Plusieurs approches techniques existent en NGS : le **whole genome sequencing**, qui consiste à séquencer le génome entier (analyse complexe, coût élevé et taille importante des données générées) ; l'**exome**, qui consiste à séquencer seulement les régions codantes du génome ; et enfin l'approche par **panel de gènes**, qui consiste à ne séquencer que des gènes définis préalablement en fonction du contexte clinique.

Concernant l'approche par panel de gènes qui est utilisée dans le cadre de l'activité du laboratoire d'oncogénétique moléculaire à l'IPC, il existe principalement deux techniques pour constituer la librairie (correspond aux régions génomiques que l'on veut séquencer) : la technique par capture et la technique par amplification. Un des grands avantages de la technique par capture est qu'il est plus facile de modifier les panels de gènes (ajout de sondes d'hybridation dans le gène d'intérêt) qu'avec la méthode par amplification, qui elle consiste comme le Sanger à amplifier les zones d'intérêt par PCR avec différents couples d'amorces puis à les séquencer (cf figure 10-11). Cette flexibilité est importante car les données en oncogénétique évoluant très rapidement, il est important de pouvoir modifier les panels de gènes en fonction des recommandations sans perdre trop de temps à réajuster les paramètres techniques.



Figures 10 et 11 : schémas montrant le principe de la capture (à gauche) et de l'amplification (à droite) (6).

(c) *Bioinformatique*

Un autre aspect qui a dû être développé avec l'avènement du NGS est le traitement des données générées qui nécessite une collaboration avec des bio-informaticiens. Le NGS c'est des millions de données pour chaque run, ce qui demande des traitements informatiques puissants afin de pouvoir ressortir les informations pertinentes au sein de la masse d'informations délivrées. Plus d'informations veut dire plus de données à traiter et donc plus de temps passé pour l'analyse de ces données. On observe un décalage entre les possibilités techniques de génération de données en génétique et les connaissances nécessaires pour exploiter ces données dans l'optique d'une amélioration de la prise en charge clinique (cf figure 12). En somme on génère plus de données que ce que l'on peut interpréter à ce jour, il faut donc adapter la technique utilisée en fonction des besoins du laboratoire (dans le cadre de l'activité d'oncogénétique moléculaire : en activité de routine le panel de gènes semble le plus adapté, en activité de recherche l'exome ou le grand panel de gènes semblent plus adaptés aux objectifs attendus). Ceci s'explique par le fait qu'on séquence de nouveaux gènes pour lesquels peu de données existent aujourd'hui dans les bases de données génomiques ou la littérature ce qui rend difficile l'interprétation des variations retrouvées.

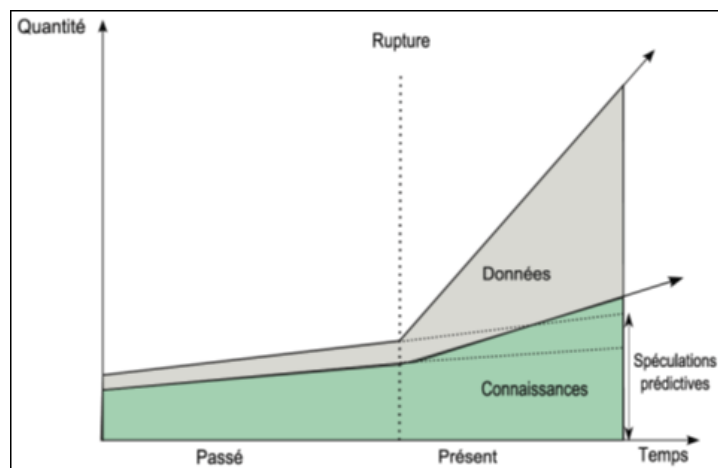


Figure 12 : schéma comparant la cinétique de développement des connaissances en génétique par rapport aux données bio-informatiques générées (6).

Grâce aux outils bio-informatiques, il est possible de définir des filtres permettant de ne dévoiler que les gènes demandés par les cliniciens, ce qui permet d'éviter ce qu'on appelle les incidentalomes (découverte fortuite d'une mutation dans un gène autre que ceux demandés par le clinicien, c'est-à-dire sans rapport avec l'indication pour laquelle l'analyse a été prescrite). Une fois les données filtrées, les traitements bio-informatiques associent chaque amplicon au patient correspondant. Il faut ensuite réaligner la séquence de chaque amplicon sur la séquence de référence afin de définir les séquences de chaque patient et pouvoir vérifier la qualité de ces séquences.

Pour des soucis techniques et de coût, il est plus facile de séquencer d'emblée un panel de gènes défini au préalable (en fonction de l'activité du laboratoire) que de séquencer seulement quelques gènes, et si les résultats sont négatifs, de séquencer à nouveau d'autres gènes par la suite.

Il existe donc des panels rattachés aux principaux syndromes explorés à l'IPC :

- **Le panel sein-ovaire** : 13 gènes, tel que défini par le Groupe Génétique et Cancer (GGC)
BRCA1/BRCA2/CDH1/PALB2/PTEN/MSH2/MSH6/MLH1/PMS2/P53/EPCAM/RAD51C/RAD51D
- **Le panel ovaire** : 10 gènes *BRCA1/BRCA2 /PALB2 /MSH2/MSH6/MLH1/PMS2/P53/RAD51C/RAD51D*

- **Le panel digestif (lynch-polypose) : 7 gènes**
MSH2/MSH6/MLH1/PMS2/EPCAM/MUTYH/APC
- **Le panel général : 16 gènes**
BRCA1/BRCA2/PALB2/PTEN/MSH2/MSH6/MLH1/PMS2/P53/EPCAM/MUTYH/APC/STK11/RAD51C/RAD51D.

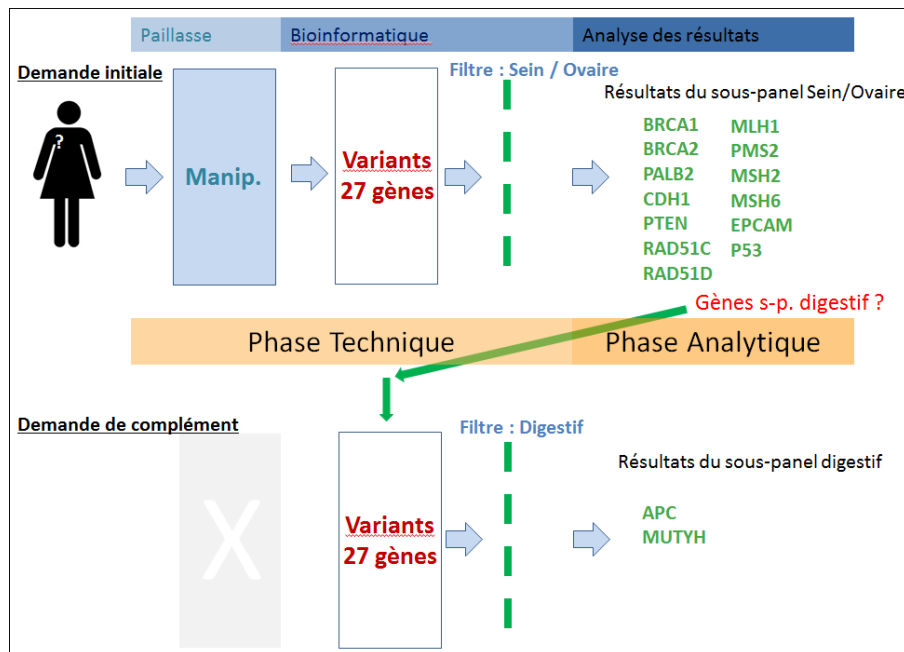


Figure 13 : schéma du processus d'une analyse par NGS avec intégration des filtres bio-informatiques par Quentin Da Costa (Bio-informaticien IPC Marseille).

En pratique le clinicien va choisir le panel qu'il veut en fonction du contexte clinique mais techniquement les 27 gènes du panel (comportant les gènes cliniques cités ci-dessus et des gènes « recherches » utiles pour évaluer l'implication clinique de certains gènes dans différentes pathologies tumorales) seront séquencés. Grâce aux filtres bio-informatiques seuls les gènes demandés par le clinicien seront analysés par les biologistes, les variants présents dans les autres gènes ne seront pas dévoilés (cf figure 13).

On comprend bien que ce problème « d'incidentalome » se pose encore plus dans les cas d'exomes ou du whole genome sequencing puisque par exemple dans les exomes toutes les régions codantes du génome sont séquencées. On peut donc retrouver des mutations dans des gènes n'ayant pas du tout de rapport avec le motif de consultation initial du patient. Se pose également la question de l'utilisation clinique d'une mutation dans un gène dont on ne

connaît pas la fonction à ce jour ou d'un variant de signification inconnu (variant dont on ne peut pas conclure sur le caractère pathogène ou bénin).

(d) *Score qualité*

En NGS deux paramètres sont très importants pour évaluer la qualité des séquences et la fiabilité des résultats : la couverture et la profondeur. La couverture correspond au pourcentage de base séquencée sur toute la séquence d'intérêt alors que la profondeur correspond au nombre de fois où une base va être lue. Ces deux paramètres sont interdépendants car on définit une couverture à une profondeur donnée.

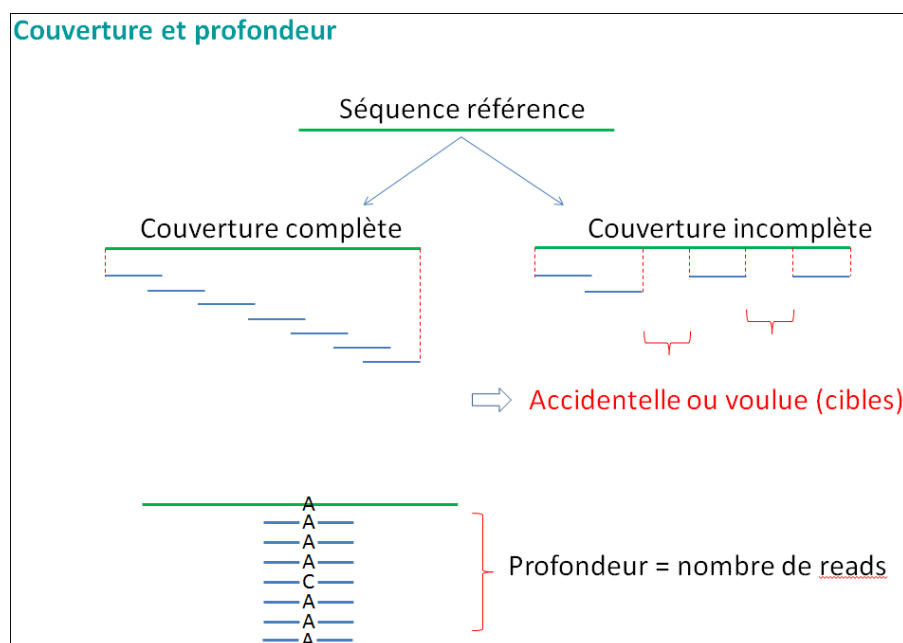


Figure 14 : Les paramètres qualités utilisés en NGS (6).

(e) *Analyse des données*

Une fois le traitement bio-informatique des données et la vérification de la qualité des séquences effectués, il faut alors analyser les données biologiquement : c'est-à-dire déterminer si les données qui diffèrent de la séquence de référence peuvent être impliquées dans l'apparition de la maladie ou non.

Il existe un système international de classement des variants afin de déterminer chez chaque patient si le variant retrouvé est un simple polymorphisme ou une mutation délétère qui explique la maladie :

1. **Variant de classe 1** = polymorphisme = bénin
2. **Variant de classe 2** = probablement bénin
3. **Variant de classe 3** = variant de signification inconnu = VSI
4. **Variant de classe 4** = variant probablement pathogène
5. **Variant de classe 5** = variant pathogène = mutation délétère

Afin d'établir ce classement il faut se baser sur plusieurs critères et pour cela nous nous aidons du logiciel ALAMUT®Visual (Interactive Biosoftware) qui regroupe une grande partie des données nécessaires à l'analyse des variants, comme la fréquence dans les différentes populations, les conséquences de la mutation au niveau de l'acide aminé et de la protéine, des données sur l'épissage, des prédictions bio-informatiques sur les conséquences de la mutation, des données de conservation des acides aminés entre les espèces ... (cf en annexe la fiche reprenant les principales recommandations pour l'interprétation des variants).

En pratique un variant classé pathogène entrainera une prise en charge clinique adaptée pour le patient en fonction des risques auxquels il est exposé. Un variant de classe 4 pourra aussi entraîner une prise en charge au niveau clinique et nécessitera une réévaluation régulière pour voir si le classement de ce variant évolue dans le temps. Les variants de classe 2 et de classe 1 n'étant pas considérés comme pathogène, ils n'entraînent pas de modifications de prise en charge quant à eux et n'apparaîtront donc pas sur le compte-rendu donné aux patients et au prescripteur. Les variants de classe 3, dont l'effet n'est pas prédictible avec les connaissances actuelles, n'entraînent pas de prise en charge clinique spécifique, mais il est important de suivre régulièrement l'évolution du classement de ces variants car avec l'essor du séquençage haut-débit des données s'accumulent au fil du temps ce qui permet de reclasser certains variants de classe 3 en mutation ou en polymorphismes. Il est donc important d'avoir des bases de données permettant de pouvoir retrouver tous les patients porteur d'un variant dont le classement à changer afin de pouvoir en informer le clinicien qui s'en occupe, qui pourra alors adapter la prise en charge clinique si nécessaire. La complexité des analyses génétiques par haut-débit réside dans le fait que les connaissances et les techniques évoluent constamment et que ce qui est vrai aujourd'hui ne l'est plus

forcément demain. Il est important de délivrer une information claire au patient pour qu'il comprenne bien que l'interprétation d'un résultat de génétique peut être différente dans le futur contrairement à la majorité des examens pratiqués en biologie médicale.

La sécurité quant au stockage des données issues du séquençage haut-débit est également un sujet important car cela pourrait dévoiler des informations personnelles sur les patients et leurs prédispositions héréditaires qui pourraient être utilisées à des malveillantes si des personnes extérieures au laboratoire pouvaient avoir accès à ces données (information aux assurances, aux employeurs...).

4. L'étude de la méthylation

Certaines zones du génome peuvent être soumises à la méthylation ce qui peut faire varier le niveau d'expression d'un gène. Il existe des zones de répétition de doublets Cytosine-Guanine que l'on appelle îlots CpG qui peuvent subir une méthylation et qui sont souvent situés dans les régions promotrices des gènes. Si ces zones sont hyperméthylées cela peut aboutir à un défaut d'expression du gène.

On peut étudier la méthylation en effectuant un traitement au bisulfite de sodium afin de transformer les cytosines non méthylées en uracile (U) alors que les cytosines méthylées seront transformées en thymine. Il suffira alors de comparer le taux de T et de U au niveau des îlots CpG pour déterminer le niveau de méthylation de la région en question. On peut citer par exemple l'hyperméthylation du promoteur de *MLH1* dans le cadre du cancer colorectal.

b) Techniques d'analyse au niveau des gènes et de l'expression des gènes

1. L'Hybridation génomique comparative (CGH-array)

L'hybridation génomique comparative, consiste à balayer l'ensemble du génome par le design de sondes sur lesquels vont venir s'hybrider de manière compétitive l'ADN du patient et un ADN témoin. Cela permet de mettre en évidence des variations du nombre de copies (CNV) (régions dupliquées ou délétées) au niveau du génome. C'est une approche entre la biologie moléculaire et la cytogénétique du point de vue de la taille des anomalies explorées.

C'est une technique très utilisée dans le cadre de l'exploration des retards mentaux, des syndromes dysmorphiques....

2. Les puces à ADN pour étude du transcriptome (=profil d'expression génique)

Les puces à ADN permettent d'analyser le niveau d'expression des gènes. On va extraire les ARN totaux des cellules que l'on veut étudier, puis leur faire subir une rétrotranscription pour les transformer en ADN complémentaires (ADNc) marqués par des fluorochromes. Ensuite ces ADNc seront déposés, dans des conditions favorables à l'hybridation, sur une puce contenant des sondes complémentaires de ces ADNc. Une fois l'hybridation faite on va laver la puce pour éliminer tous les ADNc qui ne se sont pas hybridés, et lire le signal pour déterminer quels gènes sont sur ou sous exprimés. C'est une technique très utilisée dans le domaine de l'oncologie notamment pour classer et typer les tumeurs, explorer l'effet d'un traitement au niveau de l'expression des gènes ou encore comparer les profils d'expression entre tissu sain et tissu tumoral.

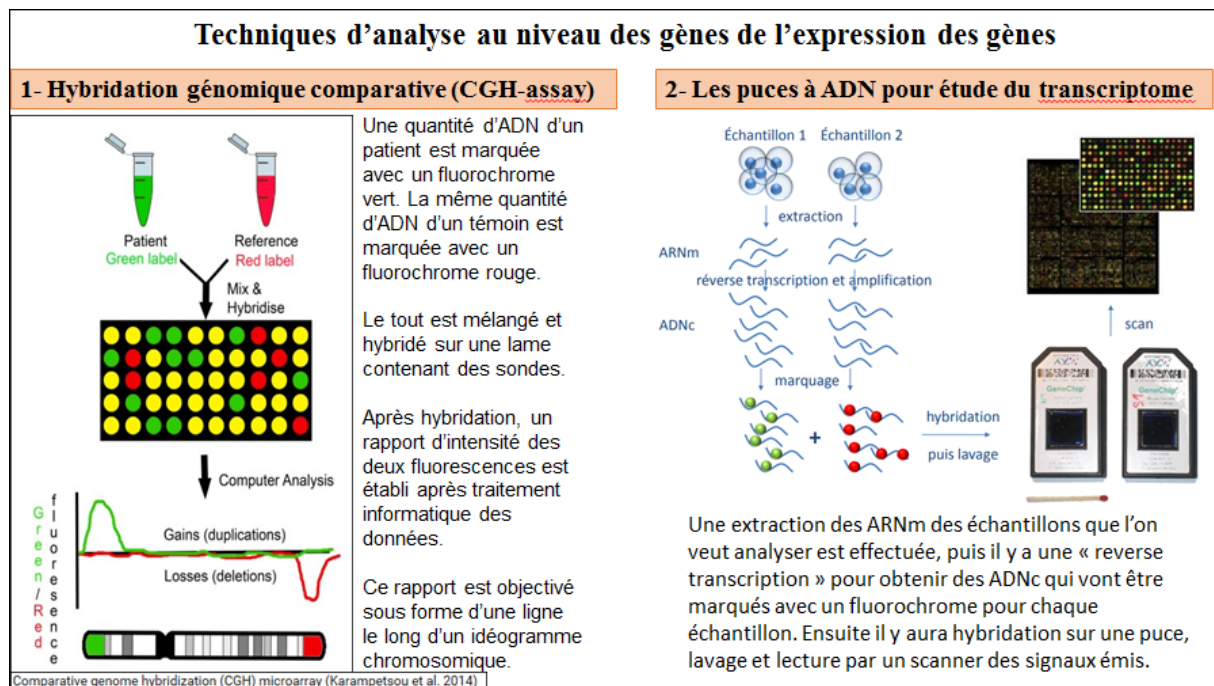


Figure 15 : Les techniques d'analyse au niveau des gènes et de l'expression des gènes.

c) *Techniques d'analyse au niveau de la cellule/tissu*

1. Le caryotype (résolution 5Mb)

Il est obtenu en cultivant et en faisant rentrer en division les chromosomes d'une cellule afin de pouvoir observer des anomalies de nombre (trisomie, monosomie), des translocations (échanges de matériel génétique intra chromosomique ou inter chromosomique), des délétions ou duplications de grande taille. C'est une technique très utilisée en laboratoire de cytogénétique notamment pour le diagnostic des syndromes génétiques impliqués dans les retards mentaux, les troubles du développement et les dysmorphies.

2. La « Fluorescent In Situ Hybridation » FISH (résolution 100kb-1Mb)

La FISH consiste à utiliser des sondes marquées par un fluorochrome qui vont venir s'hybrider sur une région génomique d'intérêt afin de déterminer si cette région se trouve à la bonne place au niveau du génome (identification de translocation) et si son nombre de copies est normal (identification de délétion ou duplication). C'est une méthode ciblée et il faut donc savoir ce que l'on cherche quand on l'utilise (à partir d'une suspicion clinique d'un syndrome, ou pour confirmer une anomalie identifiée au caryotype ou en CGH-array). Elle est très utilisée dans les laboratoires de cytogénétique pré et post-natale.

3. L'ImmunoHistoChimie (IHC)

C'est analyse qui se fait au niveau histologique, c'est-à-dire sur du tissu directement, afin de savoir si les cellules de ce tissu expriment ou non une protéine. Cela consiste à marquer un anticorps dirigé contre ce que l'on recherche (expression des récepteurs hormonaux dans le cancer du sein par exemple) et à lire le signal au microscope (permettant de déterminer différents niveaux d'expression et la localisation de la protéine). Cet examen est généralement fait par les laboratoires d'anatomopathologie dans le cadre des explorations en oncogénétique.

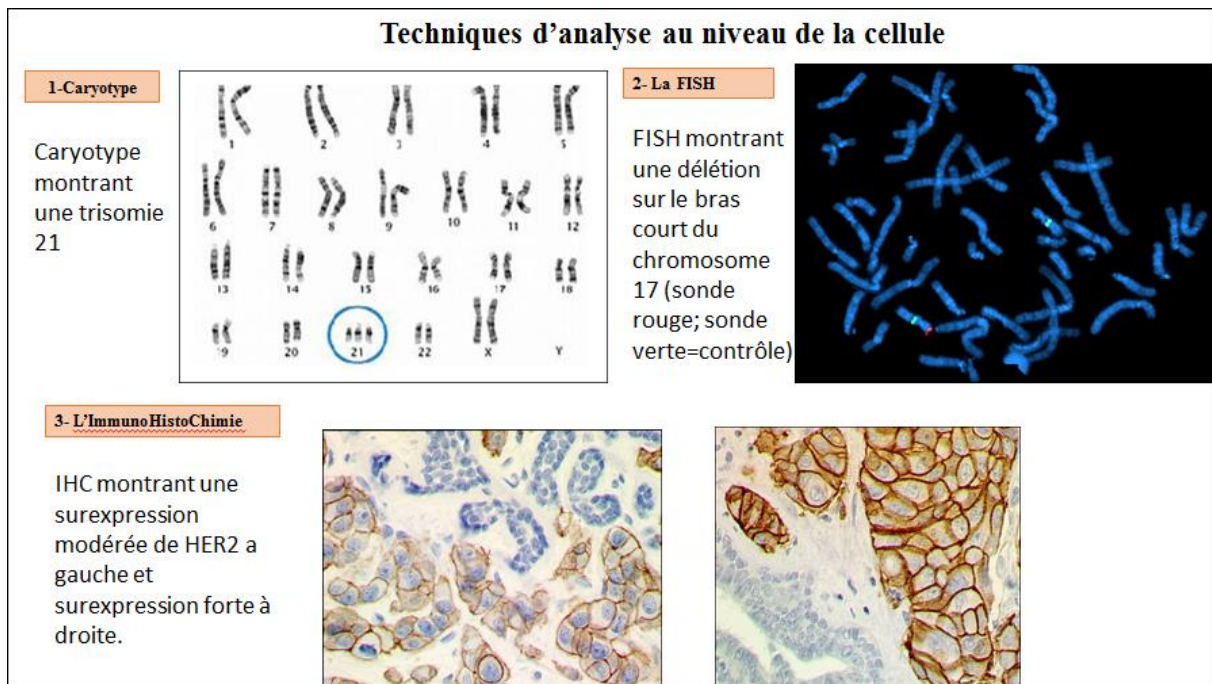


Figure 16 : Les techniques d'analyse au niveau de la cellule.

4. « Tissue micro-array » (TMA)

Le « Tissue micro-array » permet de regrouper sur un seul bloc des centaines d'échantillons de tissus et d'analyser l'expression de protéines d'intérêt par immunohistochimie ou immunofluorescence par exemple. Dans le domaine de la recherche en oncologie, elle est complémentaire des puces à ADN afin de comparer les sur ou sous expressions de gènes mises en évidence sur les puces à ADN et les conséquences sur le tissu étudié au niveau de l'expression de la protéine.

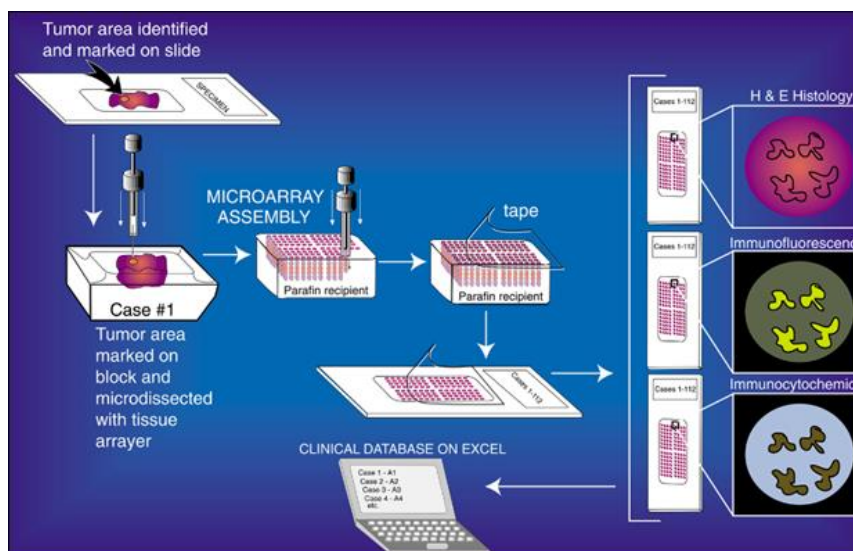


Figure 17 : schéma expliquant la technique par puce à ADN (7).

d) La qualité en laboratoire de biologie moléculaire

Tout comme les autres champs de la biologie médicale, les laboratoires de biologie moléculaire sont soumis à l'accréditation par le Comité français d'accréditation (COFRAC) avant d'avoir le droit de pratiquer des analyses de biologie médicale. La démarche qualité dans un laboratoire consiste à la mise en place de procédures écrites, connues de tout le personnel, qui établissent les règles à suivre pour effectuer une analyse. Cela permet de s'assurer que les résultats que l'on rend sont fiables, et issues de procédures rigoureuses et contrôlées.

Deux points sont importants en biologie médicale :

- La certification ISO 9000 : « procédure par laquelle une tierce partie donne une assurance écrite qu'un produit, un processus ou un service satisfait aux exigences spécifiées »
- La norme ISO 15189 qui repose sur l'assurance qualité, la validation de méthode et l'évaluation externe de la qualité (contrôle d'Evaluation Externe de la Qualité (EEQ) entre différents laboratoires afin de comparer les résultats sur une analyse donnée (norme ISO 17043)).

Les laboratoires sont soumis à des visites régulières du COFRAC afin d'accréditer une analyse ou renouveler l'accréditation d'une analyse déjà accréditée. Des contrôles internes de qualité (CIQ) et des EEQ sont régulièrement effectués dans les laboratoires afin de s'assurer de la bonne manipulation technique des échantillons et de l'analyse des résultats par les biologistes. Ces exigences de qualité demandent beaucoup de temps et d'organisation mais permettent une amélioration du service rendu aux prescripteurs, par une amélioration continue des processus et de la fiabilité des résultats.

D. LE CANCER DU SEIN TRIPLE NEGATIF

1. Généralités sur les cancers du sein

Le cancer du sein est une maladie très hétérogène au niveau de sa présentation clinique, des caractéristiques tumorales et de la prise en charge thérapeutique (pronostics et sensibilités thérapeutiques distinctes).

a) Epidémiologie

Le cancer du sein est le premier des cancers incidents chez la femme, devant le cancer du côlon et le cancer du poumon. 58 968 nouveaux cas de cancer du sein ont été diagnostiqués en France métropolitaine en 2017. Il a été recensé 11 883 décès par cancer du sein en 2017 en France ce qui représente 18,2% des décès par cancer chez les femmes et 8% de l'ensemble des décès par cancer en France (tous sexes confondus). Au niveau mondial il est recensé près de 1,7 million de nouveaux cas chaque année. Le taux de mortalité diminue d'année en année grâce à l'amélioration des traitements et la mise en place du dépistage général organisé (78% des cancers du sein sont diagnostiqués chez des femmes de plus de 50 ans) (8)(9).

b) Classification des cancers du sein

1. Classification histologique

Chaque sein contient une glande mammaire qui est composée de quinze à vingt compartiments séparés par du tissu graisseux et du tissu de soutien (contenant des vaisseaux, des fibres et de la graisse). Chacun des compartiments de la glande mammaire est constitué de lobules (produisant le lait) et de canaux (transportant le lait vers le mamelon) (cf figure 18).

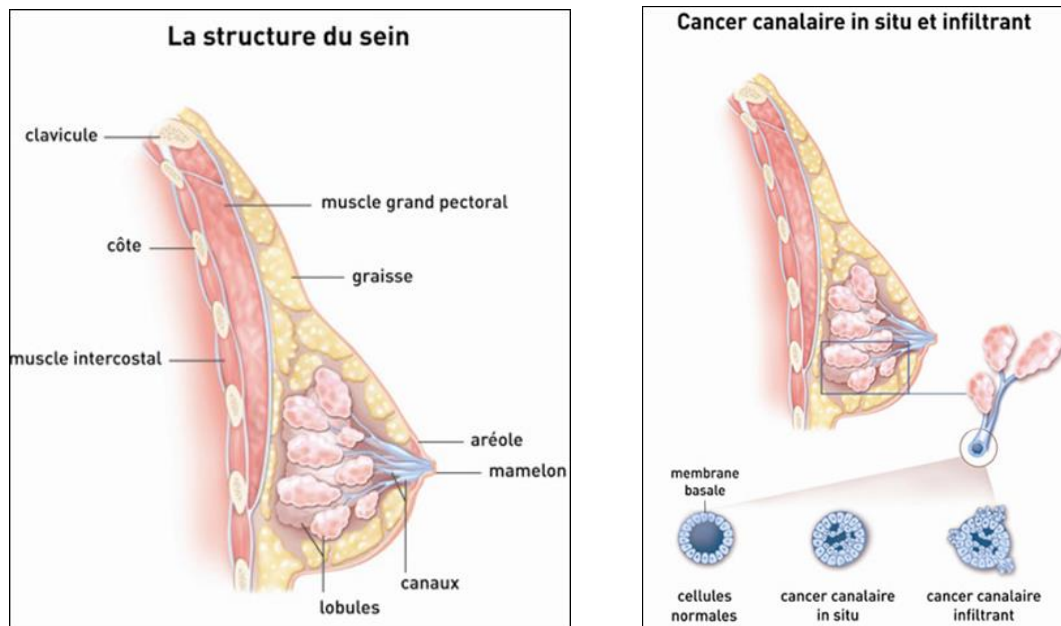


Figure 18 : Coupe anatomique de la glande mammaire et d'un canal (extrait du site « ecancer »).

Selon l'origine des cellules à partir desquelles se développent la tumeur du sein on distinguera plusieurs types de cancers : carcinome, si c'est à partir des cellules épithéliales; sarcome, si c'est à partir des cellules mésenchymateuse ; lymphome si c'est à partir des cellules du système lymphatique

95% des cancers du sein sont des adénocarcinomes c'est-à-dire des tumeurs développés à partir des cellules épithéliales (carcinome) de la glande (adéno) mammaire. Ces adénocarcinomes se développent le plus souvent au niveau des canaux de la glande mammaire on les appelle alors des carcinomes canaux. Cependant il existe d'autres formes plus rares de carcinomes au niveau du sein : carcinome lobulaire, médullaire, papillaire, mucineux, tubulaire....

Selon que la membrane basale soit franchie ou non on distinguera les carcinomes infiltrants et les carcinomes in situ respectivement (cf figure 18).

Une fois la membrane basale franchie les cellules cancéreuses peuvent alors se propager dans les ganglions ou le reste du corps, c'est ce que l'on appelle les métastases.

C'est un stade plus avancé de la maladie et donc de moins bon pronostic, c'est pourquoi il est important de diagnostiquer la maladie à un stade précoce.

Pour déterminer le type histologique, l'anatomopathologiste va examiner des biopsies de la tumeur au microscope. Il va ainsi apporter une valeur pronostique (par détermination du grade histopronostique de Scarff Bloom et Richardson (SBR)) et orienter la prise en charge thérapeutique en participant à la classification TNM de la tumeur en complément des données d'imageries.

Le grade histopronostique SBR repose sur 3 critères noté chacun de 1 à 3 et témoigne de l'agressivité de la tumeur (grade 1 = peu agressif à grade 3 = cancer agressif):

- 1^{er} critère : l'architecture cellulaire
- 2^{ème} critère : la forme du noyau
- 3^{ème} critère : l'activité mitotique (reflétant la vitesse à laquelle les cellules tumorales se divisent)

La classification TNM (Tumor, Node, Metastasis) est basée sur 3 critères :

- **T** : Taille et infiltration de la tumeur de Tx (tumeur non évaluable) à T4
- **N** : Ganglions lymphatiques envahis ou non (Node) de NX (non évaluable) à N3
- **M** : Métastases ou non de M0 (absence) à M1 (présence)

2. Classification immunohistochimique

En plus de ces caractéristiques histologiques, il est important de définir les caractéristiques IHC de la tumeur car cela apporte également une valeur pronostique et oriente la prise en charge thérapeutique. Cette méthode, bien qu'imparfaite, est un moyen simple et relativement reproductible pour classer les cancers du sein à bas coût et avec peu de moyens techniques. Pour cela on va rechercher au niveau de la tumeur :

- **L'expression ou non des RH** (Récepteur aux Œstrogènes (RO) ou Récepteur à la Progestérone (RP)) → les tumeurs exprimant les RH sont souvent de bas grade donc moins agressives, un traitement ciblé par hormonothérapie est possible (à partir de 1% de cellules exprimant les RH)

- **Le statut HER2** (Human Growth Epithelial Factor) : recherche d'une surexpression (3+ en IHC) ou d'une amplification par FISH de l'oncoprotéine HER2 → si positif (15-20% des cancers du sein) c'est un marqueur d'agressivité tumorale mais il existe un traitement ciblé par un anticorps bloquant cette protéine membranaire HER2 appelé le trastuzumab.

Si la tumeur est négative pour ces 3 critères on dit alors que le cancer du sein est triple négatif (TN) : RO -, RP- et pas de surexpression/amplification de HER2. Des consensus internationaux ont émis des recommandations pour classer un cancer du sein triple négatif mais si définir le statut HER2 apparaît relativement reproductible par IHC ou FISH, il demeure des variations quant au pourcentage retenu pour la négativité des RH. Les sociétés savantes recommandent d'affirmer la négativité des RH en dessous du seuil de 1% de cellules positives en IHC. On constate cependant que ce seuil n'est pas toujours celui retenu dans toutes les études ce qui complique la comparaison des résultats entre les différentes études.

Bien qu'imparfaite la classification basée sur des techniques d'IHC et de FISH reste la référence à ce jour pour des raisons de coût et de matériel disponible (accès à une pièce de tumorectomie congelée nécessaire pour étude des profils moléculaires).

3. Classification moléculaire

Avec l'arrivée de nouvelles techniques de biologie moléculaire comme les puces à ADN et le séquençage haut-débit, de nombreuses études ont tenté d'établir une classification moléculaire des cancers du sein en prenant en compte des marqueurs cellulaires (RH, statut HER2, récepteur à l'EGF, expression des cytokératine5/6) et des profils d'expression génique (permettant de quantifier l'expression des gènes au sein de la tumeur) . Cette classification plus complexe et plus coûteuse est plutôt utilisée en recherche pour le moment afin d'identifier les différentes voies moléculaires impliquées dans les différents types de cancer du sein.

Cette classification moléculaire est basée sur le fait qu'il existe deux types de cellules épithéliales au niveau de la glande mammaire : les cellules luminales bordant la lumière qui expriment les RO et les RP (qui sont donc sensibles aux hormones) ; et les cellules basales ou myoépithéliales, en contact avec la membrane basale et le stroma, qui n'expriment pas les RH et qui sont associées à un moins bon pronostic (cf figure 19) (11).

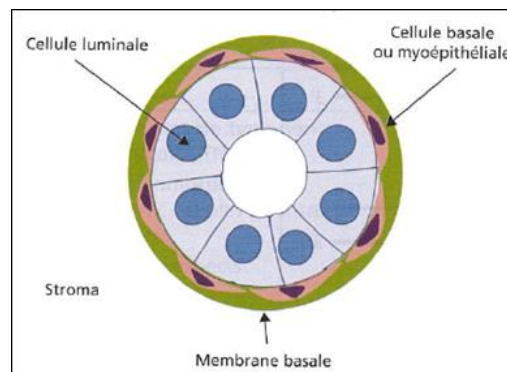


Figure 19 : Coupe histologique du tissu mammaire (11).

Malgré de nombreuses études réalisées sur le sujet, les classifications apparaissent rarement reproductibles entre elles. Une des explications est la différence du nombre de gènes explorés dans le design des puces à ADN (du millier jusqu'à 10.000 gènes pour certaines études).

Cependant certains sous-types sont fréquemment retrouvés dans ces études comme :

- **Sous-type Luminal A** : caractérisé par une très forte expression des gènes associés aux RO et une stabilité du génome, ils sont associés à des cancers de bas grade et sont d'évolution plutôt favorable. Un traitement par hormonothérapie est souvent prescrit.
- **Sous-type Luminal B** : caractérisé par une expression plus faibles des gènes associés aux RO et un génome plus instable, ils sont associés à des cancers moins différenciés de plus haut grade histologique, et plus prolifératifs que les luminal A
- **Sous-type HER2+** : caractérisé par une forte expression de HER2, ils sont associés à des cancers plutôt agressif mais sensible à la chimiothérapie. Un traitement par trastuzumab est possible.
- **Sous-type Basal-like** : entité très hétérogène caractérisée par l'absence d'expression des RO et d'amplification de HER2, une grande instabilité génomique, des altérations

de P53 et une expression variable d'EGFR et du récepteur aux androgènes (RA). Ils sont associés à des cancers de haut grade et de mauvais pronostic.

- **Sous-type Claudin-Low:** RO-/RP-/HER2 -, cancers développés aux dépens des cellules souches ou progénitrices.
- **Sous-type Normal-like :** mal défini, sont classés dans ce type tous les cancers ne rentrant pas dans un des autres sous-types.

Des tests moléculaires commerciaux sont actuellement disponibles pour définir ces sous-types à partir d'un bout de tumeur comme le Prosigna® (PAM 50) (50 gènes, Eurofins Biomnis, France) (1800 euros délai 7/10j) ou l'Oncotype (21 gènes, USA, Genomic Health) mais le nombre de gènes analysés étant peu important on perd en qualité d'information. Ces tests sont censé apporter une valeur pronostique par l'analyse de ces gènes.

Comme il n'est pas possible d'utiliser cette classification en routine pour les raisons que l'on a évoqué précédemment, il a été corrélé, à partir des données d'IHC déjà connues, à chaque sous-type moléculaire un profil IHC en utilisant en plus des 3 critères classiques vus précédemment (RO, RP et HER2), l'antigène Ki67 (marqueur de prolifération), les cytokératines CK5/6 (exprimées dans cellules luminales) et CK8/18 (exprimées dans les cellules basales) ainsi que l'EGFR. On obtient ainsi 5 profils IHC pouvant nous donner une orientation pronostique et thérapeutiques :

- **Profil IHC Luminal A :** expression forte des RO et Ki67 faible <14%, CK8/18 +
- **Profil IHC Luminal B :** expression plus faible des RO avec possible dissociation RO/RP, Ki67 >30% et CK8/18 +
 - Luminal B non HER2 : si absence de surexpression/amplification HER2
 - Luminal B HER2 : si présence d'une surexpression/amplification HER2
- **Profil IHC Her2 :** tumeurs non luminales (CK8/18-, RO-) avec une surexpression/amplification HER2
- **Profil IHC TN :** RO-, RP- et Her2 non surexprimé et/ou amplifié
- **Profil IHC basal like :** RO-, RP-, Her2-, expression de CK5/6 et/ou EGFR

c) *Prise en charge du cancer du sein*

La prise en charge du cancer du sein est très variable selon le type histologique, les caractéristiques immuno-histochimiques de la tumeur, le stade TNM, l'état général du patient...

La prise en charge repose sur des traitements locorégionaux (chirurgie et radiothérapie), des traitements systémiques (chimiothérapies) et des traitements ciblés (hormothérapie, Anticorps anti-HER2). Ces différents traitements peuvent être utilisés seuls ou en association selon le type de tumeur, le contexte clinique et la stratégie adoptée par l'oncologue. Deux nouvelles pistes thérapeutiques apparaissent comme prometteuses : l'immunothérapie et les thérapies ciblées (prenant en compte des facteurs moléculaires propres à chaque patient et à chaque tumeur pour traiter la maladie).

d) *Cancer du sein et oncogénétique*

Le cancer du sein peut, comme on l'a expliqué précédemment, se développer dans le cadre d'un syndrome de prédisposition héréditaire lorsqu'une mutation constitutionnelle est présente dans un gène de prédisposition au cancer du sein. Dans 5% des cancers du sein (tous types confondus) les malades sont porteurs d'une mutation dans un des deux gènes majeurs de prédisposition au cancer du sein *BRCA1* et *BRCA2*. D'autres gènes sont maintenant associés à la prédisposition au cancer du sein comme le gène *PALB2*, *CDH1* ou encore *PTEN*.

2. Le cancer du sein triple négatif

Un type de cancer du sein suscite beaucoup d'intérêt depuis une quinzaine d'années : le cancer du sein triple-négatif (CSTN) qui est défini par l'absence d'expression des récepteurs hormonaux (RH) et l'absence de surexpression/amplification de la protéine HER2. Ils représentent 12 à 17% des cancers du sein.

a) Principales caractéristiques du cancer du sein triple-négatif

Les CSTN peuvent être caractérisés par (12),(13):

- Les critères épidémiologiques :
 - Plus fréquent chez les femmes < 40ans
 - Plus fréquent chez les africaines et afro-américaines
 - Plus fréquent chez les femmes avec un Index Masse Corporelle (IMC) élevé
- Un âge jeune au diagnostic :
 - Selon la National Cancer Institute (NIH, USA) et the Robert Koch Institute (Allemagne) : âge moyen de diagnostic du cancer du sein se situe entre 62-64ans. Pour l'INCa en 2012 l'âge moyen au diagnostic du cancer du sein était de 63ans.
 - Pour le CSTN : les études estiment un âge d'apparition entre 51 à 58ans (14–16)
- Le phénotype TN :
 - Phénotype TN est retrouvé dans 8.6% des cancers du sein et 19.8% des cancers du sein chez les <40ans d'après the Munich Cancer Registry en Allemagne
- Le mode de découverte :
 - Cancer de l'intervalle (plus souvent dépisté à l'examen clinique qu'à l'imagerie car progression rapide et agressive)
- Les caractéristiques tumorales :
 - Environ 80% des CSTN sont de grade 3 (14)
 - Environ 85% sont des carcinomes infiltrants de type non spécifique (CTNS) (correspond à l'entité anciennement appelé carcinome canalaire infiltrant (CCI) que l'on utilisera par la suite pour ne pas confondre avec CSTN et CTNS).
 - Environ 80% sont de sous-type basal like d'un point de vue moléculaire
 - Tumeur plus volumineuse que les autres formes de cancer invasif du sein mais sans corrélation nette avec la survie
- L'évolution :
 - Envahissement ganglionnaire moins fréquent, avec faible association entre taille de la tumeur et métastase ganglionnaire (laissant suggérer un mode de dissémination différent des autres sous-types plus volontiers hématogène(13))
 - Plus agressif avec plus de métastases cérébrales et viscérales, moins de métastases osseuses

- Le pronostic :
 - Risque de rechute et de décès plus élevé dans les 3 à 5 premières années après le diagnostic (cf figure 17)
 - Taux de survie globale à cinq ans estimé aux alentours de 70% par rapport à un taux supérieur à 80% pour les autres types de cancer du sein (17).
 - Survie diminuée après première métastase par rapport aux autres types
- La réponse au traitement :
 - Bonne chimiosensibilité malgré un risque de rechute élevé (cf tableau 1)
 - Pas de thérapie ciblée disponible

Les CSTN présentent de meilleurs taux de réponses à la chimiothérapie que les cancers du sein non-TN (CSNTN) mais paradoxalement des courbes de survie moins bonne : c'est « le paradoxe des CSTN ».

Le tableau ci-dessous provient d'une étude faite à Houston (USA) sur 1118 patientes diagnostiquées d'un cancer du sein non métastatique et ayant reçu une chimiothérapie néo-adjuvante. Les auteurs ont comparé le taux de réponse complète pathologique selon la chimiothérapie utilisée et le statut TN : on constate que les taux de pCR sont plus élevés chez les CSTN ce qui témoigne bien d'une meilleure chimiosensibilité sur des schémas thérapeutiques standards.

Table 2. pCR Rates as Function of Triple-Negative Status and Chemotherapy Regimens

Regimens	pCR Rates						Differences	95% CI	P ^a
	All Patients		TNBC		Non-TNBC				
	No.	%	No.	%	No.	%			
FAC†/FEC‡/AC§ (n = 308)	25	8	14	20	11	5	0.15	0.06 to 0.25	.0001
TFAC¶/TFEC‡ (n = 588)	112	19	35	28	77	17	0.11	0.03 to 0.20	.0072
Single-agent taxane# (n = 58)	3	5	2	12	1	2	0.10	-0.07 to 0.27	.82
Other** (n = 164)	15	9	6	14	9	7	0.06	-0.05 to 0.18	.33
Total (n = 1,118)	163	15	57	22	98	11	1.53	1.03 to 2.26	.034

Abbreviations: pCR, pathologic complete response; TNBC, triple-negative breast cancer; FAC, fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide; FEC, fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide; AC, doxorubicin and cyclophosphamide; TFAC, weekly/once every 3 weeks paclitaxel/docetaxel followed by fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide; TFEC, weekly/once every 3 weeks paclitaxel/docetaxel followed by fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide.

^aCox regression model.

†n = 241; mean cycles = 4.3 (range, 2-8).

‡n = 15; mean cycles = 5.3 (range, 4.0-6.0).

§n = 52; mean cycles = 4.1 (range 2.0-15.0).

¶n = 471; mean cycles = 11.7 (range, 3.0-18.0).

#n = 117; mean cycles = 13.9 (range, 4.0-18.0).

*Single-agent paclitaxel, weekly/three-weekly paclitaxel (n = 40), 6.6 (2.0-20.0); single-agent docetaxel, weekly/three-weekly docetaxel (n = 18), 4.6 (3.0-12.0).

**Other, other regimens, n = 164, mean cycles = 6.1 (range, 2.0-18.0).

Tableau 1 : comparaison de la pCR en fonction du statut TN et de la chimiothérapie utilisée d'après l'étude de Liedtke et al (18).

Dans cette même étude, les auteurs ont comparé les paramètres de survie et de rechute entre les CSTN et les CSNTN (cf figure 17) : le graphique A montre un taux de survie sans progression plus bas dans les CSTN, les graphiques B et C montrent un risque plus important de rechute dans les CSTN durant les 3 premières années puis une stabilisation du risque, le graphique D montre une survie nettement moins importante dans le groupe des CSTN, les graphiques E et F montrent un risque plus important de décès durant les 5 premières années puis une stabilisation.

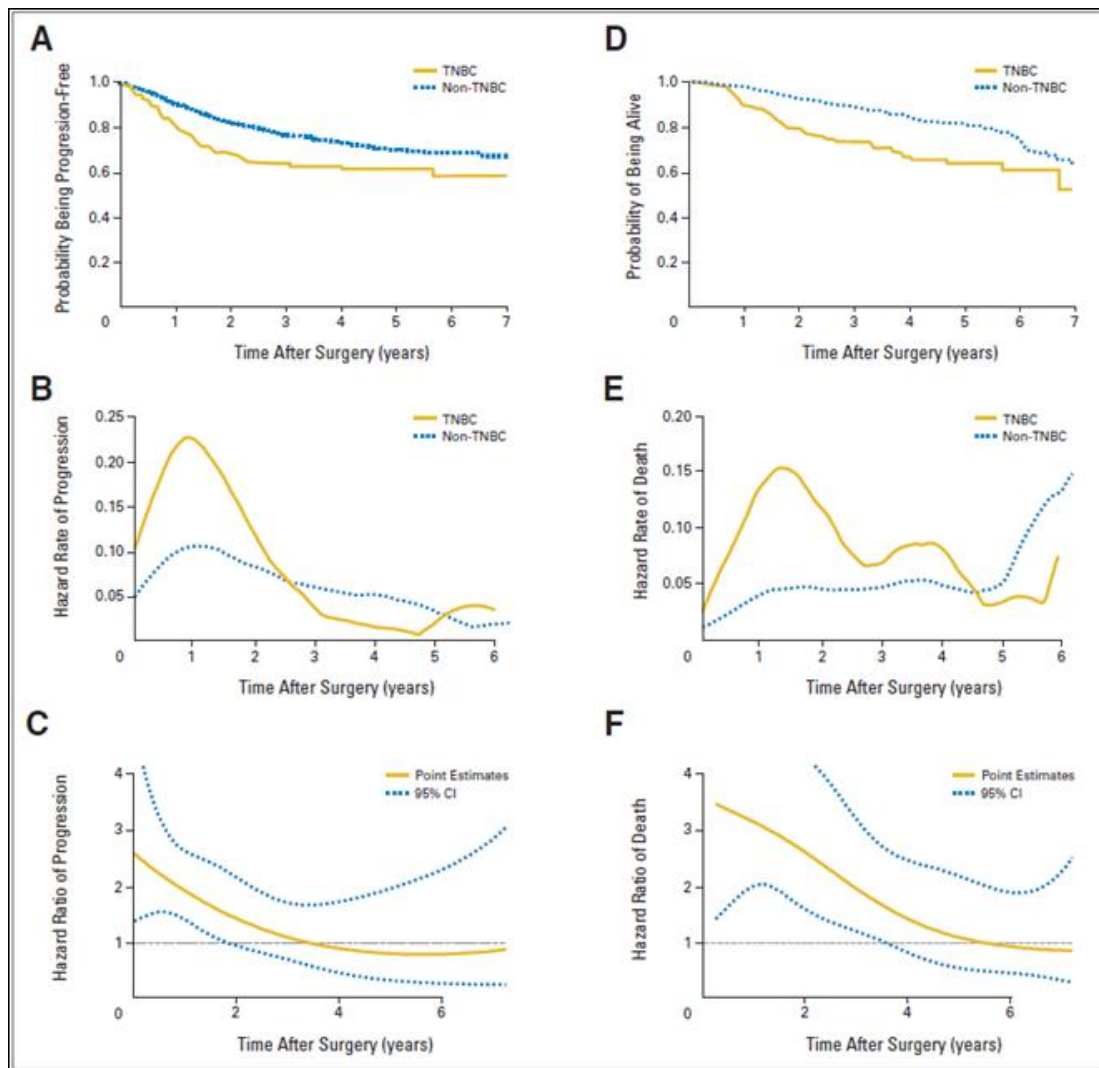


Figure 20 : comparaison des paramètres de survie sans progression et de survie entre les CSTN et non CSTN d'après l'étude de Liedtke et al (18).

b) Classification spécifique des CSTN

Il est très difficile de classer et caractériser les CSTN, car ils peuvent être de différents types histologiques et profils moléculaires, même si ce sont en majorité des CCI au niveau histologique et des tumeurs de sous-type basal-like au niveau moléculaire. Du fait de cette complexité, on peut constater que les CSTN n'apparaissent pas dans la dernière classification de l'OMS des cancers du sein publiée en 2012. La figure 20 illustre bien cette hétérogénéité au sein des CSTN.

1. Classification histologique

Au niveau histologique on retrouve d'autres types que le CCI (qui représentent près de 85% des cas), comme les carcinomes adénoïdes kystiques ou les carcinomes sécrétants qui sont plutôt de bon pronostic, au contraire des carcinomes métaplasiques et apocrines qui eux sont plus agressifs.

La figure ci-dessous est tirée d'un article de Stacoffe et al (2017), on y retrouve une correspondance schématique entre le type histologique, le profil génétique et le profil immunohistochimique des CSTN. Une valeur pronostique est également présente sur cette figure en fonction du type histologique (la couleur rouge correspond à un mauvais pronostic, la couleur jaune correspond à un pronostic intermédiaire et la couleur verte correspond à un bon pronostic). On constate que les CSTN se rapportent principalement au sous-type moléculaire basal-like et Claudin-low, et que selon le type histologique les pronostics ne sont pas les mêmes. On constate également qu'une partie non négligeable des CSTN sont mutés *BRCA1*.

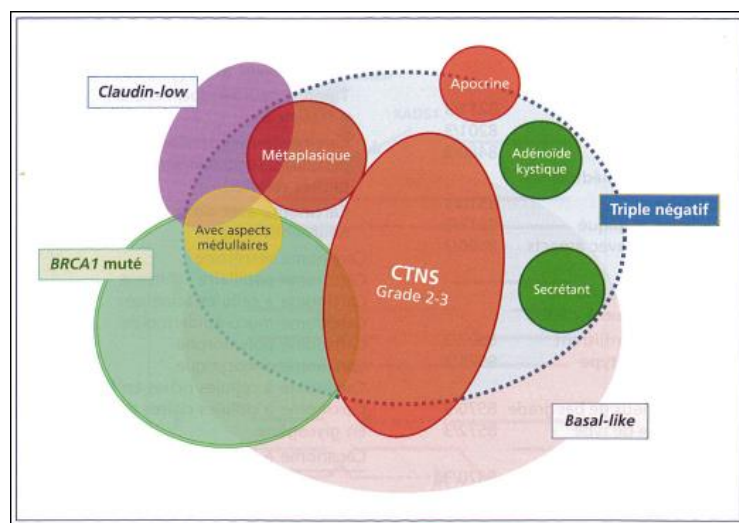


Figure 21 : Spectre des cancers du sein TN (Stacoffe et al (11)).

2. Classification immunohistochimique

On a vu qu'une tumeur du sein est dite triple négatif (TN) si elle est négative pour les RO et les RP, et qu'il n'y a pas de surexpression/amplification de HER2.

3. Classification moléculaire

Le CSTN répond à des critères IHC pour le diagnostic clinique mais avec le développement des nouvelles technologies une classification moléculaire des CSTN a vu le jour des suites de la classification moléculaire des cancers du sein de Perou et al dans les années 2000.

En Juin 2018, Fresia Pareja et Jorge S.Reis-Filho ont publié une revue tentant de faire le point sur la classification moléculaire des CSTN (19). Tout d'abord CSTN et basal like ne sont pas synonymes contrairement à ce que l'on pensait au début et on constate que 80% des CSTN sont des basal-like alors qu'environ 20%-30% des basal-like ne sont pas TN (cf figure 22)

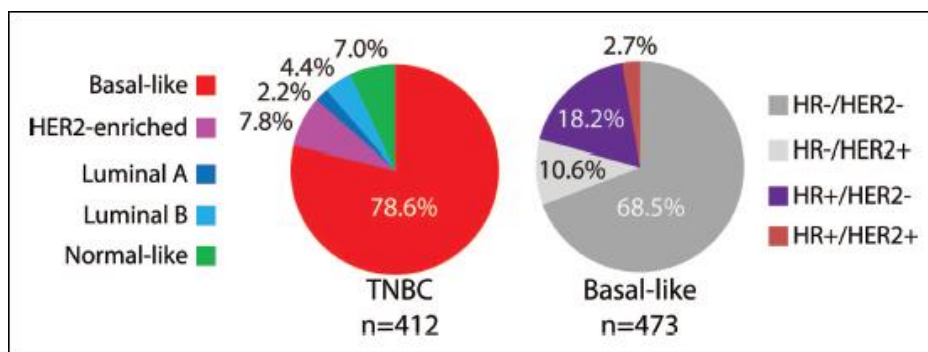


Figure 22 : Distribution des sous types moléculaire au sein des CSTN et des sous types IHC au sein des basal-like (Prat et al (20)).

6 sous-types moléculaires de CSTN ont été mis en évidence par Lehmann et al en 2011 par des études de profil d'expression génique sur 587 CSTN :

- **Basal-like 1 (BL1),**
- **Basal-like 2 (BL2),**
- **Immunomodulatory (IM),**
- **Mesenchymal(M),**
- **Mesenchymal stem-like (MSL)**
- **Luminal androgen receptor (LAR).(21)**

Ces 6 sous-types seront réduits à 4 sous-types dans les études menées par Lehmann en 2016 :

- Basal-like/immunesuppressed (BLIS),
- Basal-like/immune activated (BLIA),
- Luminal androgen receptor (LAR)
- Mesenchymal (MES)

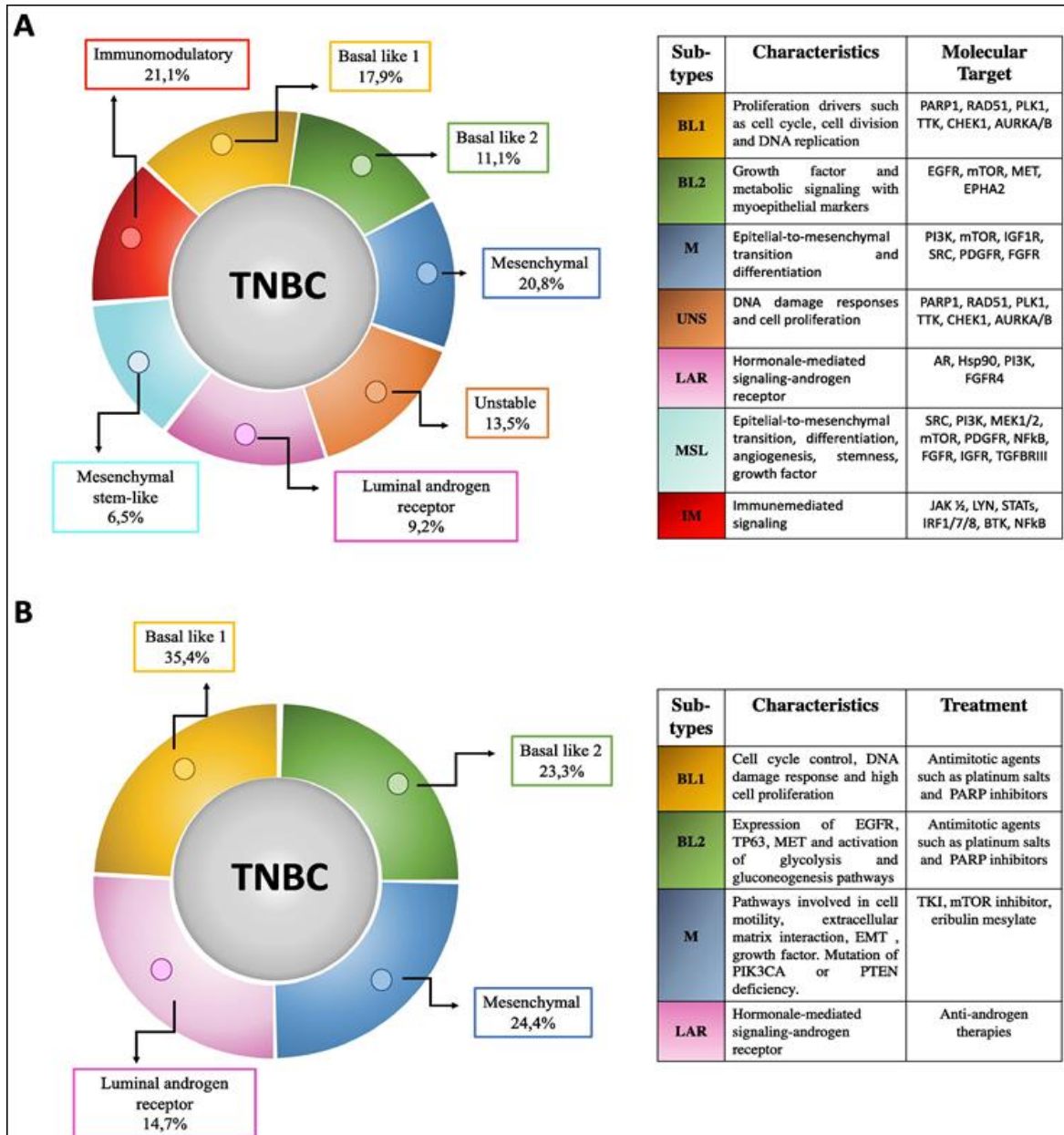


Figure 23 : Classification de Lehmann en 2011 (en haut) puis 2016 (en bas) des CSTN en sous-types moléculaire (Gerratana et al (22)).

En effet il a été établi que les sous types IM et MSL étaient plus représentatif au niveau moléculaire des lymphocytes et des cellules stromales que des cellules tumorales elles-mêmes (apport de la microdissection laser), ils ont donc été supprimés. Les principales caractéristiques de ces sous-types et leur potentielle cible thérapeutique sont représentées dans la figure 23.

D'autres études indépendantes basées sur les profils transcriptionnels ont également retrouvé ces quatre sous-types moléculaire de CSTN ce qui conforte cette classification.(23) Une étude menée par Bareche et al en 2018 (24) a cherché à déterminer les altérations génomiques qui dirigent chaque sous-type des CSTN. En s'inspirant des données produites par Lehmann et al, ils ont tenté de classer 550 échantillons et ont retenu finalement 5 sous-types stables (le basal-like 2 étant peu reproductible et spécifique, il a été reclassé dans les 5 autres sous-types les plus proches). Les différents sous-types étaient corrélés à des évolutions cliniques différentes : le type LAR était associé au plus mauvais pronostic alors que le type IM était associé au meilleur pronostic en terme de survie (ce qui pourrait être expliqué par l'infiltration lymphocytaire présente dans ces tumeurs connue pour être un marqueur prédictif d'évolution clinique favorable) (25). Ils ont également identifié de nouvelles cibles thérapeutiques en fonction des profils moléculaire des sous-types de CSTN grâce à leur étude.

Leurs résultats sont les suivants :

- **Pour le type LAR** : caractéristiques communes avec les cancers du sein de type luminal B, avec des mutations au niveau somatique principalement dans *PIK3CA*, *KMT2C*, *CDH1* et *AKT1*, ainsi qu'une implication des Récepteurs aux Androgènes (RA) ce qui explique la bonne efficacité des anti-androgène dans des études effectuées chez des souris. On retrouve également une faible expression des CDK4/6 au niveau des ARNm ce qui laisse présager une bonne efficacité des inhibiteurs CDK4/6
- **Pour le type BL1** : forte instabilité chromosomique et mutations dans *TP53*, amplification de *PIK3CA* et *AKT*, délétion hémizygote et homozygote dans les gènes de réparation de l'ADN comme *BRCA2*, *PTEN*...ce qui peut laisser penser

que ce sous-type pourrait être sensible aux antiPARP et aux inhibiteurs de PI3K-ATK

- **Pour le type M** : forte expression d'*EGFR*, *NOTCH1* et *NOTCH 3*, gènes impliqués dans les voies de l'angiogenèse qui pourraient être la cible d'un traitement
- **Pour les types IM et MSL** : signature moléculaire de type angiogénique avec pour le type IM une forte expression des gènes codant pour les « inhibitory immune checkpoint » protéines.

3. CSTN et oncogénétique

Le CSTN est présent des fortes similarités avec les cancers du sein développés dans le cadre d'une mutation du gène *BRCA1*.

Il est estimé à ce jour qu'entre 11% et 20% des CSTN portent une mutation constitutionnelle dans les gènes *BRCA1/2* avec une forte prédominance dans *BRCA1*. 60-80% des cancers du sein présentant des mutations dans *BRCA1* seraient des CSTN (26).

Le séquençage haut-débit a permis d'élargir le nombre de gènes testés notamment sur les CSTN et d'identifier de nouveaux gènes de prédisposition héréditaire au cancer du sein (dont le CSTN), notamment dans les gènes de réparation de l'ADN.

4. Traitements du CSTN

a) Traitements loco-régionaux

Les indications de chirurgie et radiothérapie obéissent aux mêmes règles que pour tous les cancers du sein mis à part la possibilité d'avoir recours plus facilement à une chimiothérapie néoadjuvante lorsque la tumeur est volumineuse afin de faciliter la chirurgie conservatrice compte-tenu de la bonne chimiosensibilité des CSTN.

b) Traitements systémiques

La chimiothérapie adjuvante est quasiment tout le temps indiquée au vu de la bonne chimiosensibilité et de l'absence d'alternatives thérapeutiques à ce jour. Il n'y a pas de données claires concernant la classe de cytotoxique à utiliser mais les anthracyclines et les

taxanes semblent être les plus efficaces. Les patientes présentant un défaut des gènes *BRCA* (mutation constitutionnelle ou somatique, méthylation du promoteur...) sembleraient particulièrement sensibles aux agents perturbant la fourche de réplication de l'ADN comme les sels de platine, la mitomycine C (antibiotique anti neoplasique), la camptothécine (inhibiteur de topoisomérase), les anthracyclines ou encore les inhibiteurs de PARP(11).

c) *Les thérapies ciblées*

Aucun traitement disponible à ce jour.

Malgré des études précliniques encourageantes, les résultats d'essais cliniques sur les thérapies ciblées chez des patientes présentant un CSTN ont été décevants et le traitement standard du CSTN reste la chimiothérapie en complément du traitement locorégional

d) *Nouvelles pistes thérapeutiques*

1. Inhibiteurs de PARP

Pour le moment aucun ne possède l'AMM en France mais les résultats semblent prometteurs notamment pour l'Olaparib (Lynparza®).

2. Les anti-angiogéniques

Les CSTN surexpriment le Vascular endothelial growth factor (VEGF) donc des thérapies antiangiogéniques ont fait l'objet d'essais cliniques mais on ne retrouve pas de résultats concluants à ce jour.

3. Les anti-EGFR

De même des résultats décevants globalement qui peuvent s'expliquer par l'absence de biomarqueurs spécifiques de réponse au traitement permettant de choisir quels cas traités.

4. Les Anti-androgène

Il se pose le même problème que pour l'EGFR, il est difficile de trouver des biomarqueurs permettant d'identifier les potentiels répondeurs aux anti-androgènes notamment dû à l'hétérogénéité qu'il existe au sein des tumeurs RA-positif.

5. Orientation thérapeutique en fonction d'un profil de sensibilité identifié

Des études récentes ont identifiées une hétérogénéité dans l'évolution des patientes malgré le mauvais pronostic global associé aux CSTN. Cette différence de réponse au sein même des CSTN met en relief la nécessité d'établir une « classification histo-moléculaire » utilisable dans le cadre du diagnostic clinique afin de pouvoir orienter le choix thérapeutique en fonction de la sensibilité potentielle de la tumeur (27). L'équipe de Chan en 2018 (28) ont tenté de définir 5 sous-types grâce à des critères relativement facile à identifier (recherche de mutation constitutionnelle, étude d'IHC, étude histologique..) pouvant déboucher sur des thérapies spécifiques. Pour l'instant ces critères ne sont relevant que pour des éventuelles inclusions dans des essais cliniques (cf figure 24) (28).

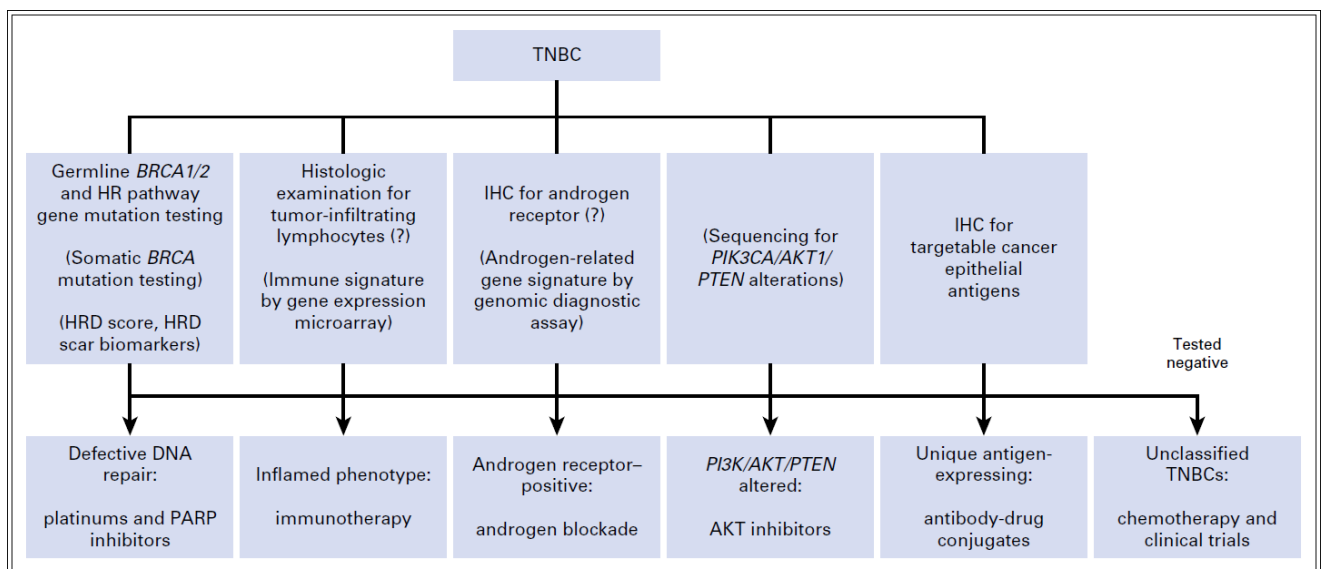


Figure 24 : Algorithme permettant de définir 5 sous-groupes « cliniques » au sein des CSTN afin de correspondre à leur sensibilité thérapeutique (Chan et al (28)) (HR=Homologous recombination, HRD= Homologous Recombination Deficiency).

Ils ont retenu 5 sous-groupes et un dernier sous-groupe correspondant aux CSTN non classés (car n'ayant pas de prise en charge spécifique proposée):

1. **Défaut dans les systèmes de réparation de l'ADN** : mutation germinale *BRCA* 1-2 ou autres gènes du système de recombinaison homologue (HR) mais aussi les « CSTN sporadiques » avec défaut de *BRCA* c'est-à-dire sans mutation germinale mais avec une déficience du système HR par mutation somatique ou par méthylation de *BRCA1/2* par exemple. Sensibilité aux platines qui endommagent l'ADN en format des liaisons inter et intra double brins. La FDA a approuvé l'utilisation des anti-PARP pour les traitement du sein métastatique avec mutation germinale de *BRCA* en janvier 2018.
2. **Tumeurs avec infiltrat immunitaire** : les puces à ADN mais aussi l'histologie ont permis de caractériser l'infiltrat immunitaire au sein des CSTN. L'immunothérapie semble être plus intéressante en première ligne que plus tard dans le parcours de soin pour ce groupe.
3. **Récepteur aux androgènes positif** : bénéfice clinique apporté par les inhibiteurs des RA chez des patientes CSTN sélectionnées avec des résultats variables sur l'efficacité.
4. **Altérations des voies moléculaires *PI3K/AKT/PTEN*** : les inhibiteurs AKT semblent les plus prometteurs en association avec une chimiothérapie néoadjuvante
5. **Présence d'un antigène épithélial potentiellement utilisable comme cible thérapeutique** : par exemple l'antigène TROP-2 est exprimé dans plus de 80% des CSTN, il est associé à un mauvais pronostic et à un profil agressif. Des anticorps anti TROP-2 ont été développés et un essai de phase 3 est en cours de recrutement après accord de la FDA.

CSTN non classifiés : chimiothérapie et inclusions dans des essais cliniques.

III. DONNEES PERSONNELLES

A. MATERIEL ET METHODES :

1. Patients

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) SA03, dont l'investigateur principal est le Dr Jean-Marc EXTRA qui est oncologue à l'IPC.

C'est une cohorte prospective multicentrique qui a inclus 310 patientes diagnostiquées d'un cancer du sein invasif non métastatique triple négatif entre 2010 et 2014. Le nombre de patients nécessaires à inclure a été évalué à 192 patientes minimum afin de pouvoir répondre aux objectifs primaires et secondaires. 310 patientes ont finalement été incluses.

2. Critères d'inclusion et d'exclusion du PHRC SA03 :

Ont été recrutés des femmes majeures ayant développé un CSTN non métastatique et n'ayant pas d'antécédents au niveau tumoral ou de pathologie sévère. Ces femmes ont eu un suivi régulier pendant 5ans (cf en annexe les critères d'inclusion et d'exclusion définis pour l'essai SA03).

3. Justification de l'essai :

« Il n'y a pas d'études exhaustives publiées sur l'incidence des mutations constitutionnelles des principaux gènes de prédisposition chez les femmes ayant un CSTN. Une telle étude permettrait de déterminer s'ils jouent un rôle dans la genèse de ce phénotype particulier si un taux de mutations constitutionnelles supérieur ou égal à 10% (probabilité seuil définie pour déclencher une analyse moléculaire en clinique) était identifié dans cette population. Ce faisant, il serait possible de préciser les gènes à tester en priorité lorsque l'on pose le diagnostic de cancer du sein triple négatif en association ou non avec les autres critères que sont l'histoire familiale, la bilatéralité et/ou de l'âge au diagnostic » (extrait du protocole SA03).

4. Objectif primaire de l'étude :

Evaluer l'incidence des mutations constitutionnelles dans les principaux gènes de prédisposition au cancer du sein (*BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN* et *PALB2*) chez des femmes ayant développé un CSTN non métastatique. C'est l'objectif principal de cette thèse.

5. Objectifs secondaires de l'étude :

Evaluation de la survie globale et sans récurrence, évaluation des facteurs de risques associés.

Déterminer le profil histologique des différentes tumeurs du sein triple négatif.

Analyser certains variants des gènes *RAD51*, *BARD1*, *CHEK2*, *BRIP1* et du système SUMO (the Small Ubiquitin-like Modifier). Du fait de l'évolution technologique, certains gènes dont l'implication clinique dans les cancers du sein est aujourd'hui écartée ne seront pas analysés, et les nouveaux gènes recommandés actuellement par les sociétés savantes comme gènes candidats seront analysés.

Evaluer le profil d'expression protéique par tissu micro-array sur le tissu tumoral et évaluer le profil d'expression génique sur tissu tumoral par puces à ADN.

6. Perspectives

« Les CSTN comme les CSB (Cancer du Sein de type Basal) forment un groupe hétérogène quant à l'expression des protéines de réparation de l'ADN, en particulier *BRCA1*, *BRCA2* et *PARP-1*, à leur réponse à la chimiothérapie et à leur évolution, et il importe d'étudier plus finement leur phénotype, au moment où de nouveaux médicaments, et en particulier les inhibiteurs de PARP, font leur apparition. Cela est d'autant plus nécessaire que les facteurs pronostiques histo-cliniques classiques et les signatures pronostiques multigéniques récemment identifiées sont peu ou pas informatives dans cette population spécifique de patientes. » (extrait du protocole SA03).

7. Données complémentaires utilisées pour l'analyse des résultats

a) Données récupérées auprès du centre investigateur

Il a été récupéré auprès du Département de la Recherche Clinique et de l'Innovation (DRCI) les données globales (incluant des données cliniques, histologiques et thérapeutiques) des patientes incluses dans l'essai. Il a également été récupéré auprès de la DRCI les données individuelles des patientes en ce qui concerne le grade de la tumeur, le stade TNM et le type histologique ainsi que les données en termes de survie et de rechute disponible à ce jour.

b) Données récupérées pour l'analyse des antécédents familiaux dans les dossiers cliniques des patientes incluses

Pour ce qui est des antécédents familiaux, les arbres disponibles dans les dossiers cliniques des patientes ont été analysés. Les patientes ont été séparées en 2 catégories pour l'analyse des patients sur les gènes *BRCA1* et *BRCA2* :

- **histoire familiale positive** : présence d'un cancer du sein ou de l'ovaire au 1^{er} ou 2^{ème} degré
- **histoire familiale négative** : les autres cas

Lorsque l'arbre n'était pas informatif, il a été noté un commentaire (par exemple pas d'informations rapportées pour une branche de l'arbre, ou une population essentiellement composée d'hommes). L'âge le plus jeune du cancer du sein dans chaque famille a également été répertorié. Les autres cancers pouvant être éventuellement intégrer dans un syndrome de prédisposition ont été notés. Une modélisation par le score de Manchester3 a été faite pour chaque patiente, permettant d'estimer la probabilité de retrouver une mutation dans les gènes *BRCA* en fonction de la disposition familiale et des cancers développés dans la famille.

B. ANALYSE DES ECHANTILLONS

Les échantillons ont été traités selon les protocoles utilisés en routine dans le laboratoire d'oncogénétique moléculaire de l'IPC. L'analyse primaire des gènes *BRCA1* et *BRCA2* a été faite par technique Sanger et MLPA. Pour les autres gènes, les échantillons ont été traités en suivant le protocole utilisé pour le NGS dans le laboratoire d'oncogénétique moléculaire de l'IPC (cf protocole NGS détaillé en annexe).

27 gènes vont être analysés au total dont

- **13 « gènes cliniques » du panel GGC sein-ovaire :**
BRCA1;BRCA2;PALB2;MLH1;MSH2;MSH6;PMS2;PMS2CL;EPCAM ; PTEN ; TP53;CDH1 ; RAD51C;RAD51D
- **11 « gènes candidats » appartenant au panel issu du protocole TUMOSPEC,** visant à évaluer l'utilité clinique de l'identification d'une mutation constitutionnelle dans un gène de prédisposition au cancer du sein ou de l'ovaire autre que *BRCA1* et *BRCA2* :
ATM;BARD1;BRIP1;CHEK2;FAM175A;MRE11;NBN;PIK3CA;RAD50;XRCC2
- **3 « gènes de prédisposition aux cancers digestifs avec polypose »** (car faisant partie du panel) :
APC; MUTYH ; STK11

Chaque série est composée de 45 échantillons patients, 2 traceurs servant de témoin positif et un témoin négatif (H2O).

Les gènes impliqués dans les systèmes de réparation des cassures double-brin par recombinaison homologue (comme *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD50*, *RAD51*, *PALB2*, *BARD1*, *BRIP1*, *ATM*) ont été étudiés car on voudrait déterminer si un défaut dans un ce de ces gènes pourrait prédire l'évolution de la maladie, la sensibilité à certaines chimiothérapie et aux anti-PARP dans la même mesure que les mutations dans les gènes *BRCA*.

Une première partie de mon travail de thèse a été d'analyser l'incidence des mutations constitutionnelles dans les gènes *BRCA1* et *BRCA2*, et de récupérer des informations

cliniques et histologiques afin de pouvoir comparer les effectifs mutés *BRCA* et les non-mutés. Cette première partie concerne 285 patientes incluses pour le moment.

Une deuxième partie de mon travail consistera à analyser les variants retrouvés dans les gènes autres que *BRCA* lorsque tous les résultats techniques seront disponibles.

C. RESULTATS

A ce jour, nous disposons des résultats sur les analyses des gènes *BRCA1* et *BRCA2* en constitutionnel pour 285 patientes incluses dans l'essai SA03. Donc hormis les données globales en annexe qui portent sur les 310 patientes incluses, la totalité des chiffres ci-dessous portent sur les 285 patientes pour lesquelles les résultats de *BRCA1* et *BRCA2* sont disponibles à ce jour.

Prévalence des mutation dans les gènes *BRCA1* et *BRCA2*

Il a été identifié une mutation constitutionnelle dans les gènes *BRCA1* et *BRCA2* chez 40/285 patientes (14.1%) dont 28 dans *BRCA1* (9.8%) et 12 dans *BRCA2* (4.2%).

Prévalence par type de mutation

Il a été retrouvé 78.6% de mutations ponctuelles et 21.4% de RGT dans le gène *BRCA1*. Seules des mutations ponctuelles ont été identifiées dans le gène *BRCA2*.

A noter que pour le gène *BRCA1* la mutation récurrente juive ashkenaze (c.68_69delAG, p.Glu23Valfs*17) a été retrouvée une fois et que la mutation récurrente de l'Est de l'Europe (c.5266dupC, p.Gln1756Profs*74) a été retrouvée 4 fois.

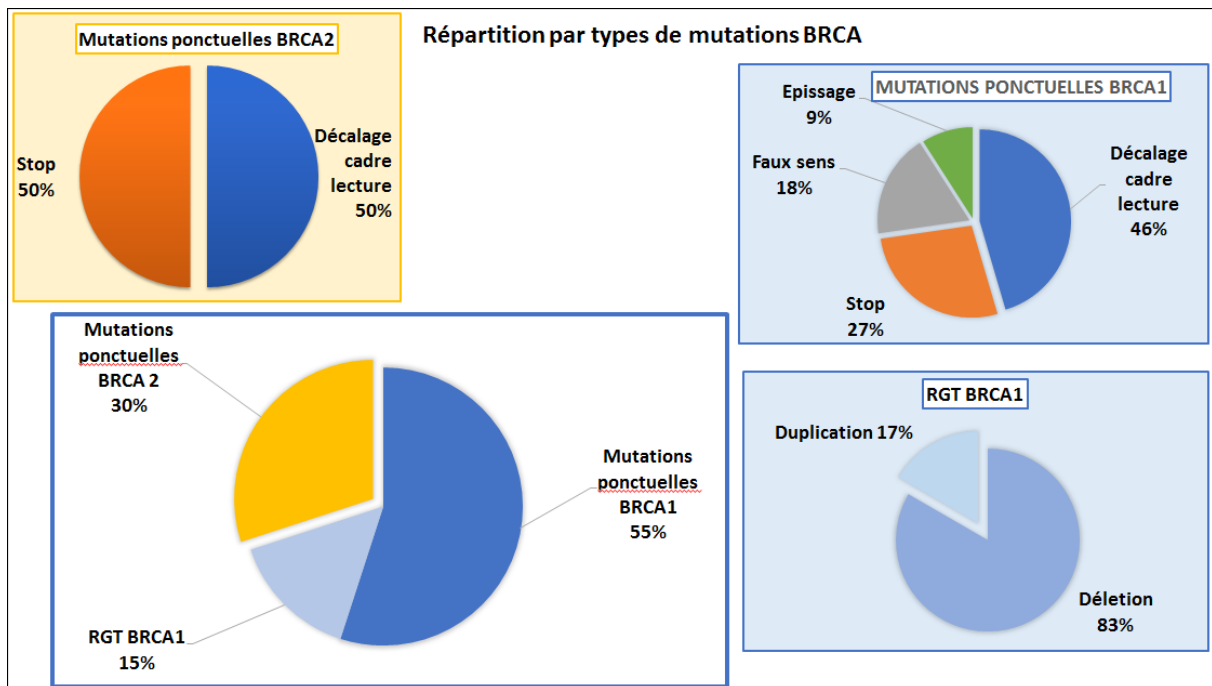


Figure 25 : Répartition des mutations retrouvées dans les gènes BRCA1/BRCA2 en fonction du gène et du type.

Age au diagnostic

La moyenne d'âge au diagnostic était de 51,6 ans ; l'âge le plus jeune étant 24 ans et le plus tardif 86 ans.

La moyenne d'âge pour les femmes non mutées *BRCA* était de 52.7 ans contre 45,9 ans chez les mutées *BRCA* ce qui constitue une différence significative. Une différence significative concernant l'âge au diagnostic a également été mise en évidence entre les mutées *BRCA1* (moyenne d'âge à 41.5 ans) et les mutées *BRCA2* (moyenne d'âge à 55.3 ans) (cf tableau 2).

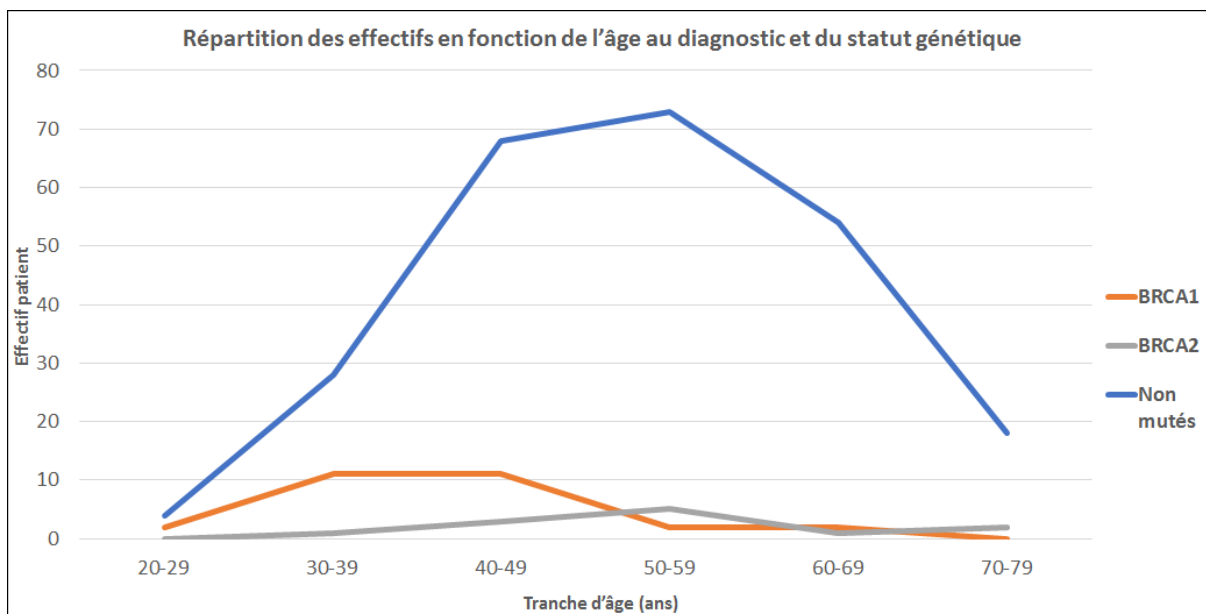


Figure 26 : Répartition des effectifs en fonction de l'âge au diagnostic et du statut génétique.

	Non muté N=245	BRCA1 et / ou BRCA2 n=40	Mutées vs sporadiques	BRCA1 n=28	BRCA2 n=12	BRCA1 vs BRCA2
Age moyen au diagnostic du cancer du sein TN						
Age moyen - Bornes	52,7 ans (24-86)	46,9 ans (29-74)	<i>p = 0.003</i>	43,3 ans (29-68)	55,3 ans (36-74)	<i>p = 0.001</i>
Ecart type	11,3	11,5		10	10,3	
Médiane	51 ans	45 ans		40,5 ans	56,5 ans	
Moyenne d'âge du cancer du sein le plus précoce dans la famille						
Age moyen	49,4 ans	40,9 ans		37,1 ans	49,8 ans	
Médiane	48 ans	40 ans		38 ans	52 ans	
Modélisation par Manchester 3						
Score de Manchester 3 (%)	16,8%	31,5%		35,5%	22,6%	
Arbres						
Pas d'histoire familiale	175 (71.4%)	15 (37.5%)		10 (35.7%)	5 (41.7%)	
Dont arbres non informatifs	39 (22.3%)	9 (60%)	OR = 4.2 <i>p = 0.0005</i>	6 (60%)	3 (60%)	OR = 1.1 <i>p = > 0.99</i>
Histoire familiale	70 (28.6%)	25 (62.5%)		18 (64.3%)	7 (58.3%)	

Tableau 2 : Comparaison des effectifs en termes d'âge, du score Manchester 3 et des antécédents familiaux.

Prévalence des mutations par catégories d'âge au diagnostic

On constate un taux de mutation dans les gènes *BRCA* $\geq 30\%$ chez les moins de 40 ans avec une très grande majorité de mutation dans *BRCA1*. Avant 50 ans le pourcentage de mutations identifiées avec ou sans histoire familiale reste bien supérieur au seuil de 10 %, qui est retenu pour prescrire une recherche de mutation constitutionnelle dans les gènes *BRCA*.

75% des mutations identifiées dans le gène *BRCA1* au niveau constitutionnel l'ont été chez des patientes <50 ans. 67% des mutations identifiées dans *BRCA2* au niveau constitutionnel l'ont été chez des patientes ayant entre 40 et 60 ans et presque la moitié d'entre elles avaient entre 50 et 59 ans (5/12= 42%).

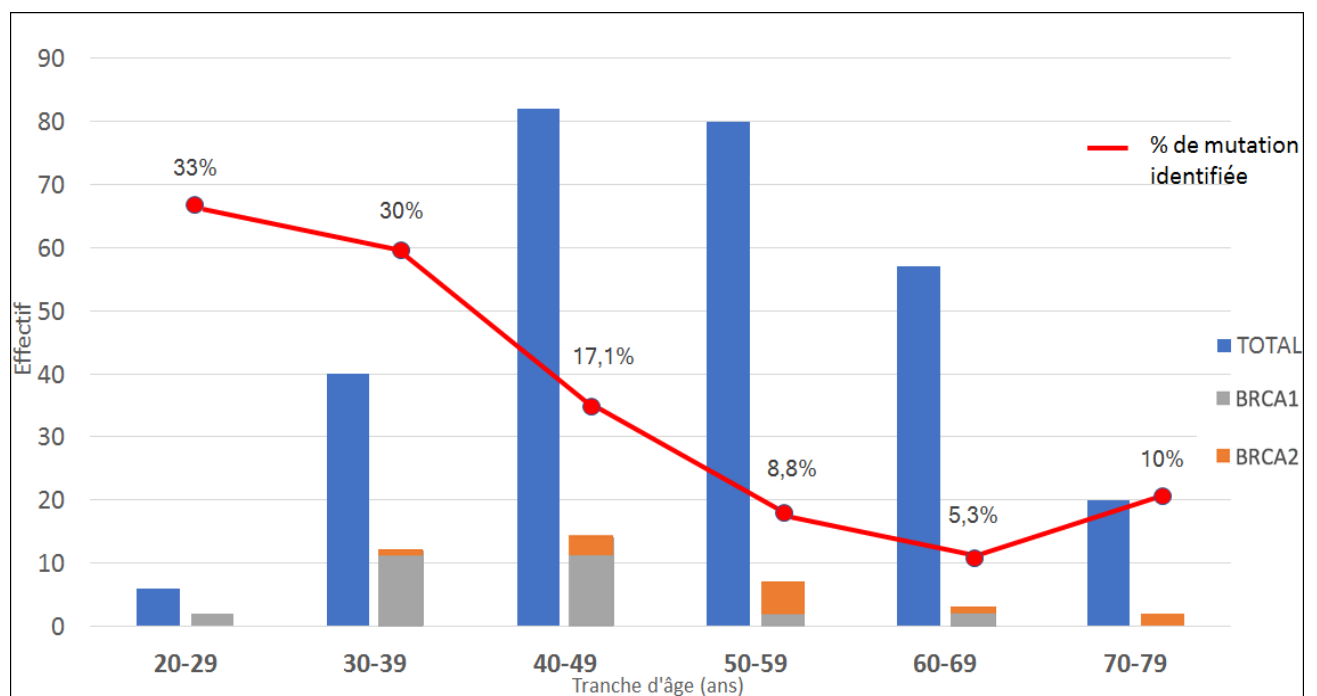


Figure 27 : Répartition des mutations identifiées dans les gènes *BRCA1/BRCA2* et courbe de % de mutations détectées dans les gènes *BRCA1/BRCA2* par tranche d'âge.

Antécédents familiaux

On retrouve une histoire familiale positive dans 62.5% des cas chez les mutés et dans 28.6% des cas chez les non mutés (différence significative).

Il semblerait, malgré les faibles effectifs, qu'il y ait moins d'histoires familiales positives rapportées au sein des mutés *BRCA2* par rapport aux mutés *BRCA1*.

Modélisation par Manchester 3

On retrouve une moyenne du score calculé par le Manchester3 de 31.5% chez les mutés *BRCA* contre 16.8% chez les non mutés.

Types histologiques

On a retrouvé une grande majorité de CCI (93.3%); les autres types retrouvés étaient 5 carcinomes lobulaires, 3 carcinomes métaplasiques, 5 carcinomes médullaires et 6 autres types (type apocrine, épidermoïde...).

Chez les patientes porteuses d'une mutation constitutionnelle dans les gènes *BRCA* 97.5% des tumeurs étaient des CCI.

92.7% des tumeurs étaient de type CCI chez les non mutés (cf tableau 3).

Grade SBR au diagnostic des cancers

79.7% des CSTN étaient de grade 3 contre 14.7% de grade 2 (aucun grade 1 n'a été retrouvé).

Chez les non-mutés *BRCA* 80.8% des tumeurs étaient de grade 3 contre 72.5% chez les mutées *BRCA* (différence non significative). A noter pas de différence significative entre les grades des tumeurs mutées *BRCA1* et *BRCA2* (cf tableau 3).

Stade au diagnostic des cancers

11.3% des CSTN présentaient un stade tumoral $\geq T3$ avec une distribution quasi similaire entre les mutés (10%) et les non mutés (11.5%).

25.3% des CSTN présentait un envahissement ganglionnaire ($\geq N1$) avec une différence notable entre les non-mutés (23.3%) et les mutés (37.5%) (cf tableau 3).

Récidive de cancer du sein homo ou controlatéral

C'est une information difficile à récupérer à partir des arbres généalogiques car ils ne sont pas forcément mis à jour s'il n'y a pas de nouvelle consultation d'oncogénétique au sein de l'IPC. Ce critère n'a donc pas été analysé.

	Non muté N=245	BRCA1 et / ou BRCA2 n=40	Mutées vs sporadiques	BRCA1 n=28	BRCA2 n=12	BRCA1 vs BRCA2
Histologie						
CSTN	227 (92,7%)	39 (97,5%)	OR = 0.33 p = 0.44	27 (97,5%)	12 (100,0%)	-
Autres	18 (7,3)	1 (2,5%)		1 (2,5%)	0 (0%)	
Grade SBR						
1 et 2	35 (14,3%)	7 (17,5%)	OR = 0.73 p = 0.64	4 (14,3%)	3 (25,0%)	OR = 0.42 p = 0.58
3	198 (80,8%)	29 (72,5%)		22 (78,6%)	7 (58,3%)	
Non connu	12 (4,9%)	4 (10,0%)		2 (7,1)	2 (16,7%)	
T						
≤T2	200 (81,6%)	33 (82,5%)	OR = 0.95 p = > 0.99	22 (78,6%)	11 (91,7%)	OR = 0.66 p = > 0.99
≥T3	28 (11,5%)	4 (10,0%)		3 (10,7%)	1 (8,3%)	
Non connu	17 (6,9%)	3 (7,5%)		3 (10,7%)	0 (0%)	
N						
Négatif	160 (65,3%)	20 (50,0%)	OR = 2.1 p = 0.08	14 (50,0%)	6 (50,0%)	OR = 1.56 p = 0.79
Positif	57 (23,3%)	15 (37,5%)		9 (32,1%)	6 (50,0%)	
Non connu	28 (11,4%)	5 (12,5%)		5 (17,9%)	0 (0%)	

Tableau 3 : Caractéristiques histologiques et stades des CSTN selon statut mutationnel.

Données de survie

30/285 patientes (10.5%) sont décédées durant le suivi avec une moyenne de survie à 34.5 mois et une médiane de 29.9 mois chez ces patientes. Le décès le plus précoce est apparu au bout de 15.5 mois et le plus tardif à 67.8 mois.

5/30 patientes (16.7%) présentaient une mutation dans les gènes *BRCA* (3/5 dans *BRCA1* (60%) contre 2/5 dans *BRCA2* (40%)). La moyenne de survie est plus élevée chez les mutées *BRCA* 42.5 mois (médiane à 40.2 mois) que chez le non mutées *BRCA* 32.9 mois (médiane à 28.4 mois) mais cette différence n'est pas significative (cf tableau 4). On ne retrouve pas de différence significative non plus en ce qui concerne le grade ou le stade TNM chez les patientes décédées selon qu'elles soient mutées ou non mutées *BRCA* (cf tableau 4). Ces chiffres seront à recalculer lorsque nous disposerons de toutes les informations de suivi à 5 ans pour toutes les patientes.

Données de rechute

44/285 patientes (13.3%) ont fait une rechute durant le suivi avec une moyenne de rechute à 27.1 mois et une médiane à 23.3 mois (à noter 6 données manquantes sur la date de la rechute sur les 38 patientes ayant rechuté). La rechute la plus précoce est apparue au bout de 6 mois et la plus tardive au bout de 63.9 mois.

6/38 patientes (15.8%) présentaient une mutation dans les gènes *BRCA* (4/6 dans *BRCA1* (66.6%) contre 2/6 dans *BRCA2* (33.4%)). On ne note pas de différence significative entre le taux de rechute des patientes non mutées *BRCA* 15.5% et les patientes mutées *BRCA* 15%.

Ces chiffres seront à recalculer lorsque nous disposerons de toutes les informations de suivi à 5 ans pour toutes les patientes (possibilité de patientes ayant rechuté pour lesquelles nous n'avons pas l'information pour le moment).

	Non muté N=245	BRCA1 et / ou BRCA2 n=40	Mutées vs sporadiques	BRCA1 n=28	BRCA2 n=12	BRCA1 vs BRCA2
Décès						
Nb décès patient	33 (13,5%)	5 (12,5%)	OR = 1.09 <i>p</i> = > 0.99	3 (10,7%)	2 (16,7%)	OR = 1.04 <i>p</i> = 0.95
Nb patient en vie	212 (86,5%)	35 (87,5%)		25 (89,3%)	10 (83,3%)	
Survie moyenne (mois)	32,9 [15,5-62,3]	42,5 [25,5-67,8]	<i>p</i> = 0.16	45,2 [27,6-67,8]	37,6 [25,5-49,8]	<i>p</i> = 0.62
Ecart type (mois)	14	15,6		16,8	12,1	
Survie médiane (mois)	28,4	40,2		40,2	37,6	
Rechute						
Rechute patient	38 (15,5%)	6 (15,0%)	OR = 1.04 <i>p</i> = > 0.99	4 (14,3%)	2 (16,7%)	OR = 0.83 <i>p</i> = > 0.99
Absence de rechute	207 (84,5%)	34 (85,0%)		24 (85,7%)	10 (83,3%)	
Délai de rechute moyen (mois)	26,6 (4 données manquantes) [9,8-58,8]	30,9 (2 données manquantes) [6-63,5]	<i>p</i> = 0.5	39,2 (1 donnée manquante) [19,2-63,9]	6 (1 donnée manquante) [6]	<i>p</i> = 0.07
Ecart type	13,1	21,5		18,6	0	

Tableau 4 : Données de survie et de rechute selon statut mutationnel *BRCA*.

	Non muté	BRCA1 et / ou BRCA2	Mutées vs sporadiques
Décès des patients			
Décès patient	n = 25	n = 5	
Grades SBR			
1 et 2	3 (12,0%)	2 (40,0%)	OR = 0.16 <i>p = 0.31</i>
3	19 (76,0%)	2 (40,0%)	
Non connu	3 (12,0%)	1 (20,0%)	
T			
≤T2	15 (60%)	2 (40,0%)	OR = 1.88 <i>p = 0.95</i>
≥T3	8 (32,0%)	2 (40,0%)	
Non connu	2 (8,0%)	1 (20,0%)	
N			
Négatif	8 (32,0%)	2 (40,0%)	OR = 0.5 <i>p = 0.90</i>
Positif	16 (64,0%)	2 (40,0%)	
Non connu	1 (4,0%)	1 (20,0%)	
Rechutes des patients			
Rechutes patients	n = 38	n = 6	
Grades SBR			
1 et 2	4 (10,5%)	3 (50,0%)	OR = 0.01 <i>p = 0.03</i>
3	29 (76,3%)	1 (16,7%)	
Non connu	5 (13,2%)	2 (33,3%)	
T			
≤T2	23 (60,5%)	0 (0%)	-
≥T3	11 (28,9%)	3 (50,0%)	
Non connu	4 (10,5%)	3 (50,0%)	
N			
Négatif	16 (42,1%)	1 (16,7%)	OR = 1.88 <i>p = > 0.99</i>
Positif	17 (44,7%)	2 (33,3%)	
Non connu	5 (13,2%)	3 (50,0%)	

Tableau 5 : Comparaison données de survie et de rechute entre les mutées *BRCA* et les non mutées.

IV. SYNTHÈSE/DISCUSSION

A. SYNTHÈSE

Prévalence mutations constitutionnelles dans les gènes *BRCA1* et *BRCA2*

Il a été identifié une mutation constitutionnelle chez 40/285 patientes (14.1%) sur les 285 patientes incluses dans SA03 dont 28 dans *BRCA1* (9.8%) et 12 dans *BRCA2* (4.2%).

Shimelis et al (2018), dans une étude en Californie entre 2012 et 2016 ont testé un panel de 21 gènes sur 8753 CSTN (=cohorte clinique) et un panel de 17 gènes sur 2148 patients CSTN (=cohorte TNBCC) (29). Il a été retrouvé :

- Dans la cohorte clinique : 8.4% de mutations dans les gènes *BRCA1* (6%) et *BRCA2* (2.4%)
- Dans la cohorte TNBCC : 10.4% de mutations dans *BRCA1* (7.7%) et *BRCA2* (2.7%)

En 2015, Couch et al ont évalué la fréquence des mutations dans 17 gènes de prédisposition au cancer du sein parmi 122 gènes impliqués dans la réparation de l'ADN chez plus de 1800 patientes ayant développé un CSTN (indépendamment de l'histoire familiale et de l'âge au diagnostic) (14).

Leurs résultats sont les suivants : 11.6% de mutations dans les gènes *BRCA1* (8.6%) et *BRCA2* (2.7%).

En 2018 Engel et al, ont analysés les gènes *BRCA1* et *BRCA2* chez 802 patientes ayant développé un CSTN unilatéral sans histoire familiale, ils ont retrouvé 15.8% de mutations dans les gènes *BRCA1* (14.7%) et *BRCA2* (1.1%). De par leur sélection de patientes sans antécédents familiaux on aurait pu s'attendre à trouver un taux plus important de mutation dans *BRCA2* si on se fie aux résultats dans le cadre de l'essai SA03 avec le faible pourcentage d'histoire familiale positive relevé chez les mutées *BRCA2*. Leur taux élevé de mutations dans les gènes *BRCA* s'expliquent peut-être par un effectif global plus jeune comparativement aux autres études.

	SA03	Shimelis et al		Couch et al	Engel et al
		clinical cohort	TNBCC cohort		
effectif	285	8753	2148	1824	802
non mutés BRCA (%)	85.9	85.6	85.6	85.4	84.2
mutés BRCA (%)	14.1	8.4	10.4	11.2	15.8
mutés BRCA 1	9.8	6	7.7	8.5	14.7
Mutés BRCA 2	4.2	2.4	2.7	2.7	1.1
Autres mutés non BRCA (%)	/	6	4	3.7	/

Tableau 6 : Récapitulatif pourcentage mutations *BRCA* dans les CSTN dans les différentes études.

En 2017 Hahnen et al, ont comparé différentes études ayant recherché des mutations constitutionnelles dans les gènes *BRCA1* et *BRCA2* dans le cadre de CSTN : le taux de détection de mutations constitutionnelles dans les gènes *BRCA* varie entre 9.4% et 18.2% au sein des différentes études. On peut noter que les chiffres de détection les plus bas sont associés à des études n'analysant pas les RGT.

TNBC cases (unselected), n	Proportion <i>BRCA1</i> positive, n (%)	Proportion <i>BRCA2</i> positive, n (%)	Proportion <i>BRCA1/2</i> positive, n (%)	Reference
77	11 (14.3)	3 (3.9)	14 (18.2)	[29]
199	13 (6.5)	8 (4.0)	21 (10.6)	[30]
990	71 (7.2) ^a	22 (2.2) ^a	93 (9.4) ^a	[35]
1,824	155 (8.5) ^a	49 (2.7) ^a	204 (11.2) ^a	[26]
291	43 (14.7)	7 (2.4)	50 (17.1)	[36]
105	13 (12.4)	2 (1.9)	15 (14.3)	[37]
774	44 (5.7) ^a	30 (3.9) ^a	74 (9.9) ^a	[31]
207	23 (11.1) ^b	9 (4.3) ^b	32 (15.5) ^b	[27]

^aStudy does not cover larger deletions/duplications (copy number variations, CNVs) within the *BRCA1/2* genes.

^bOnly a subset of patients was screened for CNVs. According to a GeparSixto investigation, pathogenic CNVs in the *BRCA1/2* genes were found in approximately 1.7% of unselected TNBC patients [36].

Tableau 7 : récapitulatif des proportions de mutés BRCA retrouvées dans différentes études par Hahnen et al (30).

Nos résultats sur la prévalence de mutations constitutionnelles dans les gènes *BRCA1* et *BRCA2* sont donc en accord avec les résultats trouvés dans la littérature.

Prévalence par type de mutation

En ce qui concerne le gène *BRCA 1* : nous avons retrouvée 85.2% de mutations de type tronquante (décalage du cadre de lecture, codon stop, épissage) et 14.8% de faux sens. Dans l'étude de Couch et al, 83.6% des mutations ponctuelles étaient de type tronquante et 6.4% de type faux sens.

En ce qui concerne le gène *BRCA2* : nous avons trouvé 100% de mutations de type tronquante, alors que Couch et al ont en trouvé 89.2% et 10.2% de faux sens ce qui s'explique sûrement par leur effectif 6 fois supérieur au nôtre.

Nous n'avons pas de données concernant le pourcentage de RGT identifié dans le cadre des analyses moléculaires sur les CSTN afin de les comparer à celui retrouvé dans SA03.

Afin de déterminer si les mutations identifiées dans le cadre des CSTN présentaient des particularités par rapport aux autres types de cancer du sein, nous avons fait une analyse de la base de données du laboratoire d'oncogénétique moléculaire de l'IPC comprenant des analyses pour tout type de cancers du sein confondu.

Concernant la répartition *BRCA1* et *BRCA2* dans la base de données, le pourcentage est quasiment égal entre les deux gènes avec 52% dans *BRCA1* et 48% dans *BRCA2*. Dans notre étude, on a identifié deux fois plus de mutations dans le gène *BRCA1* que dans le gène *BRCA2*, ce qui confirme bien le lien particulier en CSTN et mutation *BRCA1*.

Concernant le gène *BRCA1*, nous avons identifié deux fois plus de RGT dans le cadre de SA03 avec 21.4% de RGT identifié contre 10% dans la base de données. La répartition entre délétion et duplication au sein des RGT est par ailleurs identique. Pour les mutations ponctuelles dans le gène *BRCA1*, nous en avons identifié 78.6% dans SA03 contre près de 90% dans la base de données, sans différence significative entre les distributions par type de mutation.

Concernant le gène *BRCA2*, nous n'avons pas identifié de RGT dans le cadre de SA03 alors que nous avons retrouvé 1.7% de RGT dans la base de données. Pour les mutations ponctuelles, il a été identifié dans la moitié des cas la formation d'un codon STOP et dans l'autre moitié des cas une mutation aboutissant à un décalage du cadre de lecture dans le cadre SA03. Dans la base de données nous retrouvons dans environ 50% des cas un décalage du cadre de lecture (52.9%), un STOP dans 36.7% des cas, une mutation liée à l'épissage dans 6.3% des cas, une mutation faux-sens dans 3.2% des cas.

A noter qu'on retrouve le même pourcentage de mutations de type tronquante dans l'étude SA03 que dans la base de données locale.

Age au diagnostic

La moyenne d'âge au diagnostic des CSTN était de 51,6 ans ; l'âge le plus jeune étant 24 ans et le plus tardif de 86 ans.

Dans l'étude de Couch et al, la moyenne d'âge était de 52 ans alors que dans l'étude de Shimelis et al la moyenne d'âge était de 49.8 ans.

La moyenne d'âge pour les femmes mutées *BRCA* était de 45,9 ans, avec une forte disparité entre les mutées *BRCA1* (moyenne d'âge à 41.5 ans) et les mutées *BRCA2* (moyenne d'âge à 55.3 ans) dans l'essai SA03.

Dans l'étude de Couch et al, la moyenne d'âge pour les mutées *BRCA* était de 45 ans (44 ans pour les mutées *BRCA1* et 47 ans pour les mutées *BRCA2*) contre 48 ans pour les mutées non *BRCA1-2*. Dans l'étude de Shimelis et al les moyennes d'âge ne sont pas rapportées mais un âge plus jeune est notifié pour les mutées *BRCA1* par rapport aux mutées dans les autres gènes.

	SA03	Shimelis et al		Couch et al	Engel et al
		clinal cohort	TNBCC cohort		
moyenne âge étude (ans)	51.6	49.8	50.8	52	40.1
moyenne âge non mutés <i>BRCA</i> (ans)	52.7	/		48	42
moyenne âge mutés <i>BRCA</i> (ans)	45.9	/		45	/
moyenne âge mutés <i>BRCA1</i> (ans)	41.5	/		44	34
moyenne âge mutés <i>BRCA2</i> (ans)	55.3	/		47	47

Tableau 8 : Comparaison moyenne âge au diagnostic des CSTN dans les différentes études.

Engel et al, dans leur étude retrouvait une moyenne d'âge pour les non mutées à 42 ans (34 ans pour les mutées *BRCA1* et 47 ans pour les mutées *BRCA2*). Une des explications possible est que la population sélectionnée dans cette étude apparaît plus jeune comparativement aux autres études présentes dans la littérature. On voit cependant que la différence d'âge entre les mutées *BRCA1* et *BRCA2* est quasiment identique à celle de notre étude, ce qui est moins évident dans l'étude de Couch et al, où la différence entre les âges mutées *BRCA1* et mutées *BRCA2* est peu importante.

Types histologiques

On a retrouvé une très grande majorité de CCI (93.3%) sans différence de distribution entre les mutées *BRCA* et les non mutées. Dans la littérature on retrouve des taux aux alentours de 85% de CCI dans les CSTN ce qui est concordant.

Grade SBR au diagnostic des CSTN

79,7% des CSTN étaient de grade SBR 3 sans différence significative entre les mutées *BRCA* et les non mutées. Ce qui est concordant avec les chiffres de la littérature puisque Couch et al retrouvaient 83% de grade 3 dans les CSTN, avec des tumeurs de plus haut grade chez les mutées que chez les non mutées. Dans une étude précédemment effectuée à l'IPC par le Dr MORETTA sur 78 cas de CSTN, il n'avait pas été relevé de différence significative quant aux grades des tumeurs entre les mutées *BRCA* et les non mutées.

Si on se base sur l'étude Dr MORETTA et notre étude fait dans le cadre de SA03, le grade SBR au diagnostic ne doit pas être pris en compte dans la décision de prescrire une recherche de mutation constitutionnelle ou non dans le cadre d'un CSTN.

Stade au diagnostic des CSTN

11.3% des CSTN présentaient un stade tumoral $\geq T3$ avec une distribution quasi similaire entre les mutées et les non mutées. Un envahissement ganglionnaire ($\geq N1$) semblent être plus souvent présent chez les mutées *BRCA* (37.5%) comparées au non mutées (23.3%) ($p=0.08$) dans le cadre de SA03. On a retrouvé plus d'envahissement ganglionnaire chez les mutées *BRCA2* (50%) que chez les mutées *BRCA1* (32.5%) mais cette différence n'est pas significative. Il faut signaler que, pour une partie de *BRCA1*, le statut ganglionnaire n'était pas précisé, et que les effectifs semblent trop petits pour tirer des conclusions à ce sujet.

En ce qui concerne la taille de la tumeur au diagnostic ; il n'est pas relevé de différence significative au sein de notre échantillon entre les mutées *BRCA* et les non mutées.

Le seul critère pour lequel la différence semble tendre vers la significativité ($p=0.08$) dans l'histoire néoplasique entre les mutées *BRCA* et les non mutées dans le cadre de l'essai SA03, est l'envahissement ganglionnaire qui paraît plus fréquent chez les mutées *BRCA* mais cela reste à confirmer sur des cohortes plus grandes. Tung et al dans une étude rétrospective sur 185 patientes ayant développé un CSTN, n'ont pas retrouvé de différence significative

concernant l'envahissement ganglionnaire entre les sujets mutées *BRCA1* et les sujets non mutées *BRCA* (31).

Données de survie

30/285 patientes (10.5%) sont décédées durant le suivi avec une moyenne de survie à 34.5 mois et une médiane de 29.9 mois. Le décès le plus précoce est apparu au bout de 15.5 mois et le plus tardif au bout de 67.8 mois. 5/30 patientes (16.7%) présentaient une mutation dans les gènes *BRCA* (3/5 dans *BRCA1* (60%) contre 2/5 dans *BRCA2* (40%)). La moyenne de survie était plus élevée chez les mutées *BRCA* 42.5 mois (médiane à 40.2 mois) que chez les non mutées 32.9 mois (médiane à 28.4 mois).

20/30 patientes décédées (66.6%) sont décédées durant les 3 premières années du suivi ce qui est concordant avec les chiffres de la littérature qui rapportent une apparition précoce des décès durant les 5 premières années dans les TN avec un pic important lors des 3 premières années. Mais ces données devront être réévaluées quand toutes les données de survie et de rechute seront disponibles à 5 ans pour toutes les patientes.

Le statut *BRCA* semble jouer un rôle dans la survie des patients même si à partir des données que nous n'avons analysé nous ne pouvons pas mettre en avant d'explication. Une analyse plus précise des traitements utilisés en fonction des génotypes des patients est une piste à explorer.

Données de rechute

38/285 patientes (13.3%) ont fait une rechute durant le suivi avec une moyenne de rechute à 27.1 mois et une médiane de 23.3 mois (6 données manquantes sur la date de la rechute sur les 38 patientes ayant rechuté). La rechute la plus précoce est apparue au bout de 6 mois et la plus tardive au bout de 63.9 mois.

6/38 patientes (15.8%) présentaient une mutation dans *BRCA* (4/6 patientes dans *BRCA1* (66.6%) contre 2/6 patientes dans *BRCA2* (33.4%). Les différences entre le pourcentage de rechute entre mutées et non mutées semblent négligeable. Ces chiffres sont concordants avec la littérature qui décrit un risque accru de rechute durant les 3 premières années (moyenne sur l'étude SA03 à 2 ans et 3 mois pour le moment). Dans notre étude 31/44 patientes (70,4%) des patientes ayant rechuté, ont rechuté durant les 3 premières années avec les données actuelles disponibles dans l'essai.

Tung et al (2014), ont comparé les sujets mutés *BRCA1* et des sujets non mutés *BRCA* en terme de rechute locale et de rechute à distance en fonction des sites métastatiques, sans qu'aucune différence significative ne soit retrouvée entre les deux groupes. Le seul paramètre qui varie de manière significative est le risque de second cancer du sein, plus élevé chez les mutées *BRCA1* (12,4%) que chez les non mutées (3,4%). Le statut *BRCA* n'apparaît donc pas relié au taux de rechute dans les CSTN mais plutôt à la récurrence, plus fréquente chez les mutées *BRCA* comparativement ce qui paraît logique vu que s'inscrivant dans le cadre d'une prédisposition héréditaire.

CSTN et histoire familiale ?

Dans 1/3 des cas des CSTN il est rapporté une histoire familiale positive (critères différents selon les études) (30), ce qui est concordant avec les chiffres de notre étude car une histoire familiale est retrouvée dans 95/285 patientes soit 33.3%.

Dans l'étude de Couch et al (2015), 50% des patients avec une mutation dans *BRCA1* avaient une histoire familiale positive pour le cancer du sein et 18% pour le cancer de l'ovaire ce qui se rapproche des 67.5% retrouvée (cancer du sein et de l'ovaire regroupés) chez les mutées *BRCA1-2* dans l'essai SA03.

Shimelis et al (2018), dans leur étude, ont retrouvé 5% de mutations chez les patientes >60ans sans antécédents familiaux. Si on prend les mêmes critères dans notre étude on retrouve un taux de 2.3% en ayant analysé seulement les gènes *BRCA1* et *BRCA2*. En ajoutant les mutations potentielles dans les autres gènes de prédisposition (qui semblent être plus représentés chez les patientes âgées) ces chiffres semblent comparables.

Pour les patientes ayant développé un CSTN avant 35ans avec histoire familiale positive, Shimelis et al ont trouvé un % de détection aux alentours de 35 %. Chez les patientes <40ans avec antécédents familiaux nous retrouvons 58.3% de mutées *BRCA1-BRCA2*. La différence de taille des échantillons explique peut-être cette différence, car sur notre étude seulement 12 patients rentrent dans ces critères de sélection ainsi que les critères définissant une histoire familiale positive (critères peut-être plus restrictifs dans notre étude expliquant le taux plus élevé de mutations détectées).

Dans l'étude de Couch et al (2015), il a été retrouvé :

- 18% de mutées BRCA chez les patientes <60 ans avec ou sans histoire familiale, contre 5% chez les >60 ans sans histoire familiale. Dans notre étude avec ces mêmes critères on retrouve 16.9% de mutées chez <60 ans avec ou sans histoire familiale contre 2.3% chez les >60 ans sans histoire familiale.

Modélisation par Manchester 3

On retrouve une moyenne du score calculé par le Manchester3 de 31.5% chez les mutées BRCA contre 16.8% chez les non mutées.

On remarque que le score de Manchester 3 est très bien corrélé au pourcentage de détection de mutation pour le gène *BRCA1* dans le cadre de l'essai SA03. Par contre pour le gène *BRCA2* le pourcentage de détection de mutation est bien moins corrélé au score prédit par le Manchester3, ce qui amène à penser que ce n'est pas un excellent outil pour prédire la probabilité d'une mutation dans le gène *BRCA2* (on a identifié 1.96% de mutations chez les patientes avec un score Manchester3 <10% et 3.21% de mutations chez les patientes avec un score Manchester3 >10%). En pratique, comme les deux gènes sont analysés en même temps, cela n'a pas de répercussion sur la décision de prescrire ou non une analyse.

Quand prescrire une analyse génétique dans le cadre des CSTN ?

Même si les effectifs paraissent trop limités pour tirer de véritables conclusions, nous pouvons déduire des tendances à partir de ces graphiques ci-dessous (cf figure 28). Pour être supérieur au seuil de 10% de probabilité de détection de mutation constitutionnelle habituellement retenu pour prescrire une analyse moléculaire, il semblerait légitime de faire une recherche de mutation constitutionnelle dans les gènes *BRCA* :

- pour tout CSTN avec antécédents familiaux quel que soit l'âge au diagnostic
- toute patiente de moins de 50 ans sans antécédents familiaux (histoire familiale négative ou arbre non informatifs) (en laissant supposer qu'avec un effectif plus grand et une diminution constante du taux de mutation détecté au fil des âges, le pourcentage de mutation détecté dans la tranche 40-49 ans serait >10%).
- toute patiente de moins de 60 ans avec un arbre non informatif
- toute patiente de moins de 40 ans avec histoire familiale négative bien documentée (on peut supposer que l'effectif est trop petit avec ces critères de

sélection dans notre étude (23 patientes) et qu'avec un effectif plus grand le % de détection chez les <40 ans avec histoire familiale négative serait >10% (par exemple si on prend isolément la tranche 30-39 ans sans histoire familiale documentée on retrouve 10.5% de mutation).

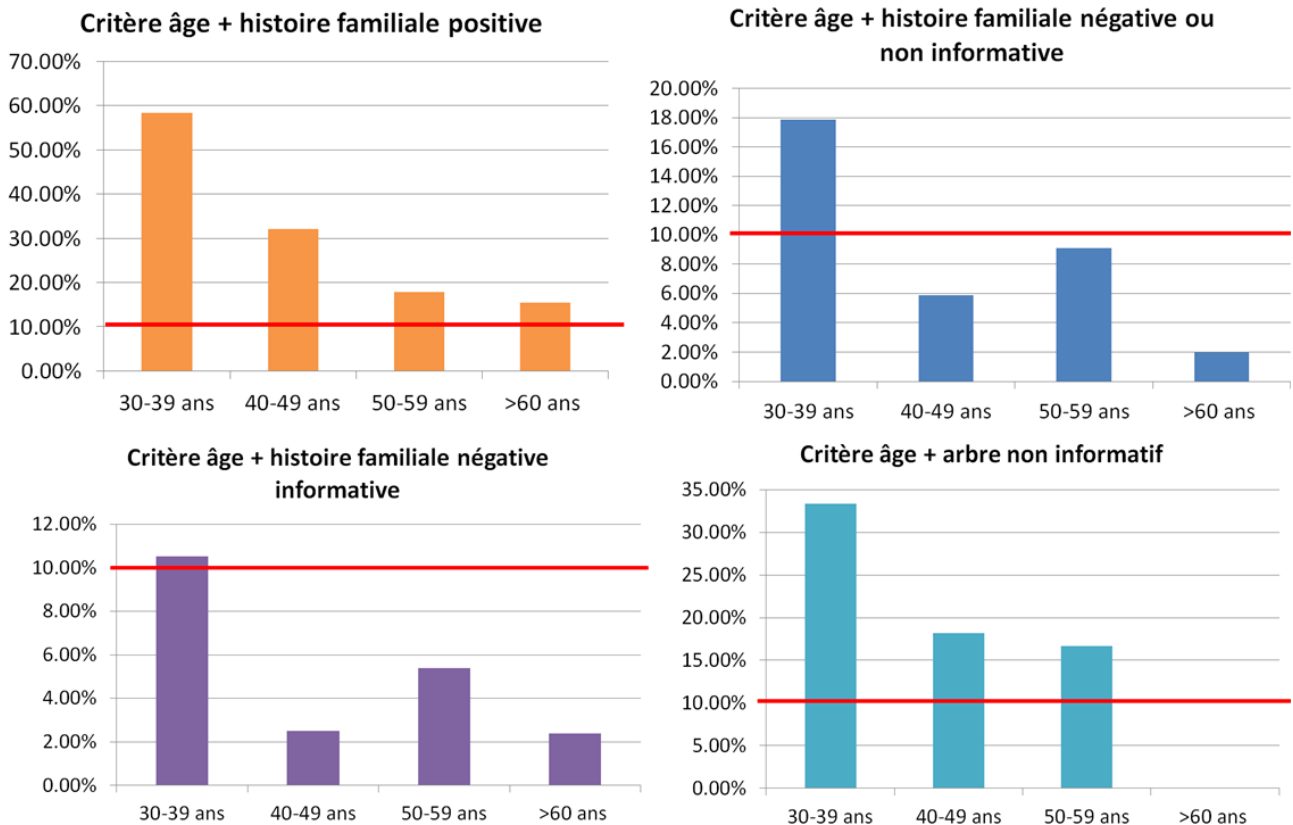
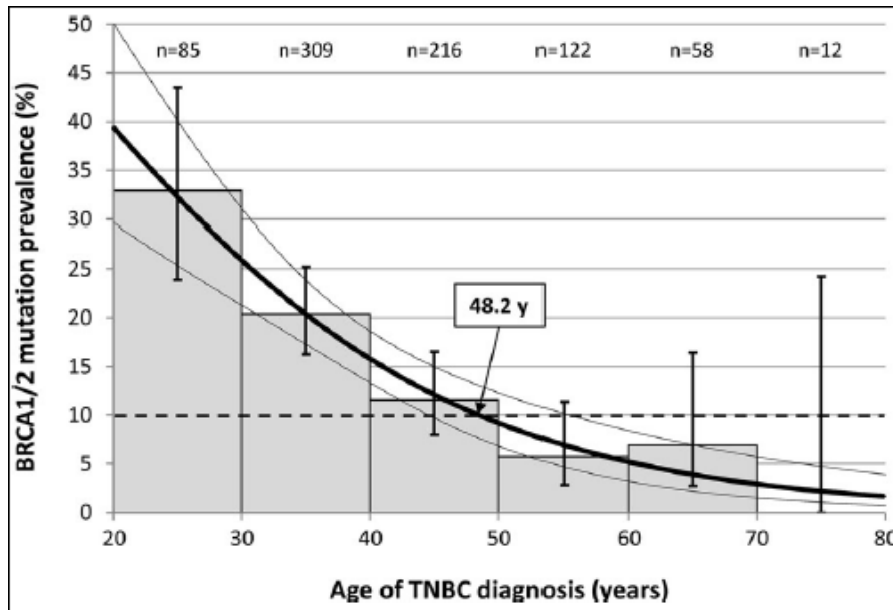


Figure 28 : Histogramme montrant le pourcentage de détection de mutation dans les gènes *BRCA* par tranche d'âge et en fonction de l'histoire familiale dans l'essai SA03.

D'après l'étude allemande de Engel et al (2018), qui évalue le pourcentage de mutation dans *BRCA* 1 et 2 au sein de CSTN sans histoire familiale, si on prend les CSTN <50 ans sans histoire familiale de cancer du sein ou de l'ovaire, le taux de mutation retrouvée est supérieur au seuil de 10% (11.6%) préconisé pour la recherche de mutation *BRCA* en routine clinique (32).



Age group (years)	n	BRCA1		BRCA2		BRCA1/2	
		n	% (95%CI)	n	% (95%CI)	n	% (95%CI)
20-29	85	28	32.9 (23.9-43.5)	0	0.0 (0.0-4.3)	28	32.9 (23.9-43.5)
30-39	309	60	19.4 (15.4-24.2)	3	1.0 (0.3-2.8)	63	20.4 (16.3-25.2)
40-49	216	22	10.2 (6.8-14.9)	3	1.4 (0.5-4.0)	25	11.6 (8.0-16.5)
50-59	122	6	4.9 (2.3-10.3)	1	0.8 (0.1-4.5)	7	5.7 (2.8-11.4)
60-69	58	2	3.4 (1.0-11.7)	2	3.4 (1.0-11.7)	4	6.9 (2.7-16.4)
70-79	12	0	0.0 (0.0-24.2)	0	0.0 (0.0-24.2)	0	0.0 (0.0-24.2)
TOTAL	802	118	14.7 (12.4-17.3)	9	1.1 (0.6-2.1)	127	15.8 (13.5-18.5)

Figure 29 : histogramme permettant de définir critère âge pour analyse des gènes *BRCA* dans les CSTN et table de distribution des effectifs dans l'étude de Engel et al (32).

B. DISCUSSION

Concernant la seconde partie des analyses sur les gènes de prédisposition autres que *BRCA1* et *BRCA2*, une première analyse de la littérature a été faite afin de faire le point sur les données publiées à ce jour.

Prévalence dans les autres gènes de prédisposition dans le cadre des CSTN

En rajoutant les résultats d'une grande étude rétrospective menée aux Etats-Unis par Buys et al (2017) (33) sur près de 35000 patientes comprenant presque 5000 CSTN, ayant été testé sur un panel 25 gènes pour un cancer du sein, j'ai fait un tableau de synthèse des pourcentages de mutations retrouvées dans les différents gènes testés en commun dans 3 des études décrites plus haut. Les résultats sont concordants entre les différentes études pour chaque gène. Afin de s'affranchir de biais tel que la différence de panel, je me suis appuyé sur les résultats de la plus grande étude pour synthétiser mes résultats dans les graphiques ci-dessous. Au sein des CSTN, on retrouve environ 14% de mutées au total, avec chez près de la moitié des mutées une mutation dans le gène *BRCA1*. 18% de mutations ont été identifiées dans *BRCA2*, 21.8% dans les autres gènes de prédisposition au cancer du sein (les 10 gènes semblant les plus relevant au sein des différentes études ont été retenus) et enfin presque 10% de mutations dans des gènes autres non spécifiquement associé au cancer du sein (gènes des panels digestif principalement).

A noter que 81% des mutations identifiées sont associées à des gènes participant au système de réparation par recombinaison homologue (*BRCA1/2*; *PALB2*, *BARD1*, *BRIP1*, *RAD51 C et D*, *XRCC2*) dans l'étude de Couch et al, ce qui est comparable aux 82% retrouvé dans la cohorte clinique de Shimelis et al.

CSTN (% total)				
	Shimelis et al		Couch et al	Buys et al 2017
	n= 10901patientes		n=1824patientes	n= 4797 patientes
	clinical cohort	TNBCC cohort		
mutés total	14.40%	14.40%	15%	14.40%
BRCA1	6%	7.70%	8.60%	7.2%
BRCA2	2.40%	2.70%	2.70%	2.6%
autres gènes associés cancer du sein	4.50%	3.40%	3.3%	3.5%
PALB2	1.59%	1.0%	1.2%	1.3%
BARD1	0.74%	0.5%	0.5%	0.5%
BRIP1	0.42%	0.5%	0.4%	0.6%
RAD51C	0.48%	0.4%	0.3%	0.4%
RAD51D	0.26%	0.4%	0.4%	0.1%
RAD50	0.22%	0.3%	0.3%	/
ATM	0.26%	0.2%	0.1%	0.3%
CHEK2	0.33%	0.1%	0.0%	0.2%
TP53	0.16%	0.1%	0.1%	0.1%
PTEN	0.05%	0.0%	0.1%	0.0%
autres gènes	1.50%	0.60%	0.00%	1.06%

Tableau 9 : synthèse des mutations retrouvées dans des CSTN sur différentes études.

Comparaison avec les données de fréquence de mutations dans les cancers du sein non TN

Non CSTN (% total)	
	Byus et al 2017
	n=30612 non CSTN
mutés total	8.80%
BRCA2	2.3%
BRCA1	1.5%
autres gènes associés cancer du sein	4.0%
CHEK2	1.3%
ATM	1.0%
PALB2	0.8%
BRIP1	0.3%
TP53	0.2%
BARD1	0.1%
RAD51C	0.1%
RAD51D	0.0%
PTEN	0.1%
RAD50	/
autres gènes	1%

Tableau 10 : synthèse des mutations retrouvées dans l'étude de Buys et al sur les cancers du sein non TN.

Il est retrouvé 8.8% de mutations dans les cancers du sein non TN dans l'étude de Buys et al ce qui est nettement moins que dans les CSTN, confirme bien l'association en CSTN et prédisposition héréditaire. Pour les CSNTN, une majorité de mutations sont identifiées dans les autres gènes associés au cancer du sein (45%), puis on retrouve les mutations dans le gène *BRCA2* (26.1%) et enfin les mutations dans le gène *BRCA1* (17.3%).

Le groupe des CSTN fait donc bien partie de certains sous-groupe de cancers du sein comme les cancers du sein médullaires qui présentent un pourcentage élevé de mutations constitutionnelle dans les gènes BRCA et avec une forte prédominance dans le gène *BRCA1*.

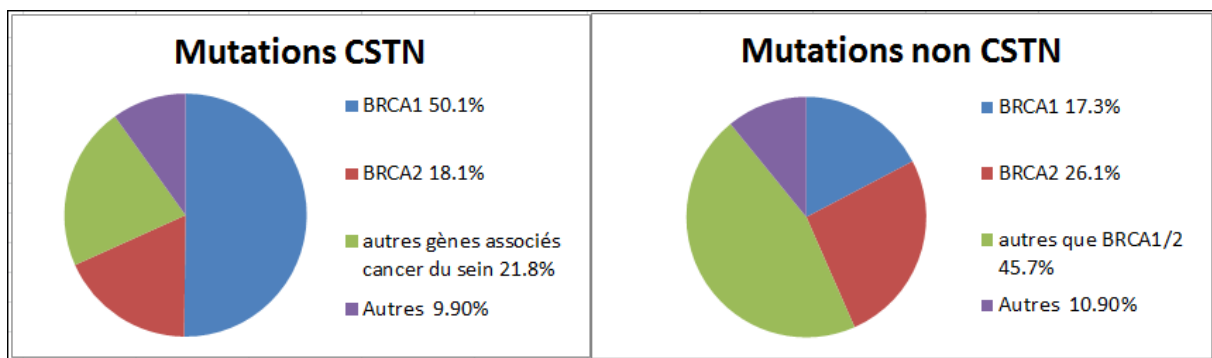


Figure 30 : Comparaison globale des mutations retrouvées entre les CSTN et les non CSTN d'après l'étude de Buys et al.

Si on regarde dans le détail les autres gènes associés au CSTN on retrouve des mutations majoritairement dans *PALB2* (8.1%), *BARD1* (3.4%), *BRIP1* (3.1%) puis les *RAD* (*RAD51C* et *D*, *RAD50*) et enfin *ATM*. Quand on s'intéresse aux CSNTN c'est dans les gènes *CHEK2* (14.3%), *ATM* (11.6%) puis *PALB2* (9.5%) que l'on retrouve le plus de mutations dans les gènes de prédisposition au cancer du sein autres que *BRCA*.

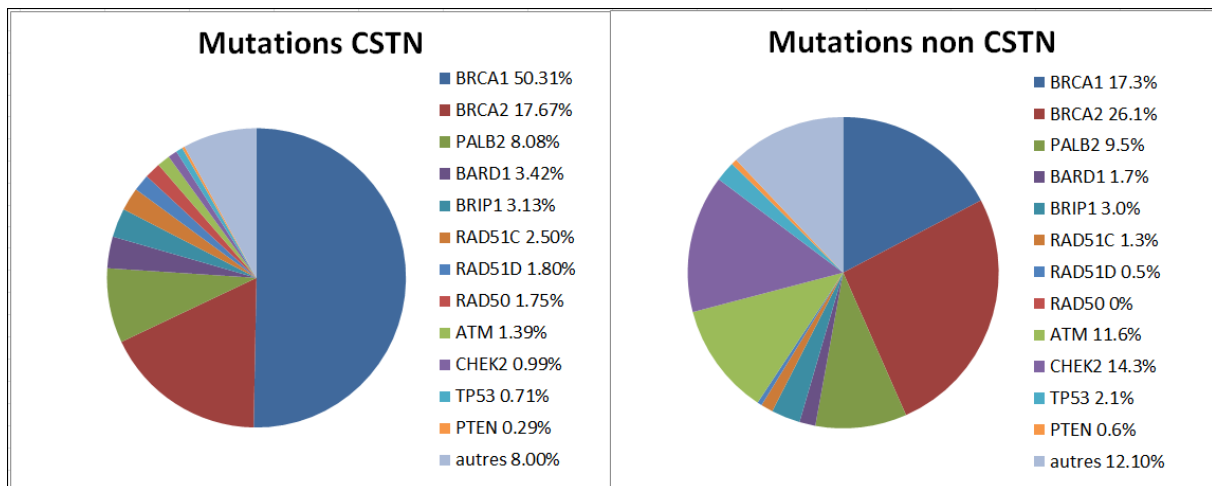


Figure 31 : Comparaison détaillée des mutations retrouvées entre les CSTN et les non CSTN d'après l'étude de Buys et al.

Age au diagnostic et mutation dans les gènes de prédisposition aux CSTN autres que BRCA

Dans l'étude de Shimelis et al (2018), les mutations chez les personnes jeunes se trouvent plutôt dans *BRCA1* alors qu'à un âge plus avancé on retrouve une plus grande proportion de mutation dans les autres gènes de prédisposition. Dans l'étude de Couch et al (2015), la moyenne d'âge pour les mutées était de 45 ans, 44 ans pour les mutées *BRCA1*, 47 ans pour les mutées *BRCA2* et 48 ans pour les mutées non *BRCA1-2*.

Histoire familiale et mutation dans les gènes de prédisposition aux CSTN autres que BRCA

Chez les patients avec mutations autres que *BRCA*, il n'est pas souvent rapporté une histoire familiale évocatrice (5/21 pour *PALB2* et 12/36 pour *BARD1/BRIP1/RAD5/RAD51C/RAD51D* ont un contexte familial évocateur) alors qu'on a retrouvé dans SA03 dans près de deux tiers des cas une histoire familiale positive chez les mutées *BRCA* (proportion similaire dans l'étude de Couch et al).

Dans quels gènes non explorés jusqu'alors, il serait intéressant de rechercher dans le cadre du diagnostic clinique des CSTN ?

Pour qu'il soit utile de rechercher un gène dans le cadre du diagnostic clinique, il faut qu'une mutation dans ce gène entraîne la mise en place de mesures spécifiques au niveau clinique car une mutation dans ce gène augmenterait de manière significative le risque de faire un cancer par rapport à un individu non porteur de cette mutation.

Par exemple en France le panel de 13 gènes GGC Sein-Ovaire (Groupe Génétique et Cancer) a été défini en incluant seulement des gènes pour lesquels il existe des recommandations cliniques en cas de mutation identifiée. Aux Etats-Unis pour qu'un gène fasse l'objet de recommandations spécifiques pour la prise en charge clinique celui-ci doit faire doubler au minimum le risque de faire un cancer par rapport à une personne de la population générale.

On peut noter certaines différences entre les recommandations américaines et françaises comme par exemple le gène *CHEK2* qui n'est pas analysé en France en diagnostic clinique (une seule mutation est recherchée à l'heure actuelle) contrairement aux Etats-Unis car en France il est estimé qu'un variant autre que la mutation recherchée dans ce gène n'impliquera pas de conséquences au niveau de la prise en charge clinique du patient.

Shimelis et al (2018) ont définis que les mutations dans les gènes *BRCA1*, *BRCA2*, *BARD1*, *PALB2* et *RAD51D*, étaient associés à un haut risque (>x5) de développer un CSTN, avec plus de 20% de risque cumulé au long de la vie de développer un cancer du sein chez les populations caucasiennes et afro-américaines.

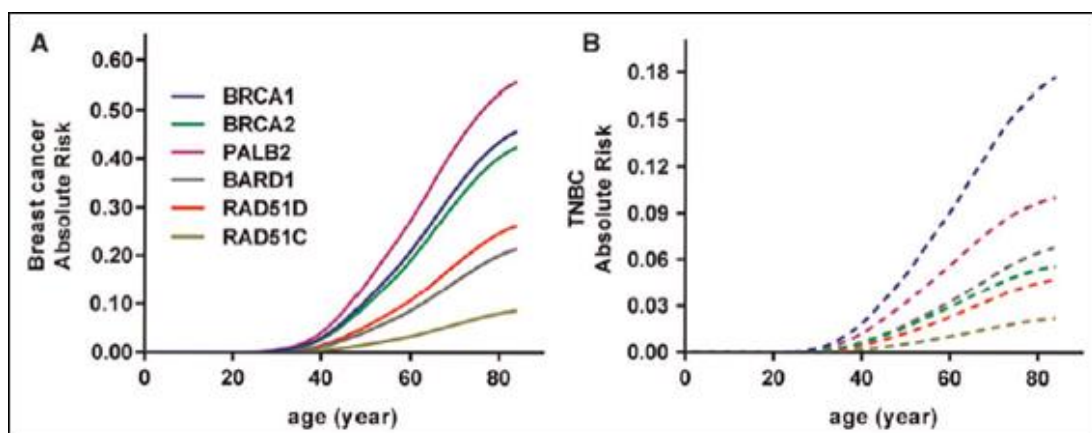


Figure 32 : Courbes représentant le risque absolu de développer un cancer du sein (à gauche) et un CSTN (à droite) selon le gène muté (Shimelis et al (29)).

La figure 32 est une estimation du risque absolu de développer un cancer du sein ou un CSTN en fonction du gène testé. Ce risque absolu est estimé en combinant les chiffres des Odds Ratio retrouvés et l'incidence des mutations dans chaque gène respectif. Sur le graphique A on constate bien que mis à part le gène *RAD51C*, les cinq autres gènes sont bien associés à un risque absolu jusqu'à 80ans supérieur à 20% de développer un cancer du sein, avec un risque maximal associé au gène *PALB2*. Pour les CSTN (graphique B), on constate bien que c'est le gène *BRCA1* qui est associé au plus haut risque absolu suivi de *PALB2* et *BARD1*.

V. CONCLUSION

Les cancers du sein triple-négatif (CSTN) présentent des caractéristiques spécifiques (âge jeune au diagnostic, taux élevé de rechute, mauvais pronostic global, association fréquente au sous-type basal) permettant de les regrouper dans une entité définie par des critères immunohistochimiques. Mais il s'agit en fait d'une entité très hétérogène sur le plan génomique, histologique, clinique et pronostique. Les CSTN présentent par ailleurs de fortes similitudes avec les cancers du sein développés dans le cadre d'une mutation constitutionnelle du gène *BRCA1*, un nombre non négligeable de ces CSTN se développant dans le cadre du syndrome de prédisposition aux cancers du sein et de l'ovaire.

L'objectif de cette thèse était de contribuer à une meilleure caractérisation du groupe hétérogène des CSTN, en particulier en évaluant la proportion des cas associés à des mutations germinales des gènes *BRCA*, d'en étudier l'histoire naturelle et d'identifier les paramètres prédictifs d'une mutation germinale afin d'orienter les tests génétiques mais également dans la perspective d'orienter la prise en charge des patients (prévention, dépistage et traitement).

Pour cela 285 patientes éligibles ont été testées pour les gènes *BRCA1* et *BRCA 2* par séquençage Sanger et MLPA dans le cadre du PHRC SA03, qui est une cohorte prospective multicentrique de 310 patientes diagnostiquées d'un cancer du sein invasif non métastatique triple négatif entre 2010 et 2014.

Il a été identifié une mutation constitutionnelle dans les gènes *BRCA1* et *BRCA2* chez 40/285 patientes (14.1%) analysées à ce jour dont 28 dans *BRCA1* (9.8%) et 12 dans *BRCA2* (4.2%). Il a été retrouvé 78.6% de mutations ponctuelles et 21.4% de RGT dans le gène *BRCA1*. Quand on analyse rétrospectivement les différents types de mutations identifiées dans le laboratoire d'oncogénétique moléculaire de l'IPC tous types de cancer du sein confondus, on retrouve une différence concernant la proportion de mutations identifiées dans *BRCA1* et *BRCA2*, avec quasiment le double de mutations dans *BRCA1* par rapport à *BRCA2* dans les CSTN, alors que dans la base de données le même pourcentage est retrouvé (52% *BRCA1* / 48% *BRCA2*). Ce qui confirme bien le lien particulier entre CSTN et mutation

dans le gène *BRCA1*. A noter une différence entre le pourcentage de RGT identifié au sein de SA03 avec près du double de RGT identifiés (21.4%) par rapport à la base de données (10%).

La corrélation de ces résultats avec les données cliniques et épidémiologiques recueillies a permis de répondre à l'objectif principal de cette thèse en permettant de retenir 3 critères relevant pour orienter la prescription d'une analyse moléculaire au sein des CSTN si on retient le seuil de probabilité minimum de détection de mutations constitutionnelles de 10%, recommandé par l'ASCO pour déclencher une analyse moléculaire en oncogénétique:

- une analyse moléculaire doit être proposée chez tout patient présentant un CSTN quel que soit son âge au diagnostic, s'il existe une histoire familiale positive notable (cancer du sein ou de l'ovaire chez un apparenté au premier ou second degré)

- une analyse moléculaire doit être proposée chez les patients ayant développé un CSTN isolé dans la famille avant 50ans, limite d'âge concordant avec les recommandations et les données de la littérature actuelle basée sur une majorité d'études rétrospectives et une étude prospective Allemande sur 800 patientes en 2018 par Engel et al.

- le grade SBR n'apparaît pas comme un paramètre discriminant, ce qui concordant avec les résultats d'une précédente étude menée par le Dr MORETTA à l'IPC, et pose la question de l'intérêt de renseigner ce grade SBR dans le Manchester 3, pour évaluer la probabilité d'une mutation constitutionnelle dans le cadre d'un CSTN, car la probabilité serait alors surestimée par l'algorithme. Le grade SBR 3 et ne serait donc pas pertinent pour guider la décision d'une analyse moléculaire dans ce contexte.

En ce qui concerne l'histoire naturelle, notre étude est en faveur d'un meilleur taux de survie chez les mutés *BRCA* comparativement au non mutés. Des analyses ultérieures permettront de déterminer s'il existe une différence d'évolution de la maladie selon le traitement utilisé et le statut *BRCA*. Afin de confirmer ces premiers résultats, il est nécessaire de poursuivre le suivi de ces patients sur une période plus longue.

D'un point de vue thérapeutique, on peut citer deux essais cliniques en cours qui visent à exploiter la relation entre le schéma thérapeutique utilisé et le statut BRCA dans les cancers du sein :

- l'essai clinique Geparsixto qui évalue l'effet sur la pCR de l'ajout de carboplatine en néoadjuvant à un schéma thérapeutique composé d'anthracyclines, taxanes et bevacizumab (anti VEGF) chez des individus ayant développé un CSTN et dont le statut BRCA est connu. Il en ressort que les individus mutés dans les gènes *BRCA1/2* ont un meilleur taux de pCR (66.7% sans carboplatine et 65.4% avec carboplatine) comparativement aux individus non mutés indépendamment de l'ajout de carboplatine au schéma thérapeutique. Par contre les individus non mutés BRCA semblent retirer un bénéfice de l'ajout de carboplatine avec un taux de pCR à 55% contre 36.4% sans carboplatine en néoadjuvant (34).
- l'essai clinique randomisé Olympia chez des patientes porteuses d'une mutation dans *BRCA1* ou *BRCA2*, traitées pour cancer du sein HER2-métastatique par deux cycles de chimiothérapie puis soit par anti-PARP soit par chimiothérapie standard. Les premiers résultats montrent la supériorité des anti-PARP sur la réduction de la taille tumorale (66%) comparativement à une chimiothérapie classique (29%) ainsi que sur la survie sans progression (7 mois contre 4.2 mois de médiane dans le bras chimiothérapie standard) (35).

La poursuite des analyses moléculaires par le panel de 27 gènes testés (comprenant le panel élargi 13 gènes GGC sein-ovaire et le panel TUMOSPEC (gènes candidats)) vont permettre de définir quels sont les gènes à tester en priorité dans le cadre des CSTN et confronter ces données avec celle de la littérature (implication des gènes *PALB2*, *BARD1* et *RAD51D* décrite dans une récente étude sur une série de CSTN). L'identification de nouveaux gènes d'intérêt clinique pourrait permettre d'adapter la prise en charge et ouvrir l'accès éventuel à de nouvelles thérapies notamment les anti-PARP, jusque-là limités aux cancers de l'ovaire séreux de haut grade et proposés récemment aux USA aux cancers du sein métastatiques.

Des études ultérieures devront recueillir des données de suivis chez les patients mutés dans les nouveaux gènes d'intérêt clinique afin de pouvoir adapter les recommandations de prise en charge en fonction du gène muté et pourvoir répondre à certaines questions comme le suivi à mettre à place, le rythme, les types d'examens...

La poursuite des analyses par puce à ADN et Tissue micro-array dans le cadre du PHRC SA03 permettra de sous-typé les différentes populations mises en évidence et identifier potentiellement des profils différents, en fonction du contexte génétique, quant à l'évolution naturelle de la maladie et sa prise en charge thérapeutique (sensibilité différente aux chimiothérapies, sensibilité à de nouvelles molécules comme les anti-PARP...).

Notre travail est une première étape démontrant l'apport sans cesse croissant des données moléculaires pour guider la prise en charge des patients atteints de ce cancer du sein de mauvais pronostic. La poursuite des analyses moléculaires tant constitutionnelles et somatiques, ainsi qu'un suivi sur une plus longue période devraient contribuer utilement à l'établissement de nouvelles recommandations médicales dans le domaine de la médecine personnalisée.

VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Représentation d'un caryotype humain | Le monde en images [http://monde.ccdmd.qc.ca/ressource/?id=55900]
2. L'Acide Ribo Nucléique [Internet]. http://tp-svt.pagesperso-orange.fr/arn_fichiers/synthese.htm
3. Thésaurus - Femmes porteuses d'une mutation de BRCA1 ou BRCA2 / Détection précoce du cancer du sein et des annexes et stratégies de réduction du risque - Ref : RECOBRCATHES17 | Institut National Du Cancer [Internet].
4. Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, Phillips K-A, Mooij TM, Roos-Blom M-J, et al. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA*. 20 2017;317(23):2402-16.
5. La PCR, qu'est-ce que c'est ? - OpenLAB - Université de Strasbourg <https://ed414-openlab.unistra.fr/les-tp/adn-et-genetique-2009-2012/pour-preparer-le-tp/la-pcr-quest-ce-que-cest/>
6. NOGUCHI T. Diaporama présentation NGS (Institut Paoli-Calmettes).
7. Tissue Microarrays at Johns Hopkins | The Pathology Blog <http://apps.pathology.jhu.edu/blogs/pathology/tissue-microarrays>
8. Fact Sheets by Cancer. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx
9. Le cancer du sein - Les cancers les plus fréquents | Institut National Du Cancer [Internet].
10. Anatomie du sein - Cancer du sein | Institut National Du Cancer
11. Stacoffe M, Arbion F, Végas H, Ouldamer L, Cancel M, Vinceneux A, et al. Les cancers du sein « triple-négatifs » : une pseudo-entité en cours de démembrement. *Innov Thérapeutiques En Oncol*. 1 sept 2017;3(5):243-56.
12. Kumar P, Aggarwal R. An overview of triple-negative breast cancer. *Arch Gynecol Obstet*. févr 2016;293(2):247-69.
13. Gonçalves A. Cancer du sein triple-négatif : caractéristiques histocliniques et moléculaires, prise en charge et perspectives thérapeutiques - EM|consulte. *Bull Cancer (Paris)*. mai 2013;100(5):S453-64.
14. Couch FJ, Hart SN, Sharma P, Toland AE, Wang X, Miron P, et al. Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 févr 2015;33(4):304-11.

15. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 août 2007;13(15 Pt 1):4429-34.
16. Wong-Brown MW, Meldrum CJ, Carpenter JE, Clarke CL, Narod SA, Jakubowska A, et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in patients with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* févr 2015;150(1):71-80.
17. Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, van Leeuwen FE, Wesseling J, et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med.* 25 mai 2010;7(5):e1000279.
18. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 10 mars 2008;26(8):1275-81.
19. Pareja F, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancers - a panoply of cancer types. *Nat Rev Clin Oncol.* juin 2018;15(6):347-8.
20. Prat A, Pineda E, Adamo B, Galván P, Fernández A, Gaba L, et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast Edinb Scotl.* nov 2015;24 Suppl 2:S26-35.
21. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest.* juill 2011;121(7):2750-67.
22. Gerratana L, Basile D, Buono G, De Placido S, Giuliano M, Minichillo S, et al. Androgen receptor in triple negative breast cancer: A potential target for the targetless subtype. *Cancer Treat Rev.* 11 juin 2018;68:102-10.
23. Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, Covington KR, Contreras A, Fuqua SAW, et al. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 avr 2015;21(7):1688-98.
24. Bareche Y, Venet D, Ignatiadis M, Aftimos P, Piccart M, Rothe F, et al. Unravelling triple-negative breast cancer molecular heterogeneity using an integrative multiomic analysis. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 1 avr 2018;29(4):895-902.
25. Pareja F, Geyer FC, Marchiò C, Burke KA, Weigelt B, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer: the importance of molecular and histologic subtyping, and recognition of low-grade variants. *NPJ Breast Cancer.* 2016;2:16036.
26. Atchley DP, Albarracin CT, Lopez A, Valero V, Amos CI, Gonzalez-Angulo AM, et al. Clinical and pathologic characteristics of patients with BRCA-positive and BRCA-negative breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 10 sept 2008;26(26):4282-8.

27. Mills MN, Yang GQ, Oliver DE, Liveringhouse CL, Ahmed KA, Orman AG, et al. Histologic heterogeneity of triple negative breast cancer: A National Cancer Centre Database analysis. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. juill 2018;98:48-58.
28. Chan JJ, Tan TJY, Dent RA. Are There Any Clinically Relevant Subgroups of Triple-Negative Breast Cancer in 2018? *J Oncol Pract*. mai 2018;14(5):281-9.
29. Shimelis H, LaDuca H, Hu C, Hart SN, Na J, Thomas A, et al. Triple-Negative Breast Cancer Risk Genes Identified by Multigene Hereditary Cancer Panel Testing. *JNCI J Natl Cancer Inst* [Internet]. [cité 8 août 2018]; Disponible sur: <https://academic.oup.com/jnci/advance-article/doi/10.1093/jnci/djy106/5062996>
30. Hahnen E, Hauke J, Engel C, Neidhardt G, Rhiem K, Schmutzler RK. Germline Mutations in Triple-Negative Breast Cancer. *Breast Care Basel Switz*. mars 2017;12(1):15-9.
31. Tung N, Gaughan E, Hacker MR, Lee LJ, Alexander B, Poles E, et al. Outcome of triple negative breast cancer: comparison of sporadic and BRCA1-associated cancers. *Breast Cancer Res Treat*. 1 juill 2014;146(1):175-82.
32. Engel C, Rhiem K, Hahnen E, Loibl S, Weber KE, Seiler S, et al. Prevalence of pathogenic BRCA1/2 germline mutations among 802 women with unilateral triple-negative breast cancer without family cancer history. *BMC Cancer*. 07 2018;18(1):265.
33. Buys SS, Sandbach JF, Gammon A, Patel G, Kidd J, Brown KL, et al. A study of over 35,000 women with breast cancer tested with a 25-gene panel of hereditary cancer genes. *Cancer*. 15 2017;123(10):1721-30.
34. Hahnen E, Lederer B, Hauke J, Loibl S, Kröber S, Schneeweiss A, et al. Germline Mutation Status, Pathological Complete Response, and Disease-Free Survival in Triple-Negative Breast Cancer: Secondary Analysis of the GeparSixto Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 1 oct 2017;3(10):1378-85.
35. ASCO 2017: OlympiAD Trial: Olaparib Slows Growth of BRCA-Related Metastatic Breast Cancer - The ASCO Post [Internet]. [cité 11 sept 2018]. Disponible sur: <http://www.ascopost.com/News/55706>
36. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. mai 2015;17(5):405-24.
37. Amendola LM, Jarvik GP, Leo MC, McLaughlin HM, Akkari Y, Amaral MD, et al. Performance of ACMG-AMP Variant-Interpretation Guidelines among Nine Laboratories in the Clinical Sequencing Exploratory Research Consortium. *Am J Hum Genet*. 02 2016;98(6):1067-76.
38. Ellard S et al. ACGS Best Practice Guidelines for Variant Classification 2017.

RESUME

PROMOTEUR	Institut Paoli-Calmettes (IPC).
COORDONNATEUR	Dr Jean-Marc EXTRA
TITRE	CANCER DU SEIN TRIPLE NEGATIF : ETUDES DES FACTEURS MOLECULAIRES ET GENETIQUES - SA03/IPC 2010-003
PATHOLOGIE	Cancer du sein triple négatif (CSTN)
OBJECTIFS	<p>Objectif principal : Evaluer l'incidence des mutations constitutionnelles des principaux gènes de prédisposition au cancer du sein (<i>BRCA1</i>, <i>BRCA2</i>, <i>PTEN</i> et <i>PALB2</i>) dans une population homogène de femmes pour lesquelles un diagnostic de CSTN a été porté (et confirmé par double lecture) au stade non métastatique.</p> <p>Objectifs secondaires :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Evaluer la survie globale et sans récurrence - Evaluer les facteurs de risques associés - Déterminer le profil histologique - Analyser certains variants des gènes <i>RAD51</i>, <i>BARD1</i>, <i>CHK2</i>, <i>BRIP1</i> et du système SUMO tels que <i>UBC9</i> et <i>PIAS3</i> ou <i>SUMO1</i> - Evaluer le profil d'expression sur le tissu tumoral - Evaluer le profil d'expression génique
METHODOLOGIE	Etude d'une cohorte de patientes, prospective et multicentrique.
CRITERES D'INCLUSION	<ol style="list-style-type: none"> 1 - Femme âgée de plus de 18 ans 2 - Cancer du sein invasif non métastatique diagnostiqué depuis le 01/01/2010 3 - Triple négatif, défini en IHC par des récepteurs à l'œstrogène et à la progestérone à 0%, et une expression de HER2 à 0 ou 1, ou une expression de HER2 à 2 si un test d'amplification montre un ratio < 1.8 4 - Confirmé par une lecture par 2 anatomopathologistes 5 - Apte à recevoir un traitement chirurgical, radiothérapeutique et médical adapté 6 - Apte à être suivie pendant 5 ans après le diagnostic 7 - Performance Statut ≤ 1 8 - Consentement éclairé signé 9 - Affiliation à un régime de sécurité sociale, ou bénéficiaire d'un tel régime.
CRITERES DE NON-INCLUSION	<ol style="list-style-type: none"> 1 - Antécédent ou présence d'autre cancer, à l'exception des cancers cutanés (autres que les mélanomes), des carcinomes <i>in situ</i> du col utérin, ou de toute néoplasie localisée en rémission depuis plus de 5 ans 2 - Métastase au diagnostic 3 - Toute autre pathologie sévère telle que pathologie cardiaque ou vasculaire instable sous traitement, maladie psychiatrique ou neurologique incluant les démences, infection active non contrôlée ou toute autre pathologie sévère empêchant la réalisation d'un traitement adapté du cancer du sein. 4 - Personne en situation d'urgence, personne majeure faisant

	<p>l'objet d'une mesure de protection légale (majeur sous tutelle, curatelle ou sauvegarde de justice), ou hors d'état d'exprimer son consentement.</p> <p>5 - Impossibilité de se soumettre au suivi médical de l'essai pour des raisons géographiques, sociales ou psychiques</p>
<p>DEROULEMENT DE L'ETUDE</p>	<p>Remise et signature du consentement</p> <p>Double lecture anatomopathologique de l'expression des récepteurs hormonaux et de HER2</p> <p>Inclusion</p> <p>Consultation d'oncogénétique et questionnaire sur les facteurs de risques du cancer du sein</p> <p>Prélèvements sanguins : Recherche systématique d'une mutation constitutionnelle des gènes <i>BRCA1</i>, <i>BRCA2</i>, <i>PALB2</i>, <i>PTEN</i></p> <p>Rendu des résultats et recommandations de surveillance et de traitement prophylactique en fonction des résultats</p> <p>A noter, pour les patientes ayant déjà eu dans le cadre de la prise en charge de leur maladie une analyse <i>BRCA1</i>, <i>BRCA2</i> et/ou une recherche de facteurs de risque, les informations déjà obtenues pourront être utilisées.</p> <p>Réalisation du tissu micro-array sur les blocs tumoraux conservés en paraffine</p> <p>Récupération des échantillons tumoraux congelés et réalisation du profil d'expression génique (puces à ADN)</p> <p>Suivis périodiques des patientes tous les 6 mois pendant 5 ans.</p>
<p>CRITERES D'EVALUATION</p>	<p>Critère principal : Pourcentage de patientes ayant une mutation de l'un des 4 principaux gènes étudiés <i>BRCA1</i>, <i>BRCA2</i>, <i>PALB2</i>, <i>PTEN</i> parmi l'ensemble des patientes incluses</p> <p>Critères secondaires :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Survie globale et survie sans récurrence - Questionnaire épidémiologique afin d'évaluer les facteurs de risques - Analyse histologique de la tumeur par l'anatomo-pathologiste à la recherche d'endophénotypes - Incidence de certains variants des gènes <i>RAD51</i>, <i>BARD1</i>, <i>CHK2</i>, <i>BRIP1</i> et du système SUMO tels que <i>UBC9</i> et <i>PIAS3</i> ou <i>SUMO1</i> - Evaluer le profil d'expression sur le tissu tumoral obtenu par tissu micro-array (TMA) - Evaluer le profil d'expression génique sur le tissu tumoral par puce à ADN
<p>NOMBRE DE PATIENTS NECESSAIRES</p>	<p>L'objectif est de montrer, dans cette population que le taux de mutations des 5 gènes pour l'ensemble de la population est de 15%, avec une précision de 5%.</p> <p>Si l'on estime à 4% la fréquence des mutations <i>BRCA1/2</i> pour l'ensemble des cancers du sein (<i>BRCA1</i> 2% <i>BRCA2</i> 2%), à 15% la fréquence des cancers du sein triple négatif et que l'on suppose que 100% des cancers <i>BRCA1</i> sont triple négatif, mais seulement 10% des cancers du sein <i>BRCA2</i>, la probabilité d'observer une mutation de <i>BRCA1</i> est de 13.3% ($1 \times 0.02/0.15$) et de <i>BRCA2</i> de 1.33% ($0.1 \times 0.02/0.15$). La probabilité de mutation pour les 3 autres gènes est inférieure à 1%.</p> <p>Sous l'hypothèse d'un taux réel de 15% avec un intervalle de confiance à 95% et pour une précision du taux observé de +/-5% (10-20), il faut inclure au minimum 192 patientes.</p> <p>300 patientes sont prévues.</p>

NOMBRE DE CENTRES PREVUS	Etude multicentrique
DUREE DE L'ETUDE	Durée d'inclusion : 4 ans Durée du suivi : 5 ans Durée de l'étude : 9 ans (5 ans après l'inclusion du dernier patient)
ANALYSE STATISTIQUE	<p>Les données qualitatives seront présentées sous forme d'effectifs et de pourcentages. Les données quantitatives seront résumées par la moyenne, l'écart type, la médiane et les valeurs extrêmes. Des intervalles de confiances à 95% seront associés à chaque estimateur du critère principal et des critères secondaires.</p> <p>Les recherches de liens entre variables se feront à l'aide des statistiques du chi-deux, de Wilcoxon, ou de Kruskall-Wallis en fonction de la nature des données recueillies.</p> <p>La survie globale et la survie sans récidence seront estimées par la méthode de Kaplan-Meier. Les comparaisons portant sur ces survies seront réalisées à l'aide de la statistique du Log-Rank.</p>

Liste des mutations identifiées dans *BRCA1* et *BRCA2*

Gène	Type de mutation	Commentaire CtR	Exon
<i>BRCA1</i>	Décalage cadre lecture	c.68_69delAG, p.Glu23Valfs*17	2
<i>BRCA1</i>	Décalage cadre lecture	c.668dupA, p.Ala224Glyfs*4	10
<i>BRCA1</i>	Décalage cadre lecture	c.752delA, p.Lys251Serfs*47	11_T1
<i>BRCA1</i>	Décalage cadre lecture	c.798_799delTT, p.Ser267Lysfs*19	11_T1
<i>BRCA1</i>	Décalage cadre lecture	c.798_799delTT, p.Ser267Lysfs*19	11_T1
<i>BRCA1</i>	Décalage cadre lecture	c.815_824dupAGCCATGTGG, p.Thr276Alafs*14	11_T1
<i>BRCA1</i>	Décalage cadre lecture	c.1889_1892delinsTCC, p.Asn630Ilefs*21	11_T3
<i>BRCA1</i>	Décalage cadre lecture	c.1961delA, p.Lys654Serfs*47	11_T3
<i>BRCA1</i>	Décalage cadre lecture	c.3481_3491del11, p.Glu1161Phefs*3	11_T6
<i>BRCA1</i>	Décalage cadre lecture	c.5126delG, p.Gly1709Glyfs*5	18
<i>BRCA1</i>	Décalage cadre lecture	c.5266dupC, p.Gln1756Profs*74	20
<i>BRCA1</i>	Décalage cadre lecture	c.5266dupC, p.Gln1756Profs*74	20
<i>BRCA1</i>	Décalage cadre lecture	c.5266dupC, p.Gln1756Profs*74	20
<i>BRCA1</i>	Décalage cadre lecture	c.5266dupC, p.Gln1756Profs*74	20
<i>BRCA1</i>	Epissage	c.212+3A>G, p.?	5
<i>BRCA1</i>	Epissage	c.213-12A>G, p.?	i5/E6
<i>BRCA1</i>	Faux sens	c.211A>G, p.Arg71Gly	5
<i>BRCA1</i>	Faux sens	c.4994T>A, p.Val1665Glu	17
<i>BRCA1</i>	Faux sens	c.5123C>A, p.Ala1708Glu	18
<i>BRCA1</i>	Faux sens	c.5309G>T, p.Gly1770Val	21
<i>BRCA1</i>	Stop	c.211delA, p.Arg71Glyfs*	5
<i>BRCA1</i>	Stop	c.962G>A, p.Trp321*	11_T1
<i>BRCA1</i>	Stop	c.1266T>G, p.Tyr422*	11_T2
<i>BRCA1</i>	Stop	c.3607C>T, p.Arg1203*	11_T6
<i>BRCA1</i>	Stop	c.3841C>T, p.Gln1281*	11_T7
<i>BRCA1</i>	Stop	c.4258C>T, p.Gln1420*	13
<i>BRCA1</i>	Stop	c.5137delG, p.Val1713*	18

Gène	Type de mutation	Commentaire CtR	Exon
RGT <i>BRCA1</i>	Délétion exon	Délétion NBR2 + exon 1 et 2	
RGT <i>BRCA1</i>	Délétion exon	Délétion exon 1 et 2	
RGT <i>BRCA1</i>	Délétion exon	Délétion exon 7, 8 et 9	
RGT <i>BRCA1</i>	Délétion exon	Délétion exon 15 et 16	
RGT <i>BRCA1</i>	Délétion exon	Délétion exon 21, 22 et 23	
RGT <i>BRCA1</i>	Duplication exon	Duplication exon 5, 6 et 7	

Gène	Type mutation	Commentaire CtR	Exon
<i>BRCA2</i>	Décalage cadre lecture	c.3680_3681delTG, p.Leu1227Glnfs*5	11_T4
<i>BRCA2</i>	Décalage cadre lecture	c.3779delT, p.Leu1260Tyrfs*16	11_t=T5
<i>BRCA2</i>	Décalage cadre lecture	c.3847_3848delGT, p.Val1283Lysfs*2	11_T4
<i>BRCA2</i>	Décalage cadre lecture	c.4936_4939delGAAA, p.Glu1646Glnfs*23	11_T6
<i>BRCA2</i>	Décalage cadre lecture	c.5073dupA, p.Trp1692Metfs*3	11_T6
<i>BRCA2</i>	Décalage cadre lecture	c.7680dupT, p.Gln2561Serfs*5	16
<i>BRCA2</i>	Stop	c.1842dupT, p.Asn615*	10_T2
<i>BRCA2</i>	Stop	c.2612C>A, p.Ser871*	11_T2
<i>BRCA2</i>	Stop	c.3075_3076delinsTT, p.(Lys1025_Lys1026delinsAsn*)	11_T3
<i>BRCA2</i>	Stop	c.6378C>A, p.Cys2126*	11_T9
<i>BRCA2</i>	Stop	c.6711dupT, p.Asp2238*	11_T9
<i>BRCA2</i>	Stop	c.8978C>G, p.Ser2993*	23

FICHE RECOMMANDATIONS INTERPRETATION DES VARIANTS

Ces critères de classement ont été repris à partir du groupe de travail appartenant au réseau NGS-Diag qui reprend les recommandations ACMG-AMP (Richards *et al.*, *Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants*, *Genet Med* 2015(36) ; Amendola *et al.*, *Am J Hum Genet* 2016(37)), et incorpore les éléments d'autres publications (références intégrales dans la section « bibliographie ») visant à actualiser ces recommandations, dont des recommandations émises par l'Association for Clinical Genetic Science (Ellard *et al.*, 2017)). (38)

- **Données épidémiologiques** : Fréquence allélique du variant retrouvée dans les différentes bases de données de populations contrôles (1000genomes, Exac, dbSNP, GnomAD, ESP...) : à partir de 1% on considère que c'est un polymorphisme. De manière générale, on considère qu'un variant dans un gène responsable d'une maladie à transmission autosomique dominante ne peut pas avoir une fréquence allélique supérieure à la prévalence de la maladie. A noter qu'il est important de noter l'origine ethnique du patient pour interpréter les données
- **Type de mutation** : synonyme (la base change mais l'acide aminé reste le même), faux-sens (le changement de la base provoque un changement de l'acide aminé), décalage cadre-lecture (quand le nombre de bases une insertion ou une délétion est différent d'un multiple de 3), formation d'un codon stop
- **Conséquence au niveau de l'acide aminé** : étude de l'écart physico-chimique entre les acides aminés, un grand écart physico-chimique entre deux acides aminés est plus susceptible de provoquer des modifications sur la protéine (conformation tridimensionnelle notamment)
- **Conservation de l'acide-aminé inter-espèce** : plus un acide aminé est conservé plus il y a de chance que son remplacement par un autre acide aminé soit délétère
- **Variant dans le domaine protéique ou non** : une variation située dans le domaine protéique est plus susceptible d'être délétère que dans une zone qui ne code pas pour un domaine protéique
- **Prédictions bio-informatique du caractère délétère** : nombreux algorithmes permettant d'évaluer in silico les conséquences potentielles du variant retrouvé selon les critères vus précédemment (polyphen, align GVGD, SIFT, Mutation taster, UMD predictor)
- **Analyses in silico sur l'épissage** : pour estimer si le variant peut modifier les sites accepteurs et donneurs d'épissage, et provoquer des modifications comme un saut d'exon par exemple grâce à des algorithmes comme MaxEntScan, SpliceSiteFinder, NNSPLICE, GeneSplicer et Human Splicing Finder
- **Présence dans les bases de données patients (clinvar, hgmd, lovd, COSMIC ...) et son classement associé**
- **Bases de données nationales** en fonction des gènes (UMD, INSIGHT...)
- **Base de données interne du laboratoire** (PMU)
- **Données bibliographiques** : il est nécessaire de faire la revue de la littérature concernant le variant à classer avec l'aide de la base PubMed (NCBI ; National Center for Biotechnology Information) pour comparer les contextes cliniques dans lequel le variant a été retrouvé, quel classement il lui a été attribué, et si des analyses complémentaires ont déjà été effectuées pour aider au classement de ce variant (analyse sur ARN, immunohistochimie...)

- **Critères cliniques et généalogiques, données de ségrégation** : phénotype associé à la présence du variant (étude de co-ségrégation), phénotype clinique en rapport avec le gène étudié
- **Données fonctionnelles** : études fonctionnelles in vitro ou in vivo montrant un impact délétère du variant sur le gène ou son produit
- **Analyse somatique** : si le variant a déjà été retrouvée dans des analyses somatiques et sur quelle tumeur

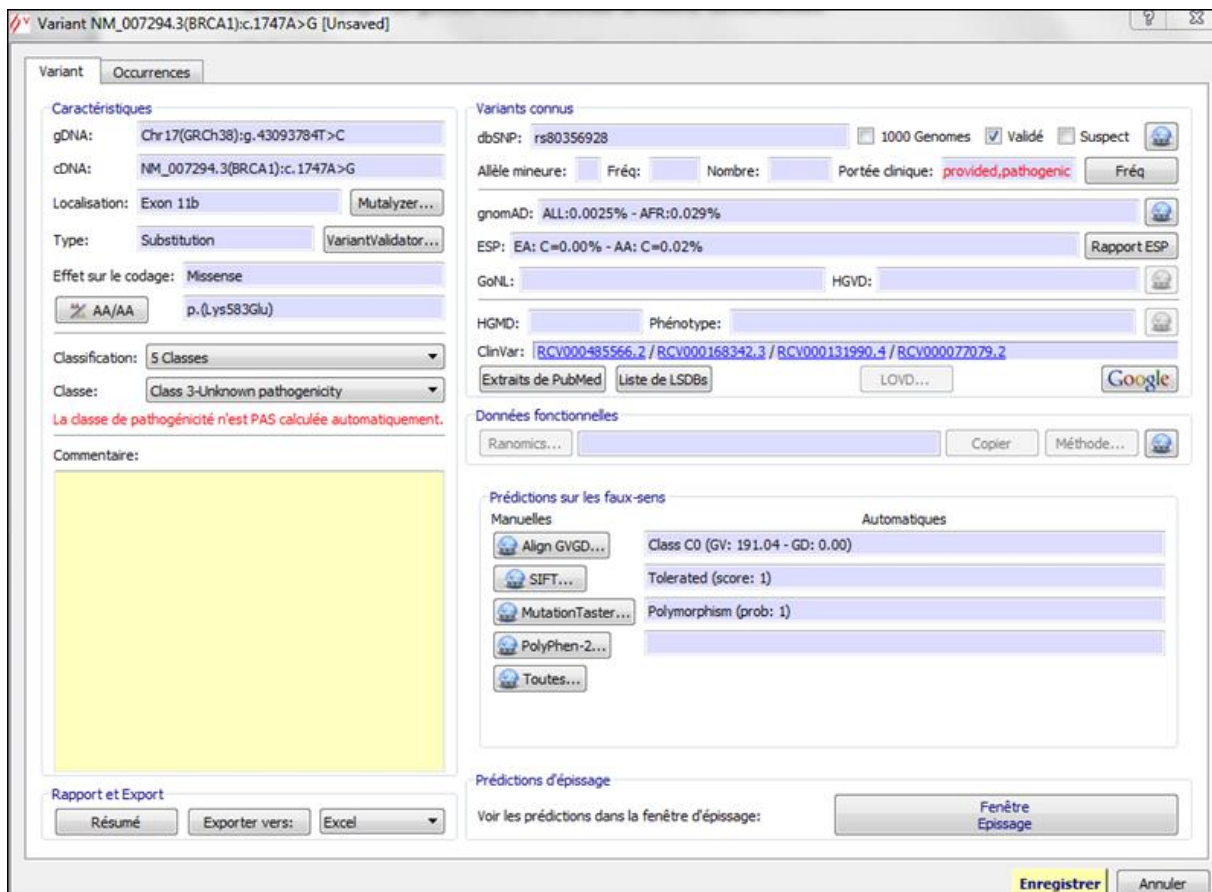


Figure 14 : capture d'écran du logiciel ALAMUT® servant à l'interprétation des variants

PROCOLE TECHNIQUE DE L'ANALYSE DES ECHANTILLONS PAR NGS

1. Extraction de l'ADN

L'ADN des patientes a été extrait à partir d'un prélèvement sanguin.

La quantification de l'ADN double-brin a été faite par Nanodrop™One (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

2. Double purification de l'ADN

La double purification de l'ADN a été faite sur l'automate Biorobot (Hamilton) en utilisant des billes AMPure XP Reagent (Beckman Coulter). La quantification de l'ADN double-brin après purification a été faite sur le Qubit (Thermo-Fisher) avec le kit ds-DNA Broad Range.

3. Préparation de l'ADN

Dilution des ADN purifiés avec du tampon IDTE du kit HCS de SOPHIA GENETICS pour obtenir une concentration par échantillon de 200ng dans un volume final de 30µL.

4. Séquençage haut-débit

Séquençage massif en parallèle de l'ADN génomique (Illumina MiSeq) après enrichissement par capture (HCS, Sophia Genetics; régions codantes, jonctions introns-exons et 25 paires de bases introniques) sur 27 gènes d'intérêt clinique et recherche. Pour constituer la librairie d'amplicons nous avons utilisé le kit QIAGEN Qiaseq FX DNA Library, le kit KAPA Library Amplification (KAPA BIOSYSTEMS), le kit HCS de SOPHIA GENETICS, le kit TapeStation Agilent High Sensitivity.

Identification des variations ponctuelles (excepté le gène EPCAM) et des remaniements de grande taille par analyse bioinformatique avec les logiciels Sophia DDM (Sophia Genetics) et SeqNext (JSI) et/ou Biomedical Genomics Workbench(QIAGEN).

a) Phase 1 : préparation de l'ADN génomique

1. Etape de fragmentation de l'ADN génomique avec le kit QIAGEN Qiaseq FX DNA Library nécessaire pour le séquençage d'amplicon entre 300 et 700paires de bases
2. Etape de ligation des adapteurs fournis par SOPHIA GENETICS afin de marquer chaque amplicon avec un « barcode » permettant d'identifier chaque patient lors du regroupement par pool
3. Lavage post-ligation avec les billes AMPure XP Reagent (Beckman Coulter)
4. Sélection des fragments par la taille entre 300 et 500pb afin de garder seulement les fragments qui nous intéressent (région à séquencer avec adaptateurs)
5. Amplification de la librairie
6. Lavage post-amplification avec les billes AMPure XP Reagent (Beckman Coulter)
7. Qualification et quantifications au Qubit (Thermo-Fisher) avec le kit ds-DNA High Sensitivity (objectif 6 à 15ng/µL) et à la Tape Station 4200 (Agilent) avec le kit Agilent High Sensitivity D100 DNA Screen Tape (objectif 300 à 700pb)
8. Pool des librairies par groupe de 12 échantillons, constitution de 4 pools pour 48 échantillons

b) Phase 2 : capture des régions d'intérêt

1. Etape d'hybridation afin de sélectionner les amplicons qui se trouvent dans la zone d'intérêt
2. Capture de ces régions d'intérêt grâce à des billes de streptavidine puis étape de lavage
3. Amplification post-capture des amplicons sélectionnés avec le kit KAPA Library Amplification,

4. Lavage post-capture les billes AMPure XP Reagent (Beckman Coulter)
5. Vérification de la conformité des librairies : qualification et quantifications au Qubit (Thermo-Fisher) avec le kit ds-DNA High Sensitivity (objectif 5 à 15ng/μL) et à la Tape Station 4200 (Agilent) avec le kit Agilent High Sensitivity D100 DNA Screen Tape (objectif 300 à 700pb)

c) Phase 3 : séquençage sur le MISEQ (Illumina)

1. Pool des 48 échantillons = pool de librairie
2. Dénaturation du pool de librairie
3. Enrichissement de la librairie avec du PhiX1%
4. Chargement dans la cartouche du MISEQ de 10pM de librairie poolée.
5. Chargement du MISEQ avec la cartouche, le tampon, l'eau et la flowcell.
6. Lancement du séquençage.

5. Analyse des données

A partir d'une série d'échantillons constitutionnels séquencés, l'analyse des données sortant du séquenceur va être parallèlement traité par deux pipelines indépendants : pipelines Sophia Genetics (SG) et Biomedical Genomics Workbench (BGW), puis création de fichiers Excel de synthèse regroupant les informations des deux pipelines avec le programme « [integrate_SG_BGW_results.py](#) » par le bio-informaticien.

Il prend en entrée les fichiers de résultats au format texte d'un run, respectivement importés depuis l'interface Sophia DDM et produits par BGW, et donne en sortie les fichiers Excel des variants filtrés, comparés et annotés.

Pour chaque échantillon, ce script ne conserve que les variants des gènes notés dans la demande d'analyse de l'échantillon.

La classification de la pathogénicité des variants se fait par comparaison automatique des données issues du PMU de GENNO et de Sophia DDM, une discordance entre la classification OCGM et celle de Sophia DDM fait apparaître une case « rose » et nécessite une vérification par le technicien. Un variant non référencé au laboratoire est désigné comme étant « à classer ».

Certains variants sont rejetés en fonction des critères de fréquence, de couverture, de profondeur ou de localisation.

Les variants rejetés dont la fréquence est supérieure à 5%, se trouvant dans la cible (-25/+25), non référencés comme étant des artefacts, des homopolymères ou des POLY doivent être confirmés par la méthode de Sanger à partir du tube mère.

6. Annotation nucléotidiques

Annotations nucléotidiques selon The Human Genome Variation Society (HGVS)

Gène(s) analysé(s) : *BRCA1* (NM_007294.3);*BRCA2* (NM_000059.3);*CDH1* (NM_004360);*EPCAM* (NM_002354.2);*MLH1* (NM_000249.3);*MSH2* (NM_000251.2);*MSH6* (NM_000179.2);*PALB2* (NM_024675.3);*PMS2* (NM_000535);*PTEN* (NM_000314);*RAD51C* (NM_058216.1);*RAD51D* (NM_002878 / NM_001142571.1 (exon 3a));*TP53* (NM_000546.4)

SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admis(e) à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans **aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions**. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas **usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité**.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai **jamais leur confiance** et **n'exploiterai pas le pouvoir hérité** des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis(e) dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. **Reçu(e) à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers** et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré(e) et méprisé(e) si j'y manque.

RESUME THESE SA03

Le cancer du sein triple-négatif (CSTN), est défini par l'absence d'expression des récepteurs hormonaux, et l'absence d'amplification/surexpression de l'oncoprotéine Her2. Ils représentent 12 à 17% des cancers du sein. Des caractéristiques spécifiques ont permis d'individualiser cette entité mais les CSTN restent très hétérogènes d'un point de vue histo-moléculaire. Ils présentent par ailleurs des similarités avec les cancers développés dans le cadre d'une mutation constitutionnelle dans le gène *BRCA 1*.

L'objectif de la cohorte prospective SA03, sur laquelle nous avons travaillé, est de caractériser d'un point de vue moléculaire les CSTN et de corréliser ces données avec l'histoire naturelle de la maladie afin d'identifier des marqueurs pronostiques et/ou thérapeutiques. L'objectif principal de ce travail de thèse est d'évaluer le pourcentage de mutations constitutionnelles dans les gènes *BRCA1* et *BRCA2* dans les CSTN et de définir quels critères cliniques paraissent pertinents pour retenir une analyse moléculaire.

L'étude clinique PHRC SA03, financée dans le cadre d'un PHRC, est une cohorte prospective multicentrique sur 310 patientes diagnostiquées d'un cancer du sein invasif non métastatique triple négatif entre 2010 et 2014. Des données épidémiologiques et cliniques ont été collectées ainsi que du matériel biologique (prélèvements sanguins et biopsies tumorales) pour chaque patiente. 285 patientes ont été retenues comme éligibles et testées pour les gènes *BRCA1* et *BRCA 2* par séquençage Sanger et MLPA dans un premier temps, puis une seconde analyse par séquençage haut-débit (NGS) sur un panel de 27 gènes, est en cours de réalisation.

Il a été identifié une mutation constitutionnelle dans les gènes *BRCA1* et *BRCA2* chez 40/285 patientes (14.1%) sur l'ensemble des CSTN dont 28 dans *BRCA1* (9.8%) et 12 dans *BRCA2* (4.2%). Dans les mutations identifiées dans le gène *BRCA1* 78.6% sont des mutations ponctuelles et 21.4% des RGT. Seules des mutations ponctuelles ont été retrouvées dans le gène *BRCA2*. Le grade SBR au diagnostic n'apparaît pas comme un argument suffisant pour conduire à la réalisation d'une analyse moléculaire dans le cadre d'un CSTN. Associé à une histoire familiale positive (présence d'un cancer du sein ou de l'ovaire au 1^{er} ou 2^{ème} degré) tout CSTN pourrait faire l'objet d'une analyse dans les gènes *BRCA1-2* si on se fixe une probabilité de détection de mutation $\geq 10\%$, comme recommandé par l'ASCO. Tout CSTN <50ans pourrait faire l'objet d'une analyse génétique si on ne prend pas en compte le contexte familial. Dans notre étude, en terme de survie, les sujets mutés *BRCA* ont un meilleur pronostic, les données de la littérature restant controversées à ce sujet.

Notre travail est une première étape démontrant l'apport sans cesse croissant des données moléculaires pour guider la prise en charge des patients atteints de ce cancer du sein de mauvais pronostic. La poursuite des analyses moléculaires tant constitutionnelles que somatiques, ainsi qu'un suivi sur une plus longue période devraient contribuer utilement à l'établissement de nouvelles recommandations médicales dans le domaine de la médecine personnalisée.

Mots-Clés : Cancer du sein triple négatif, oncogénétique, mutation constitutionnelle, syndrome de prédisposition héréditaire, gène *BRCA1*, gène *BRCA2*, biologie moléculaire, séquençage Sanger, séquençage haut-débit