



**HAL**  
open science

## Prédisposition génétique et cancer du sein triple négatif: analyse du spectre mutationnel et impact clinique

Vincent Garcia

### ► To cite this version:

Vincent Garcia. Prédisposition génétique et cancer du sein triple négatif: analyse du spectre mutationnel et impact clinique. Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-02951957

**HAL Id: dumas-02951957**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02951957>**

Submitted on 29 Sep 2020

**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.

MÉMOIRE  
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES  
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu le 24 septembre 2020

Par M. GARCIA Vincent

Né le 06/01/1993

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76  
du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

TITRE :

Prédisposition génétique et cancer du sein triple négatif :  
analyse du spectre mutationnel et impact clinique

----oOo----

JURY :

Président : Pr BADENS Catherine

Membres : Pr SOBOL Hagay

Dr REMENIERAS Audrey

Dr ZATTARA Hélène

Dr SABATIER Renaud



MÉMOIRE  
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES  
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu le 24 septembre 2020

Par M. GARCIA Vincent

Né le 06/01/1993

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76  
du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

TITRE :

Prédisposition génétique et cancer du sein triple négatif :  
analyse du spectre mutationnel et impact clinique

----oOo----

JURY :

Président : Pr BADENS Catherine

Membres : Pr SOBOL Hagay

Dr REMENIERAS Audrey

Dr ZATTARA Hélène

Dr SABATIER Renaud

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05  
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

**ADMINISTRATION :**

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI, M. Guillaume HACHE
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Patrice VANELLE, M. Pierre TIMON-DAVID,
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Henri PORTUGAL, M. Philippe CHARPIOT
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Florence GAUREL
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Aurélie BELENGUER
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Nathalie BESNARD

**DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE**  
Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

**PROFESSEURS**

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Philippe PICCERELLE

## MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI  
Mme Odile RIMET-GASPARINI  
Mme Pascale BARBIER  
M. François DEVRED  
Mme Manon CARRE  
M. Gilles BREUZARD  
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA  
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,  
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pascal PRINDERRE  
M. Emmanuel CAUTURE  
Mme Véronique ANDRIEU  
Mme Marie-Pierre SAVELLI

BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE ET BIOTHERAPIES  
PHARMACO ECONOMIE, E-SANTE

M. Jérémy MAGALON  
Mme Carole SIANI

## ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

Mme Angélique GOODWIN

**DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE**  
Responsable : Professeur Françoise DIGNAT-GEORGE

## PROFESSEURS

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE  
Mme Laurence CAMOIN-JAU  
Mme Florence SABATIER-MALATERRE  
Mme Nathalie BARDIN

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN  
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET  
ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

## MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

M. Thierry AUGIER  
M. Edouard LAMY  
Mme Alexandrine BERTAUD  
Mme Claire CERINI  
Mme Edwige TELLIER  
M. Stéphane POITEVIN

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Aurélie LEROYER  
M. Romaric LACROIX  
Mme Sylvie COINTE

MICROBIOLOGIE

Mme Michèle LAGET  
Mme Anne DAVIN-REGLI  
Mme Véronique ROUX  
M. Fadi BITTAR  
Mme Isabelle PAGNIER  
Mme Sophie EDOUARD  
M. Seydina Mouhamadou DIENE

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE

Mme Carole DI GIORGIO  
M. Aurélien DUMETRE  
Mme Magali CASANOVA  
Mme Anita COHEN

BIOLOGIE CELLULAIRE

Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

## ATER

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

Mme Anne-Claire DUCHEZ

BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE

Mme Alexandra WALTON

## A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Mélanie VELIER

## DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

## PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Catherine BADENS

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. David BERGE-LEFRANC

CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE –  
CHIMIE THERAPEUTIQUE

M. Pascal RATHELOT  
M. Maxime CROZET

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE

M. Patrice VANELLE  
M. Thierry TERME

PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOGNOSIE

Mme Evelyne OLLIVIER

**MAITRES DE CONFERENCES**

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS M. Charles DESMARCHELIER
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Sandrine ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE Mme Fanny MATHIAS
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDER Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

**MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)**

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Cyril PUJOL
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA

**A.H.U.**

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Mathieu CERINO
--	-------------------

**ATER**

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Duje BURIC
---	---------------

**DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE**

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

**PROFESSEURS**

PHARMACIE CLINIQUE	M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Bruno LACARELLE Mme Frédérique GRIMALDI M. Joseph CICCOLINI

**MAITRES DE CONFERENCES**

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

**A.H.U.**

PHYSIOLOGIE / PHARMACOLOGIE PHARMACIE CLINIQUE	Mme Anaïs MOYON M. Florian CORREARD
---	--

**ATER.**

TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Anne RODALLEC
----------------------------------	-------------------

## CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire

Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie

Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché

Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 23 janvier 2020

## REMERCIEMENTS

**Au Président du jury.** Tout d'abord, je tiens à remercier le Pr BADENS d'avoir accepté de présider cette soutenance de thèse.

**Aux Membres du jury.** Je tiens à remercier le Pr SOBOL d'avoir accepté que je réalise ma dernière année de formation ainsi que ma thèse d'exercice au sein de son service, ainsi que le Dr REMENIERAS d'avoir accepté d'encadrer ce travail de thèse. Je remercie également les Drs ZATTARA et SABATIER de faire partie de ce jury de thèse.

**Au personnel du laboratoire.** Merci à toute l'équipe du laboratoire d'oncogénétique de l'IPC de m'avoir accueilli et intégré dans l'équipe pendant cette dernière année d'internat.

**À Fred et Jamy,** merci pour toutes ces après-midi sciences & vie à l'heure du goûter.

**À mes parents.** Ça y est, votre petit blondinet en termine à son tour avec le monde des études. Vous me connaissez assez pour savoir que je ne suis pas un grand littéraire, mais au travers de ces quelques lignes, je souhaite vous dire un grand merci. Je suis chanceux d'avoir des parents aimants, qui ont tout donné pour l'épanouissement de leurs enfants. C'est grâce à vous qu'aujourd'hui j'ai toutes les clés en main pour m'épanouir dans ma vie professionnelle ou personnelle.

Je suis fier et heureux d'être votre fils tout simplement. Je vous aime.

**À mes sœurs,**

**Juju,** je souhaite te remercier ici d'avoir été une grande sœur parfaite depuis 27 ans. À travers nos chamailleries, engueulades, moments de complicité, rigolades et gueules de bois, on s'est construit l'un l'autre. Tu m'as appris à cuisiner, à m'affirmer face à des gens têtus et forts de caractère (n'est-ce pas ?) et à m'ouvrir (légèrement) aux autres. Tu as su prendre soin de moi durant notre coloc' pour que je sois dans les meilleures conditions possibles pour réussir mes études. Cette période de cohabitation dans 26 m<sup>2</sup> restera pour moi le meilleur souvenir de ma scolarité.

**Cécouille**, tout d'abord je voudrais m'excuser pour toutes les expériences que j'ai pu mener sur toi jadis. Mais c'était fou comme tu tenais entière dans des endroits improbables. Merci d'avoir accepté d'être mon partenaire de judo à la maison également. Cela étant dit, je suis fier de t'avoir pour sœur et j'ai beaucoup à apprendre de toi. Ce que j'admire chez toi c'est ta joie de vivre et la bienveillance dont tu fais preuve auprès des gens que tu aimes, mais aussi auprès des personnes dépendantes qui te sont inconnues. Je suis heureux d'avoir pour sœur une femme telle que toi.

**À Thomas Bouit**. Je sais ce que tu es en train de te dire à propos de mes études et de mon job « Donc c'est ça la vie qu'il a décidé de mener ??... Kodo ! » Alors même si faire affaire avec toi n'est pas très rentable et que tu m'as piqué ma chambre, je te remercie d'être toujours de bonne humeur et de rendre ma petite sœur heureuse ;).

**À Papi J.P & Nelly**, si je devais choisir un sentier de rando pour décrire tout ce que vous m'avez apporté ce serait le Mare à Monti, en Corse bien sûr ! Je vous remercie de m'avoir donné le goût de la montagne et de la mer dès le plus jeune âge avec toutes ces balades en forêt, ces cueillettes en tout genre, les sorties pêche, etc. Grâce à vous, pendant toutes ces années d'études, j'ai pu me couper du monde et me ressourcer (avec de bons petits plats) quand il le fallait. Merci pour tous ces moments chaleureux passés et à venir.

**À Mitch, Mu, Kathy & Merlin,**

Hélas, on ne choisit pas sa belle-famille quand on rencontre sa chère et tendre. Sachez tout de même que j'ai eu la chance de tomber sur la vôtre. Merci de m'avoir aussi bien accueilli au sein de votre famille (la Ola était peut-être de trop AHA). Et maintenant ? Champagne !

**À mes amis,**

**Chloé, Bryan, Guigui et Fanny**. Après un petit calcul savant rapide, du début du collège à la fin de la faculté, j'ai pu rencontrer plus de 1000 étudiants. Beaucoup de gens passent dans notre vie, mais très peu restent. Alors même si chacun a sa vie aujourd'hui, que l'on ne se voit plus aussi régulièrement, sachez que vous faites partie des personnes que j'apprécie le plus.

**Rob, Armel, Tom, Thibaut, JB, Guigui, Charlotte, Tracy, Camille, Daisy.** On s'est rencontré au début de nos études de Pharmacie il y a 10 ans. Je voulais vous remercier pour tous les moments qu'on a partagé : Soirées étudiantes, activités sportives, révisions pour le concours d'internat, les vacances, les voyages, les réflexions profondes et philosophiques qu'on a pu avoir les gencives pleines AHA. Cette thèse marque la fin d'un chapitre de ma vie, mais je sais que vous faites déjà partie des principaux acteurs du suivant.

**Audrey et Elo.** On n'a pas encore beaucoup de souvenirs à partager ensemble, mais je sais que cela ne saurait tarder. Je suis heureux que vous partagiez la vie de mes meilleurs amis et vous remercie d'être présentes aujourd'hui.

**À Florence, Noémie et Charlotte.** Pour moi vous êtes indissociable de mes 1 an et demi passés à l'IPC. Merci pour toutes ces discussions et débats autour des travaux d'appart, des recettes et robots de cuisine, de la déco et du jardinage. Peu de gens, à part vous, connaissent mon petit côté féminin et l'intérêt que je porte à tous ces sujets. Merci pour tous ces moments.

**Aux Saint-Cyriens : Mat, Anne-So ET Chloémouth !** On se connaît depuis le début de mon internat et je crois que j'ai passé plus de temps chez vous qu'à bosser (j'exagère à peine). Je tenais à vous remercier pour votre accueil qui est toujours généreux depuis toutes ces années et qui nous a permis avec Shirley de nous extirper de la vie marseillaise, ça fait du bien ! Sinon je tenais à remercier Mat pour m'avoir fait découvrir le surf et avoir cassé les côtes de Shirley. Merci à Anne So pour son crumble d'aubergine emblématique (plein de beurre, mais délicieux). Et merci à Mouth pour le petit concerto nocturne à Guéthary, the Voice kids c'est pour bientôt ! Vous êtes de bons parents et de super amis. Merci

**À Soso, Kéké, Omar, Kaka, Raqui, Charlotte, Romains et Toto.** Je vous remercie d'avoir su me faire une place dans votre groupe très soudé. Vous êtes super.

**Shirley.** Bientôt 5 ans que tu partages ma vie et mes humeurs et cela t'a demandé quelques efforts, on est d'accord ^^ . Je te remercie d'avoir toujours été là pour m'encourager, m'apaiser, me secouer ou encore m'empêcher de me terrer dans ma grotte. L'internat m'aura permis de trouver celle qui serait à la fois ma confidente, ma partenaire de sports & d'aventures, celle qui m'accepterait tel que je suis tout en arrivant à me rendre meilleur et celle avec qui je souhaite construire mon avenir. Je suis chanceux de démarrer cette nouvelle phase de ma vie à tes côtés et je suis impatient de concrétiser tous nos projets. Je t'aime.

Ps : que toi et moi qui compte.

## ABRÉVIATION

- BAM : Fichier de séquences alignées
- BGW: Biomedical Genomics Workbench
- CNV: variation du nombre de copies
- CSTN : Cancer du sein triple négatif
- GGC : Groupe Génétique et Cancer
- INCa: Institut National du Cancer
- MMR: réparation de mésappariement
- NGS: Séquençage de nouvelle génération
- NHEJ : Recombinaison non homologue par jonction des extrémités
- OMS: Organisation mondiale de la santé
- SNV: variation de nucléotide
- VAF: fréquence allélique
- VCF: fichier de variants

L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.

# PLAN

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
---------------------	----------

<b>PARTIE I - PRÉDISPOSITION GÉNÉTIQUE : CONTEXTE</b>	<b>3</b>
---	----------

I) RECHERCHE D'UNE PRÉDISPOSITION GÉNÉTIQUE, CHAMPS D'APPLICATION EN PATHOLOGIES HUMAINES	4
II) RECHERCHE D'UNE PRÉDISPOSITION GÉNÉTIQUE, INTÉRÊTS POUR LE PATIENT ET LA SOCIÉTÉ	8
A) <i>Connaître son risque génétique pour une maladie, quels intérêts ?</i>	8
B) <i>Enjeux sociétaux</i>	9
III) RECHERCHE D'UNE PRÉDISPOSITION GÉNÉTIQUE, STRATÉGIES ET PRINCIPE DU SÉQUENÇAGE ?	11
A) <i>Stratégies d'analyses</i>	12
B) <i>Séquençage à haut débit</i>	13
1) Principe général	13
a) Phase 1 : Préparation des échantillons	14
b) Séquençage des libraires	15
c) Analyse bio-informatique	17
2) Caractérisation des variants identifiés – expertise du biologiste	19
IV) RECHERCHE D'UNE PRÉDISPOSITION GÉNÉTIQUE, A QUI CELA S'ADRESSE-T-IL ?	21

<b>PARTIE II - PRÉDISPOSITION GÉNÉTIQUE : APPLICATION AU CANCER DU SEIN TRIPLE NÉGATIF</b>	<b>22</b>
--	-----------

I) PRÉDISPOSITION GÉNÉTIQUE ET CANCER : UN RÉSEAU DIAGNOSTIC	23
II) CANCERS DU SEIN : GÈNES DE PRÉDISPOSITION IMPLIQUÉS ET STRATÉGIE DIAGNOSTIQUE	25
A) <i>Gènes de prédisposition au cancer du sein</i>	26
B) <i>Stratégie diagnostique et thérapeutique</i>	28
1) Exploration par Panel de gènes standardisé : recommandations GGC	28
2) Surveillance et thérapeutique : gène dépendant	30
III) PARTICULARITÉS DU CANCER TRIPLE NÉGATIF	31

<b>PARTIE III : TRAVAIL DE RECHERCHE</b>	<b>33</b>
<i>A) Objectifs</i>	33
<i>B) Matériels et méthodes</i>	33
1) Population étudiée et données collectées	33
2) Échantillonnage et Extraction d'ADN	33
3) Panel de gènes testés	34
a) Groupe Génétique et Cancer	34
b) Protocole TUMOSPEC	34
4) Séquençage à haut débit (NGS)	36
5) Analyse des données	36
<i>C) Résultats</i>	38
1) Cohorte de patientes	38
2) Analyse des variants	38
3) Variant et impact clinique	41
4) TP53 et hématopoïèse clonale	43
<i>D) Discussion</i>	45
<b>CONCLUSIONS &amp; PERSPECTIVES</b>	<b>50</b>
<b>RÉFÉRENCES</b>	<b>54</b>

# INTRODUCTION

Une prédisposition génétique à une pathologie se définit par la présence chez un individu d'une anomalie génétique constitutionnelle entraînant un sur-risque de développer une maladie. Ces anomalies constitutionnelles sont identifiées sur des gènes que l'on qualifie de gènes de susceptibilité et sont impliquées dans de nombreuses pathologies humaines incluant notamment les maladies génétiques rares et les cancers.

L'oncogénétique est une discipline de la génétique humaine, dont l'objectif est d'identifier les personnes porteuses d'altérations génétiques constitutionnelles prédisposantes aux cancers dans le but de leur proposer une prise en charge adaptée. En effet, près de 5% de cancers sont liés à la présence d'altérations génétiques constitutionnelles et parmi les formes héréditaires les plus fréquentes on retrouve le syndrome seins-ovaires. Ce syndrome regroupe de multiples formes de cancers du sein dont le pronostic diffère en fonction de leur localisation, leur profil histologique ou moléculaire. Les cancers du sein triple négatif (CSTN) sont une de ces formes et représentent 10 à 15% de l'ensemble des cancers mammaires. Ils sont notamment définis en immunohistochimie par l'absence d'expression des récepteurs aux estrogènes à la progestérone et par l'absence de surexpression de la protéine HER2/ERBB2. Outre ses caractéristiques immunohistochimiques, cette entité se caractérise notamment par un âge plus jeune au diagnostic, un risque de rechute plus élevé, une plus grande fréquence des métastases pulmonaires et cérébrales, à l'origine d'un pronostic plus sombre (1). Il s'agit cependant d'un groupe hétérogène de cancers du sein du point de vue histologique, moléculaire (génome et transcriptome) et évolutif.

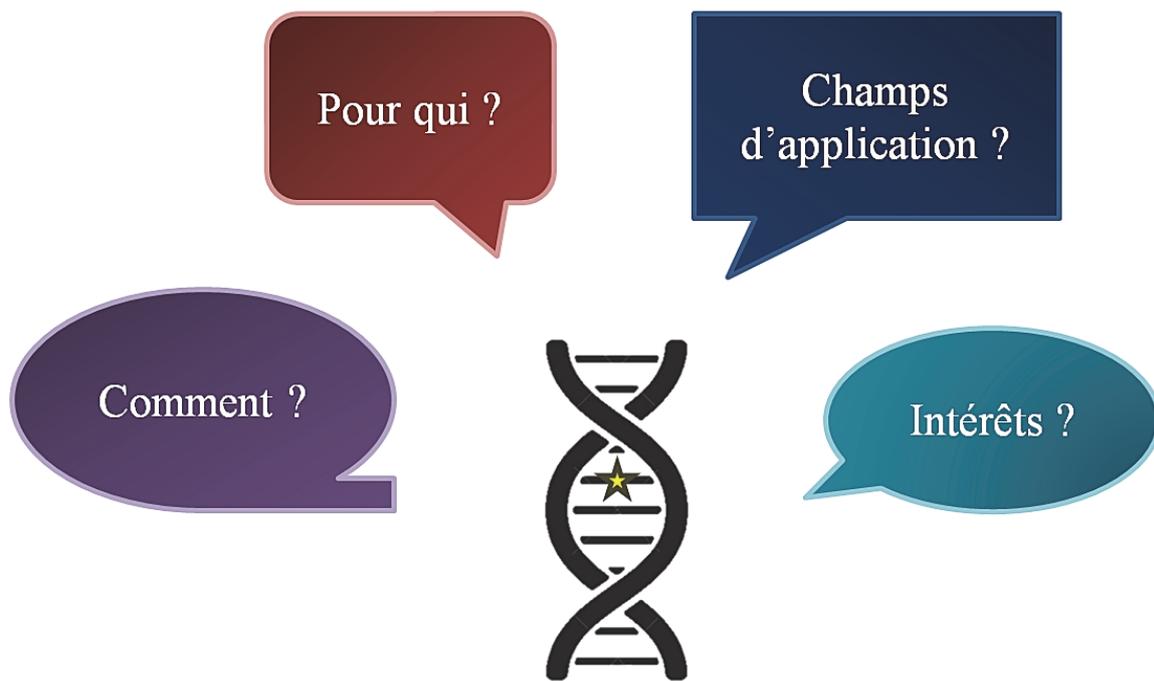
Les gènes majeurs de susceptibilité impliqués dans le syndrome seins-ovaires sont aujourd'hui bien caractérisés incluant notamment les gènes *BRCA1*, *BRCA2* et *PALB2* impliqués dans le mécanisme de réparation des cassures double brins de l'ADN. De plus, depuis 2018, les gènes à analyser en routine au laboratoire d'oncogénétique pour explorer ce syndrome font l'objet de recommandations nationales (2). Cependant, actuellement ces recommandations ne prennent pas en compte le sous-type de cancer du sein. En effet, l'analyse des gènes de prédisposition impliqués dans les cancers du sein triple négatif n'a fait l'objet d'études spécifiques que très récemment pour tenter de mieux comprendre ce phénotype si particulier.

C'est pourquoi, à travers cette thèse nous verrons, dans un premier temps, la place qu'occupe la recherche d'une prédisposition génétique en pathologie humaine, puis dans une seconde partie, nous verrons à travers un travail de recherche que j'ai effectué au laboratoire d'oncogénétique de l'Institut Paoli-Calmettes, à Marseille, le rôle de l'oncogénétique moléculaire dans la prise en charge des patientes atteintes de cancers du sein triple négatif.

PARTIE I  
PRÉDISPOSITION GÉNÉTIQUE :  
CONTEXTE

---

Afin de mieux appréhender la place qu'occupe l'oncogénétique moléculaire dans le parcours de soins des patientes atteintes de cancers, nous allons dans cette première partie, rappeler quels sont les applications et intérêts de la recherche d'une prédisposition génétique en pathologie humaine.



PREDISPOSITION GENETIQUE  
EN PATHOLOGIE HUMAINE

## I) Recherche d'une prédisposition génétique, champs d'application en pathologies humaines

Le modèle le plus « simple » pour illustrer la prédisposition génétique en pathologie humaine est le modèle des maladies héréditaires monogéniques. Il s'agit de pathologies qui sont exclusivement dues à la présence d'une anomalie génétique délétère dans un gène donné. Par exemple, la maladie de Huntington est une maladie neurodégénérative rare du système nerveux central caractérisée par des mouvements involontaires choréiques, des troubles comportementaux et psychiatriques. Cette maladie se manifeste vers l'âge de 30 à 50 ans et est exclusivement due à une expansion de triplets nucléiques CAG répétés (36 répétitions ou plus) dans le gène codant pour l'huntingtine (HTT), protéine impliquée dans le transport de vésicules au niveau des neurones et possédant des propriétés anti apoptotiques (3). L'expansion de triplets CAG entraîne au niveau protéique une expansion de Glutamine responsable d'une modification conformationnelle de la protéine qui perd alors sa fonction de transporteur et induit une dégénérescence neuronale. On sait également que le début de la maladie est d'autant plus précoce que l'expansion de triplets est grande et il n'existe actuellement aucun traitement curatif pour cette maladie. L'identification de cette anomalie génétique chez un individu sain permet donc de prédire la survenue de la maladie puisque la pénétrance est complète (tout porteur de l'anomalie développera la maladie). Une des applications concrètes est de proposer, pour les individus porteurs de la mutation désirant un enfant, la réalisation d'un dépistage prénatal ou un diagnostic préimplantatoire avec fertilisation in vitro. Les maladies rares monogéniques (touchant moins d'une personne sur 2000) sont très nombreuses, environ 7000. Ensemble, elles touchent environ 3 à 4 millions de personnes en France soit 6% de la population (4).

Cependant, la recherche d'une prédisposition génétique ne se cantonne pas aux maladies rares, elle présente également un intérêt majeur dans des pathologies plus communes comme les infections, les maladies complexes ou les cancers.

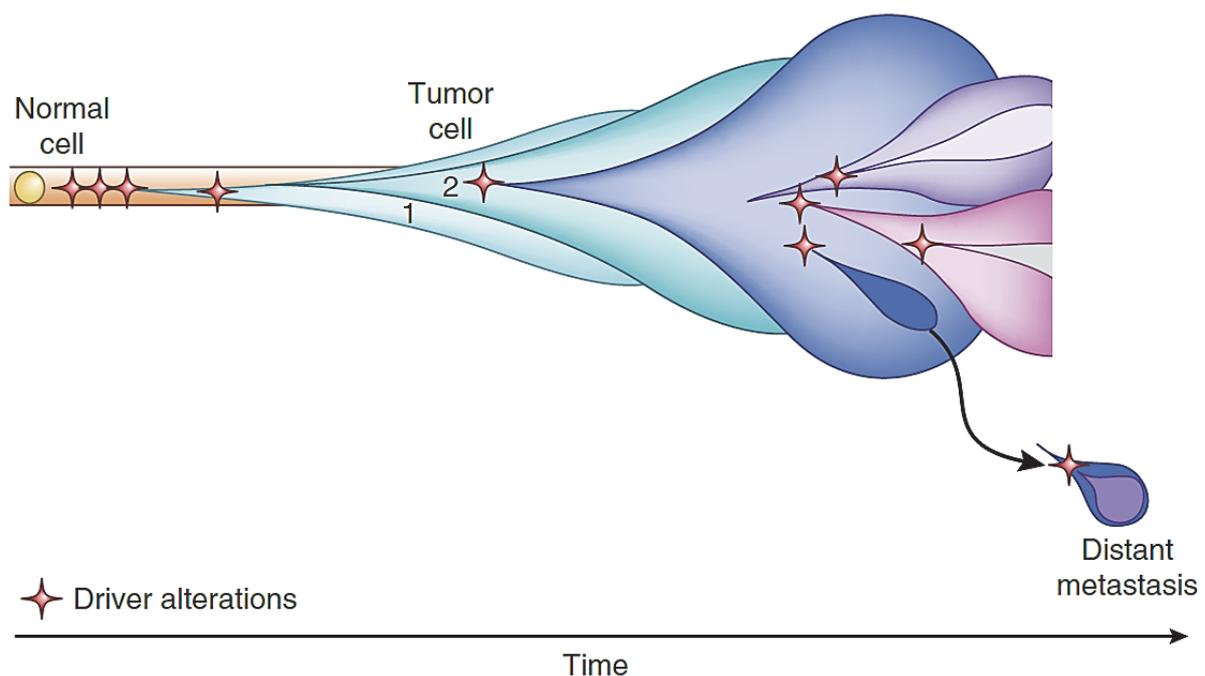
En effet, on pourrait penser que le développement d'une maladie infectieuse ne résulte que de la rencontre de l'hôte avec le pathogène responsable et donc que la cause de la pathologie ne soit qu'environnementale. Hormis les déficits immunitaires héréditaires rares ou acquis qui sont responsables d'une augmentation de la vulnérabilité de l'hôte aux infections, existerait-il un modèle de susceptibilité génétique dont la fréquence dans la population

générale se rapprocherait de la fréquence de l'infection elle-même ? Ceci a été récemment mis en évidence dans la tuberculose, maladie infectieuse provoquée par des mycobactéries du complexe *tuberculosis*. Selon L'OMS, cette infection touche environ 10,9 millions de personnes par an (soit une fréquence population mondiale d'environ 1 sur 1000) et demeure la maladie infectieuse la plus meurtrière avec près de 4000 décès par jour soit environ 1,5 million de personnes par an. Parmi les facteurs de risque d'infection, la promiscuité, la précarité et le manque d'hygiène expliquent que cette infection touche préférentiellement les pays en voie de développement. En 2018, Boisson-Dupuis et al, ont montré que la présence du variant P1104A du gène TYK2 à l'état homozygote chez des individus était un facteur génétique prédisposant cette maladie infectieuse. En effet, ce variant est retrouvé à l'état homozygote à une fréquence de 1/600 individus européens et 1/2500 chez les autres individus. On constate que la fréquence de ce variant est plus importante chez les Européens, moins touchés par la tuberculose. Cette disparité pourrait être la conséquence d'un phénomène de sélection naturelle. En effet les personnes non porteuses de ce variant ont un avantage sélectif en termes de survie face à l'infection ce qui pourrait expliquer que dans les pays à forte prévalence de l'infection (comme les pays en voie de développement) la fréquence du variant de susceptibilité soit moins représentée. Inversement, dans les pays européens, peu touchés par la tuberculose, il n'y a pas de pression de sélection et donc la fréquence de ce variant dans la population européenne est plus importante. Par ailleurs, Boisson- Dupuis et al, ont montré que ce variant perturbe sélectivement l'induction d'IFN- $\gamma$  via l'IL-23, qui est une molécule clé dans l'immunité anti-mycobactérienne et cela augmente donc la susceptibilité à l'infection pour les personnes porteuses de ce variant (5). Une des applications envisagées à long terme par ces auteurs serait de proposer un test génétique aux voyageurs en zone de forte endémie afin d'évaluer leur risque de contracter la maladie et donc de mettre en place des mesures prophylactiques adaptées.

Les maladies dites « complexes » regroupent des pathologies dont les causes sont souvent multifactorielles, associant à la fois une part génétique et une part environnementale (exposition à agents toxiques, alimentation, mode de vie, etc.). Les cas familiaux de maladies complexes (ex.: pathologies cardiovasculaires, obésité) ne suivent pas un modèle de transmission mendélienne classique, car ce n'est pas une altération génétique dans un gène donné qui est à l'origine de la prédisposition, mais une combinaison de variations génétiques fréquentes (appelées polymorphismes) présentes à différents endroits du génome qui vont favoriser l'apparition de la pathologie. Bien qu'une ségrégation familiale de cas soit souvent

observée, la composante génétique est difficile à mettre en évidence. Dans l'obésité, il a été montré que certains comportements alimentaires comme la désinhibition ou encore la susceptibilité à la faim avaient une composante génétique (6). On peut notamment citer le gène FTO (*Fat mass and obesity-associated*) pour lequel deux polymorphismes ont été associés de manière significative à une alimentation émotionnelle, ou encore à une susceptibilité à la faim accrue. Cette composante génétique en partie responsable de ces comportements alimentaires s'ils sont associés à un mode de vie sédentaire peut donc conduire à une maladie aussi commune que l'obésité.

Enfin, les cancers constituent un groupe de pathologies où l'étude de la prédisposition génétique à une place prépondérante. Selon l'Institut National du Cancer, le nombre de nouveaux cas de cancers diagnostiqués en France métropolitaine en 2018 est estimé à 382 000. Le taux d'incidence (standardisé monde) est estimé à environ 3 pour 1000. La transformation d'une cellule saine en cellule cancéreuse est notamment due à la présence d'altérations génétiques sur des gènes clés du fonctionnement cellulaire. Une accumulation de ces altérations génétiques est nécessaire au développement d'une cellule cancéreuse, on peut parler de « quota » d'altérations minimales pour que la transformation en cellule cancéreuse ait lieu (Figure 1). Au sein de ces altérations génétiques, on distingue les mutations « drivers » correspondant à des mutations qui vont induire un avantage de croissance sélectif à la cellule et donc promouvoir le développement du cancer, des mutations « passagers » qui n'induisent pas d'avantage sélectif (7).



**Figure 1: Évolution clonale de la tumeur (8).**

Les mutations « drivers » sont dans la grande majorité des cas acquis au cours de la vie et concernent un nombre limité de cellules. Cependant il existe des formes de cancers liés à une altération génétique constitutionnelle (c'est-à-dire présente dans toutes les cellules de l'organisme, et héritable), et pouvant être responsable de formes familiales de cancer. Le sur-risque de développer un cancer dans ces familles s'explique par le fait qu'elles présentent déjà une altération génétique nécessaire au processus de cancérisation, le « quota » d'altérations nécessaire est donc plus rapidement atteint dans ces familles. En effet, les modèles mathématiques estiment que 5 à 8 mutations drivers sont requises pour le développement d'un cancer (7). Enfin, les gènes de susceptibilités impliqués diffèrent en fonction du type de cancer et à ce jour plus de 80 gènes de prédisposition génétique aux cancers ont été identifiés (9).

Au total la recherche de prédisposition génétique semble intéressante dans de nombreuses situations physiopathologiques. Cependant compte tenu du coût que pourraient induire ces recherches en pratique courante, il est essentiel de se poser la question de l'intérêt réel pour les patients et pour la société.

## II) Recherche d'une prédisposition génétique, intérêts pour le patient et la société

Bien que la recherche de prédisposition génétique se développe dans de nombreux domaines d'applications, prédire l'apparition d'une pathologie n'a de sens que si cela apporte un bénéfice pour le patient et la société. Devant la multiplicité des recherches dans ce domaine et la diversité des situations, la question de l'intérêt est complexe et doit se poser de façon individuelle pour chaque pathologie et peut évoluer au cours du temps en fonction des avancées thérapeutiques.

### A) Connaître son risque génétique pour une maladie, quels intérêts ?

L'intérêt de rechercher une prédisposition génétique est fonction de la pathologie concernée par le test de prédisposition génétique, mais aussi des leviers que l'on peut utiliser pour la prise en charge de cette pathologie. En effet, à l'heure actuelle les tests de prédisposition génétique effectués en France concernent des pathologies pour lesquelles il y a un bénéfice pour la prise en charge du patient. Nous avons déjà énoncé quelques applications concrètes en fonction du champ d'application, mais les enjeux sont beaucoup plus larges.

Dans le cas d'une pathologie ségréguant dans une famille, connaître son statut génétique a plusieurs intérêts. Pour le membre atteint par la maladie, cela permet premièrement d'apporter une explication, de poser le diagnostic, de lui proposer une prise en charge adaptée si elle existe ainsi qu'un conseil génétique en cas de projet d'enfant. Pour les membres apparentés, l'analyse génétique permet d'une part de connaître le risque de développement de la maladie et de proposer des mesures prophylactiques ou de surveillance adaptée, et d'autre part de connaître le risque de transmission à la descendance.



**Figure 2: Exemple de Transmission familiale d'une mutation de prédisposition dans le cancer du sein (10).**

## B) Enjeux sociétaux

Évaluer le risque génétique de survenue d'une pathologie permet le développement d'une nouvelle stratégie de soins appelée médecine « personnalisée », correspondant à une médecine centrée sur le patient et non plus sur la maladie. Cette approche contraste avec l'approche précédente qui consistait à prendre en charge des patients en fonction de leur pathologie uniquement. Dans l'exemple du cancer, grâce à l'analyse génétique au sens large, il existe aujourd'hui des protocoles de chimiothérapies standardisées utilisant des thérapies dites « ciblées » en fonction du profil génétique de la tumeur, mais aussi en fonction des mutations constitutionnelles et donc fonction du patient (ex. : utilisation d'anti-PARP chez les patientes porteuses d'une mutation constitutionnelle et/ou somatique de BRCA). Dans ce cas-là l'analyse génétique a un rôle théranostique. Avec l'avancée des thérapies géniques, on pourrait imaginer de traiter les patients en corrigeant les anomalies génétiques à l'origine de pathologies considérées comme incurable pour le moment, et ce avant même que les patients ne développent la maladie. Cela entrerait dans le cadre d'une médecine dite préventive, dont les applications existent déjà. C'est le cas pour les patientes porteuses d'une mutation constitutionnelle sur un des gènes BRCA qui présentent un sur risque de développer un cancer du sein et/ou de l'ovaire. Actuellement, une chirurgie de réduction de risque (mastectomie bilatérale, annexectomie), peut être proposée chez certaines de ces patientes porteuses d'une mutation constitutionnelle de prédisposition, avant même l'apparition du cancer.

Ces progrès médicaux et technologiques soulèvent de nombreux enjeux bioéthiques. En effet, en France, la bioéthique est encadrée par la loi depuis 1994. De plus, en 2004, l'Agence de la biomédecine a été créée pour encadrer les pratiques et l'accès aux soins dans les domaines de la génétique médicale, des greffes d'organes, de la procréation médicale assistée, de la recherche sur les cellules souches et le diagnostic prénatal et préimplantatoire (<https://www.agence-biomedecine.fr/Decouvrir-l-Agence>). La réalisation des analyses de génétique constitutionnelles est strictement encadrée par cette agence qui délivre après évaluation, un agrément pour 5 ans renouvelable aux laboratoires et aux biologistes souhaitant effectuer ces analyses. Régulièrement, les lois de la bioéthique sont réformées pour s'adapter aux évolutions technologiques, médicales et sociétales. La dernière révision de ces lois date de 2020.

D'un point de vue plus global, au niveau de la société, ces approches bouleversent le dogme de traiter les patients atteints d'une maladie en proposant une prise en charge des patients susceptibles de développer une maladie dans le futur. C'est sur ce principe que repose

la médecine prédictive et préventive. Toutefois, cela nous conduit à l'interrogation suivante : sommes-nous prêts à prendre un traitement, parfois lourd (comme une chirurgie prophylactique) ou changer notre mode de vie pour un risque de développer une pathologie qui ne se développera peut-être jamais ? De nombreuses pathologies sont induites par notre mode de vie, comme les pathologies cardiovasculaires liées à une mauvaise alimentation, ou encore les cancers liés à la consommation de tabac et d'alcool. Bien que les effets néfastes de ces produits soient bien connus, leur consommation perdure.

Nous connaissons le poids du coût des prises en charge sanitaire sur la société à l'heure actuelle (journées d'hospitalisation, prise en charge des complications, thérapeutiques, personnel soignant, etc.). Or il semblerait que prévenir l'apparition d'une pathologie, ou adapter les soins en fonction du patient permettrait de réduire drastiquement ces coûts.

Cependant les analyses nécessaires à la recherche d'une prédisposition génétique ont elles-mêmes un coût non négligeable justifié d'une part par le matériel utilisé qui fait intervenir des technologies de pointe développées très récemment (automate de séquençage, réactifs, serveurs pour le stockage des données générées, ordinateurs pour l'analyse informatique) et d'autre part par le personnel spécialisé nécessaire à la réalisation et à l'interprétation des résultats (technicien, bio informaticien, biologiste). Ainsi, l'optimisation de la balance-bénéfice/coût demanderait une analyse multifactorielle, fine et globale de la situation pour chaque pathologie.

### III) Recherche d'une prédisposition génétique, stratégies et principe du séquençage ?

Le premier élément dont il faut avoir connaissance c'est le progrès technologique qui s'opère depuis une dizaine d'années avec notamment l'arrivée du séquençage à haut débit. Cela a permis le développement et la démocratisation des laboratoires capables de réaliser ces analyses génétiques et donc a fortiori permet une diminution du coût d'analyse. À titre de comparaison le séquençage du 1<sup>er</sup> génome humain a fait l'objet d'une coopération internationale, « the Human genome project » qui a duré 13 ans (de 1990 à 2003) et qui a coûté environ 3 milliards de dollars. Aujourd'hui un génome humain peut être séquencé dans un seul laboratoire en 1 semaine pour un coût d'environ 1000 dollars, demain pour environ 100 dollars.

Cela étant dit, il reste encore des progrès en faire, car il n'existe pas une technique d'analyse unique permettant de rechercher de manière fine l'ensemble des anomalies génétiques potentielles. En effet le séquençage à haut débit permet actuellement de détecter de manière très sensible les variations de petites séquences d'ADN comme les single nucléotides variations (SNV) ou les petites insertions ou délétions, mais n'est pas encore l'outil le plus fiable pour détecter les réarrangements de grande taille (grandes insertions, délétions ou encore les réarrangements chromosomiques équilibrés).

La multiplicité des techniques d'analyse fait qu'encore peu de laboratoires ont la capacité de réaliser ces analyses et que celles-ci coûtent encore chères.

Donc concrètement comment opère-t-on pour rechercher une prédisposition génétique ? Nous allons voir dans un premier temps, les stratégies d'analyses qu'il est possible de mettre en œuvre aujourd'hui avant d'exposer le principe technique du séquençage à haut débit et le traitement des données de séquençage générées.

## A) Stratégies d'analyses

3 stratégies de séquençage de l'ADN sont possibles comportant toutes des avantages et des inconvénients. La première est une stratégie de recherche dite « ciblée », on va séquencer et étudier uniquement un panel de gènes d'intérêts pour une pathologie donnée. Ce panel est établi en fonction de recommandations scientifiques ou d'une revue de la littérature. À titre d'exemple en cas de suspicion de prédisposition génétique au cancer du sein et/ou de l'ovaire, le Groupe français de Génétique et Cancer (GGC) recommande actuellement l'exploration génétique de 13 gènes d'intérêts, validés comme étant responsables d'un surrisque de cancer en cas de variation génétique délétère (2). Cette stratégie, la moins coûteuse à l'heure actuelle permet de générer des données de bonne qualité et de volume raisonnable donc facilement stockable. Par ailleurs ces données relativement limitées sont rapidement analysables. L'inconvénient majeur de cette stratégie c'est que l'on étudie ce que l'on connaît déjà, c'est-à-dire uniquement les gènes déjà connus comme impliqués dans la pathologie. Si dans l'avenir on découvre d'autres mécanismes génétiques responsables de la pathologie (par exemple autre gène impliqué, mécanisme épigénétique, etc.), on ne pourra pas ré analyser les données brutes séquencées en fonction de l'actualité des connaissances scientifiques. Il faudra refaire un nouveau séquençage incluant les nouvelles cibles d'intérêt.

La deuxième stratégie est le séquençage de l'exome du patient, correspondant globalement au séquençage de l'ensemble des séquences codantes d'une personne. L'homme contient dans son ADN environ 20 000 gènes. Pour information ces gènes sont composés entre autres d'un enchaînement d'introns (séquences non codantes) et d'exons (séquences codantes, contenant l'information génétique utile à la synthèse de l'ARN, puis des protéines). Pour résumer, cette stratégie permet d'analyser l'ensemble des gènes du patient. Cela génère donc une masse de données plus importante, donc plus temps d'analyse et espace de stockage nécessaire plus important. Mais cela soulève une question, en analysant tous les gènes, on risque de trouver une altération génétique impliquée dans une autre pathologie que celle pour laquelle l'analyse est prescrite. Que faire alors de cette information ? Pour éviter cela, des filtres informatiques sont mis en place afin que seuls les gènes impliqués dans la pathologie à explorer soit analysés. Cela revient à une étude de panels de gènes en somme ? Pourquoi réaliser une analyse de l'exome alors ? En cas de nouvelles recommandations sur les gènes à étudier, il suffira de modifier le filtre informatique pour ré analyser les nouveaux gènes d'intérêt. Cela conduit à un gain de temps et d'argent (pas besoin de re séquencer l'ADN du patient).

Enfin, il existe une alternative au séquençage de l'exome entier, l'exome clinique correspondant au séquençage de l'ensemble des parties codantes des gènes connus en pathologie humaine. Ceci permet notamment de diminuer le nombre de gènes étudiés et ainsi restreindre la masse de données générées.

Dernière stratégie, le séquençage du génome entier c'est-à-dire des 20 000 gènes exons et introns compris. Cette stratégie génère un maximum de données, très volumineuses à stocker (environ 3.5 Go de données par patient). L'ensemble des données génétiques sont alors disponibles. Avec les techniques de séquençage actuelles, la qualité du séquençage d'un génome humain reste moindre comparée à un panel de gènes ou d'un exome. La quantité de bases à générer étant largement supérieure, la profondeur des séquences sera donc moindre lors d'un séquençage d'un génome par rapport à un exome ou un panel.

À l'heure actuelle, la stratégie privilégiée au laboratoire reste la stratégie ciblée par panel de gènes. Avec la diminution progressive des coûts et l'amélioration des techniques de séquençage, le séquençage de l'exome tend à se développer. Une fois la stratégie choisie, comment s'effectue en pratique le séquençage et comment sont interprétées les données obtenues ?

## B) Séquençage à haut débit

### 1) Principe général

Depuis une dizaine d'années, le séquençage de l'ADN fait l'objet d'une révolution technologique et une multitude de technologies ont été développées et sont en cours de développement. Certaines de ces techniques séquent des fragments courts de l'ADN (jusqu'à environ 600 paires de bases) puis ces fragments sont assemblés (par homologie de séquences) à la manière d'un puzzle pour définir la séquence complète tandis que d'autres technologies tentent de séquencer de longs fragments (plusieurs kbases) voire la molécule unique originelle directement, mais le taux d'erreurs de séquences est encore trop important pour envisager une utilisation pour un examen de biologie de routine (11). Chacune de ces technologies présente des avantages et des limites. Ici, nous allons uniquement exposer la technologie développée par Illumina basée sur le séquençage de courts fragments d'ADN sur séquenceur MiSeq, qui est la technologie la plus répandue sur le marché et celle que nous avons utilisée au cours de ce travail de thèse.

### a) Phase 1 : Préparation des échantillons

Avant le séquençage proprement dit, une phase de préparation des échantillons est nécessaire.

Premièrement la fabrication de la librairie d'ADN du patient (Figure 3.A). Une librairie est composée de l'ensemble des séquences (fragmentée) d'ADN d'intérêt que l'on souhaite séquençer. Si notre panel de gènes d'étude est composé de 10 gènes, la librairie sera composée de l'ensemble des séquences codantes (couverture) de ces 10 gènes en quantité suffisante pour être séquençée avec une bonne sensibilité (profondeur).

Pour obtenir ces librairies, plusieurs grandes étapes sont nécessaires :

- **Fragmentation enzymatique** de l'ADN génomique du patient. La technique d'Illumina est une technique de séquençage de courtes séquences.
- **Ligation des adaptateurs** aux extrémités des fragments. Ces adaptateurs contiennent à la fois des index (petites séquences, p5, p7, i5, i7) qui vont servir lors de l'étape de séquençage des fragments ainsi qu'un barcode moléculaire (= étiquette moléculaire) permettant de rattacher les fragments à un patient donné. Ceci permet par la suite de pooler plusieurs librairies d'ADN de patients et de les traiter simultanément. Grâce à l'analyse bio-informatique ultérieure, les séquences générées seront réattribuées pour chaque patient en fonction de ce barcode moléculaire.
- **Sélection des fragments** par la taille. On souhaite garder idéalement des fragments compris entre 300 et 700 bp
- Pool des différents échantillons faisant l'objet de l'analyse
- **Amplification** de tous les fragments sélectionnés par une PCR universelle. Qualification et quantifications des produits de PCR.
- **Isolement et enrichissement des séquences** des gènes d'intérêts. Pour cela deux techniques existent :
  - Par amplification des séquences d'intérêts (en utilisant des amorces spécifiques des régions d'intérêt)
  - **Par Capture** grâce à l'hybridation de sondes qui vont reconnaître les séquences d'intérêt. Un lavage va permettre de ne garder que les séquences hybridées donc d'intérêts. D'une manière générale, cette technique offre des performances supérieures à la technique par amplification. En effet, bien que la technique par capture soit généralement plus coûteuse, plus chronophage et nécessite une quantité d'ADN initiale plus importante, elle permet d'obtenir une couverture des

séquences plus uniforme même dans les régions riches en G-C, est plus sensible et plus spécifique que la technique par amplicon (12) . Dans notre travail, le kit utilisé repose sur une méthode capture.

## - **Lavages et qualification des librairies finales**

### **b) Séquençage des librairies**

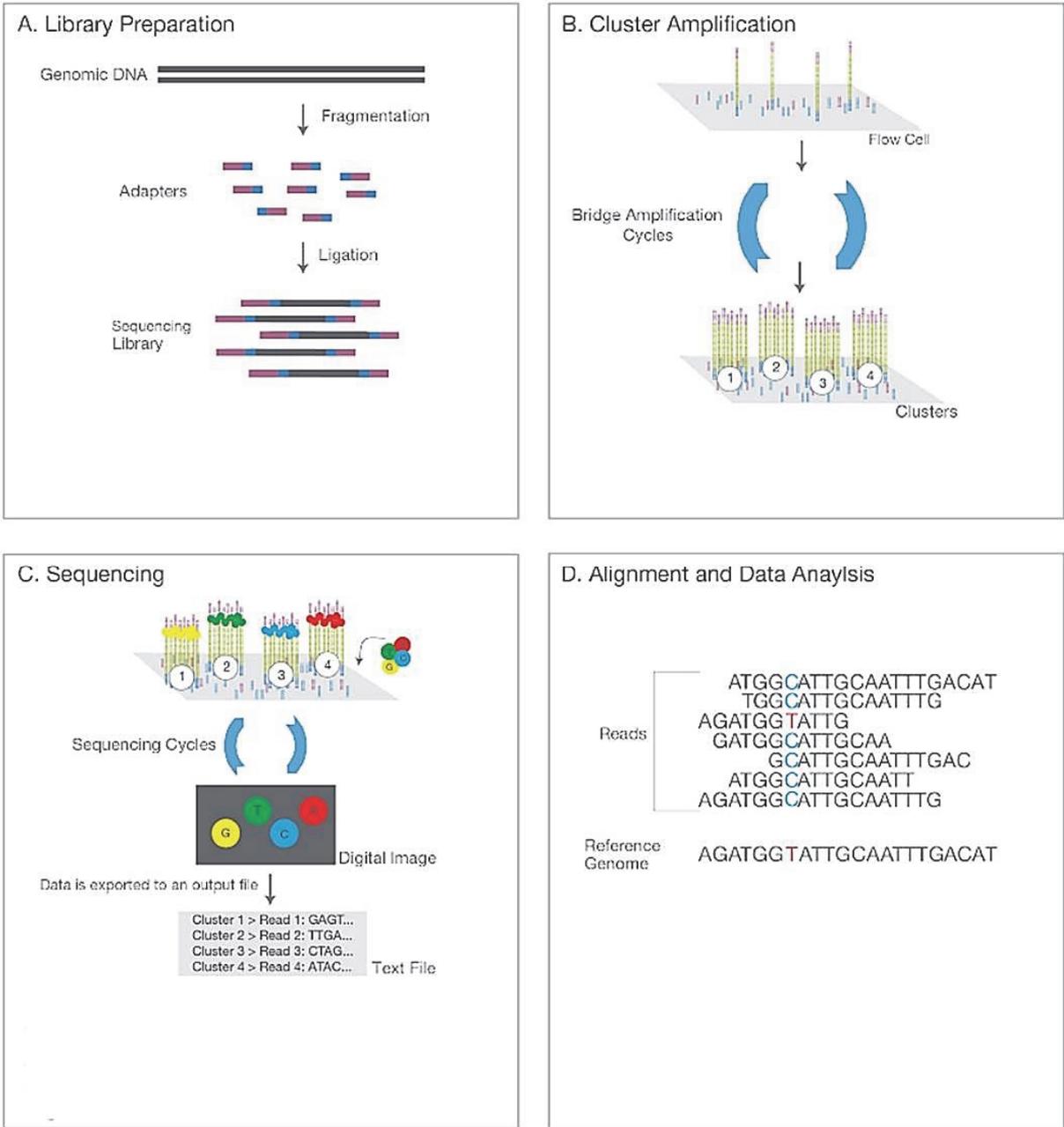
Avant le séquençage proprement dit, dans l'automate de séquençage d'Illumina, les librairies vont d'abord être amplifiées en un grand nombre de copies afin d'augmenter le nombre de reads qui seront séquencés ce qui permet d'augmenter la qualité du séquençage.

On parle d'amplification en clusters. Les fragments d'ADN contenus dans la librairie vont venir se fixer sur un support solide (flow cell) tapissé d'amorces reconnaissant les adaptateurs situés aux extrémités des fragments d'ADN. Il s'en suit une série de cycles d'amplification de chacun de ces fragments pour générer des clusters d'environ 1000 copies identiques du fragment. (Figure 3.B)

Une fois les clusters générés, l'étape de séquençage démarre. Lorsque la séquence est lue par l'ADN polymérase, elle y fixe son dNTP complémentaire. Chaque dNTP libre est couplé à un fluorochrome. Il y a donc 4 fluorochromes différents (un pour chaque base pour le MiSeq). Lorsque le dNTP est fixé à sa base complémentaire, un signal fluorescent est émis (émission de photon). Le dNTP suivant ne peut pas s'incorporer à la séquence temps que le dNTP fixé n'a pas émis sa fluorescence. L'utilisation de ces dNTP terminateurs « réversibles » permet une synchronisation des émissions de fluorescence au sein du cluster. Une fois le signal fluorescent émis, il est capté par des caméras puis un traitement informatique va permettre de générer un fichier de séquences à partir des images prises. (Figure 3.C).

Lorsque tous les clusters ont été séquencés, une étape de démultiplexage des séquences permet de réattribuer les séquences au patient. En effet grâce au barcode moléculaire ligué lors de la préparation de la librairie de chaque patient, on peut « faire le tri » des séquences et les réattribuées à chaque patient.

Un fichier de séquence contenant l'ensemble des informations relatives au run (identification, séquences, qualité des séquences) est généré au format FASTQ pour chaque échantillon.



**Figure 3 : principales étapes du séquençage haut débit – MiSeq Illumina. (13)**

### c) Analyse bio-informatique

#### - Génération des fichiers :

À partir du Fichier FASTQ, plusieurs fichiers vont être générés bio informatiquement.

Le trimming des adaptateurs et l'alignement des séquences par rapport à une séquence génomique de référence (Figure 3-D) permettent de générer un fichier .BAM (Binary Sequence Alignment Map), fichier de mapping utilisé notamment pour visualiser l'alignement des reads.

Enfin une étape d'annotation, permet de générer un fichier au format .VCF (Variant Call Format) contenant l'ensemble des variants de séquences identifiées et les informations associées (coordonnées génomiques, nomenclature du variant en c. p., fréquence allélique, etc.).

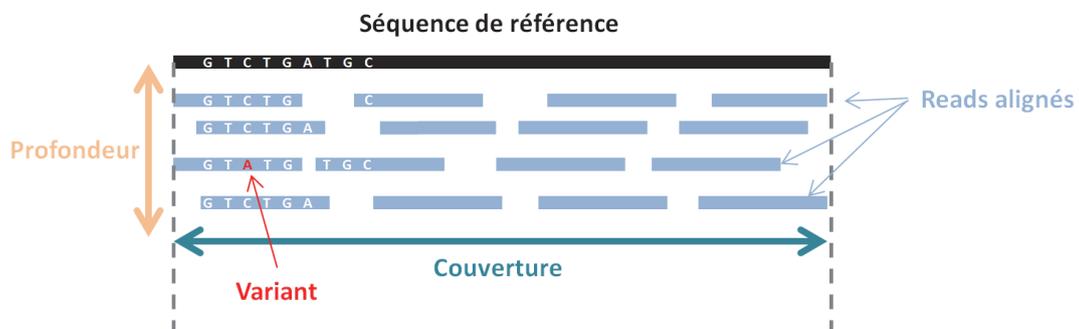
#### - Analyse qualité du run de séquençage :

Plusieurs éléments déterminent la qualité globale du séquençage des échantillons, par exemple le nombre de reads générés pour chaque échantillon ou encore la densité de clusters produit sur la flow cell.

Par ailleurs, deux paramètres qualifient la qualité d'une séquence : la couverture et la profondeur. La couverture correspond au pourcentage que couvre l'ensemble des reads générés par rapport à la séquence d'intérêt cible (Figure 4). Autrement dit en alignant l'ensemble des reads, on cherche couvrir l'intégralité zone cible que l'on veut étudier. L'objectif étant donc d'avoir une couverture complète de 100%. La profondeur de séquençage correspond au nombre de fois qu'une base à une position donnée a été séquencée (Figure X). En effet, comme vu lors de la préparation des échantillons, l'ADN fragmenté est amplifié par PCR afin d'obtenir un nombre important d'un même fragment. Cette profondeur est importante, car elle définit la sensibilité de détection de la technique dans la recherche de variant de séquence. Dans la Figure 4, un variant de séquence est détecté (en rouge : remplacement d'un C par un A). Cette variation est présente sur 1 read sur 4 pour une profondeur totale de 5X (base séquencée 5 fois à cette position). Par conséquent une augmentation de la profondeur de séquençage permet d'augmenter la sensibilité de détection de variant. Sachant cela, quelle profondeur choisir ? Cela dépend de ce que l'on cherche.

Schématiquement, lors d'une analyse génétique constitutionnelle, la plupart des fréquences alléliques des variants que l'on cherche à identifier se situent aux alentours de 50% si présents à l'état hétérozygote ou aux alentours de 100% si présents à l'état homozygote (en excluant le mosaïcisme génétique). Cela veut dire qu'un read sur deux à minima présentera la mutation lors du séquençage. Il n'est donc pas nécessaire d'avoir une profondeur de lecture très importante pour détecter le variant de manière fiable (une profondeur > 30X est suffisante).

En revanche, lors d'une analyse génétique somatique, on cherche à identifier un variant dans une population tumorale qui est hétérogène. L'ensemble des cellules constituant la tumeur ne contient pas la même information génétique, et le variant cherché ne peut être présent que dans une sous population tumorale. Le variant à rechercher peut être présent uniquement dans 5% des cellules tumorales constituant l'échantillon analysé. La profondeur de séquençage doit alors être beaucoup plus importante (>100X, 200X, 300X : en fonction du laboratoire d'analyse) pour détecter un variant peu représenté (= effet de dilution).



**Figure 4: Couverture et profondeur de séquençage**

## 2) Caractérisation des variants identifiés – expertise du biologiste

Une fois le fichier .VCF généré, celui-ci contient l'ensemble des variants identifiés chez un patient pour tous les gènes d'intérêt étudiés. Par conséquent plus le nombre de gènes analysé est grand, plus le nombre de variant de séquence identifié sera important (plusieurs centaines à plusieurs milliers).

Un variant de séquence n'est ni plus ni moins qu'une modification de la séquence d'ADN à une position donnée chez un individu par rapport à une séquence de référence. Elle ne signifie en aucun cas une quelconque pathogénicité. Il faut donc à partir de ce listing de variants générés, faire le tri entre ce qui relève d'un artefact de séquençage, d'un polymorphisme génétique (variant de séquence non délétère dont la fréquence dans la population générale n'est pas rare) ou encore d'un variant délétère dont la présence expliquerait la causalité de la maladie. C'est ce que l'on appelle la caractérisation des variants.

Pour effectuer cette caractérisation, le biologiste médical a recours à divers outils afin de colliger un certain nombre d'informations relatives à chaque variant ci-dessous :

- Pathologie moléculaire du gène : spectre mutationnel des variants pathogènes rapportés pour le gène (résistance à l'haplo insuffisance, mutations faux sens, non-sens, cnv)
- Données épidémiologiques (bases locus spécifiques et populations-contrôle)
- Données structurales de la protéine (domaines fonctionnels)
- Données bibliographiques (revue de la littérature scientifique sur le variant)
- Données de ségrégation, de pénétrance
- Le mode de transmission de la maladie associée à ce gène
- Données fonctionnelles (étude de l'impact du variant sur l'épissage, la fonction de la protéine, impact cellulaire, etc.).
- Critères cliniques et généalogiques

Le recueil de ces informations fait l'objet d'une harmonisation grâce notamment au réseau NGS diag (14), qui a pour but d'homogénéiser l'interprétation des variants entre les différents laboratoires d'analyses au niveau national. À partir des informations recueillies, un système de classification en 5 classes de pathogénicité a été recommandé pour la première fois en 2008 pour l'interprétation des variants des gènes de susceptibilité au cancer (15) . Cette classification différencie 5 classes de pathogénicité :

- Classe 1 : variant bénin
- Classe 2 : variant probablement bénin
- Classe 3 : variant de signification inconnue
- Classe 4 : variant probablement délétère
- Classe 5 : variant délétère

La stratégie de caractérisation des variants reste cependant imparfaite, et nécessite encore d'être améliorée. Une classification codifiée est une classification reposant sur des critères stricts. Lors de la caractérisation de variants, la collection d'informations peut suggérer une pathogénicité, mais celle-ci ne sera pas rendue faute de répondre aux critères de la classification. Par exemple un variant rapporté délétère dans la littérature, dont la ségrégation familiale est montrée ne sera pas interprété en classe 5 si aucune étude fonctionnelle ne confirme le caractère causal de ce variant.

De plus, la classification d'un variant n'est valable qu'à l'instant T où le biologiste rend le résultat, car celui-ci repose sur des données scientifiques qui sont susceptibles d'évoluer. Cela pose le problème du reclassement des variants et de l'implication de ce reclassement dans la prise en charge du patient.

En effet, un variant dont la pathogénicité est inconnue en 2020 (variant de classe 3), ne sera pas forcément rendu au clinicien lors de l'émission du compte rendu d'analyse (fonction du laboratoire). En 2025, les avancées scientifiques mettent en évidence le caractère délétère de ce variant et celui-ci est reclassé en variant de classe 5. Cela soulève bon nombre d'interrogations, faut-il organiser un système de veille scientifique permettant la réévaluation des variants de façon récurrente ? Faut-il communiquer au clinicien les variants de signification inconnue de manière systématique ? Si oui est ce bien utile dans la prise en charge du patient ? Faut-il tenir un registre des patients porteurs d'un variant de signification inconnue, et émettre un nouveau compte rendu dès que le variant sera reclassé ? Comment organiser tout cela ?

#### IV) Recherche d'une prédisposition génétique, A qui cela s'adresse-t-il ?

Plusieurs paramètres sont à prendre en considération. Tout d'abord, dans le cas des maladies monogéniques comme des cancers, la notion de ségrégation familiale de la maladie est un argument fort d'une composante génétique sous-jacente. Pour les cancers, l'âge du diagnostic est également un argument fort. Comme nous l'avons vu précédemment, en cas de prédisposition génétique, le quota d'anomalies génétiques nécessaires à la transformation cancéreuse d'une cellule sera atteint plus rapidement qu'une personne sans prédisposition, donc aura un âge au diagnostic globalement plus jeune. Pour évaluer chez qui rechercher une prédisposition génétique, des consultations d'oncogénétique sont réalisées. Lors de ces consultations, l'utilisation d'algorithmes (ex Bodicea, Manchester) permet d'établir un score de risque génétique de développer un cancer à partir de divers arguments comme le contexte familial, l'âge au diagnostic, les antécédents, etc. Une fois ce score établi, cela va aider l'onco-généticien dans sa prise de décision relative à l'exploration par des tests génétiques, mais aussi la surveillance à mettre en place pour chaque patient.

Pour le cas des infections, ou des maladies complexes, les candidats à une analyse génétique seraient beaucoup plus nombreux, voyageurs en zone de forte endémie comme cela pourrait être le cas pour la tuberculose ou encore l'ensemble de la population dans le cas de l'obésité afin que les personnes porteuses d'une susceptibilité génétique puissent adapter leurs modes de vie (suivi nutritionnel, activité physique, etc.).

Pour conclure, nous avons vu lors de cette première partie ce que peut apporter d'une manière globale la recherche d'une prédisposition génétique en pathologie humaine. Dans une seconde partie, nous allons maintenant étudier les prédispositions génétiques dans une pathologie concrète : les cancers du sein triple négatif chez la femme, qui fait l'objet de ce travail de thèse.

## PARTIE II

### PRÉDISPOSITION GÉNÉTIQUE :

### APPLICATION AU CANCER DU SEIN TRIPLE NÉGATIF

---

Selon le dernier rapport de l'Institut national du cancer (INCa) publié en Juillet 2019, le cancer du sein est à la fois le plus fréquent, mais aussi le plus meurtrier chez la femme. En 2018, 58 459 nouveaux cas ont été diagnostiqués en France métropolitaine et on estime à 12 146 le nombre de décès malgré une diminution de la mortalité de 1,5% par an en moyenne depuis 2005 (16).

Les principaux facteurs de risque de développer un cancer du sein sont l'âge, le pays de naissance et la présence d'antécédents familiaux de cancer du sein, surtout si un contexte génétique a été mis en évidence. (17). En effet, la majorité des cancers du sein sont qualifiés de sporadiques, cependant on estime qu'entre 5 et 10% des cancers du sein seraient liés à une altération génétique constitutionnelle.

Les altérations génétiques responsables de ces cancers sont transmissibles à la descendance et peuvent être recherchées chez des personnes dont les antécédents médicaux, personnels et/ou familiaux, sont évocateurs d'une forme héréditaire de cancer.

L'oncogénétique est une discipline médicale dont le but est d'identifier et prendre en charge les familles présentant des variations dans ces gènes de prédisposition.

## I) Prédisposition génétique et cancer : un réseau diagnostic

En France, un réseau national d'oncogénétique permet l'accès au diagnostic des prédispositions aux cancers. Celui-ci s'organise autour de 149 sites de consultation distribués dans 104 villes du territoire. Les tests génétiques prescrits lors de ces consultations sont réalisés au sein d'un réseau de 26 laboratoires (Figure 5) qui possèdent chacune des expertises dans certains spectres de cancers (sein-ovaire, digestif, endocrinien, etc.) (9).

Ce réseau correspondant au Groupe Génétique et Cancer (GGC) a été créé en 1991 et a pour objectif d'identifier les personnes prédisposées héréditairement aux cancers, qu'il s'agisse de personnes malades (cas index) ou de membres non malades de leur famille (apparentés) et de proposer un suivi spécifique. Pour cela ce groupe a pour missions d'élaborer, diffuser et coordonner les bonnes pratiques cliniques et d'analyses biologiques lors de la prise en charge des patients et de leurs familles.

Des programmes de recherche sont également mis en place par ce groupe visant à améliorer la prise en charge clinique, mais aussi les connaissances biologiques sur les variants de prédisposition (identification de nouveaux gènes, caractérisation de variants).

Les tests génétiques ne sont réalisés qu'après une consultation d'oncogénétique. Celle-ci a pour but de décider pour quelle famille il y a une indication en fonction du contexte clinique. Cela passe par le recueil de nombreuses informations comme l'âge d'apparition des cancers dans la famille, le sexe des personnes, le type de cancer (histologie, statut primitif ou métastatique, bilatéralité, sévérité de l'infiltration). Un arbre généalogique et une analyse de ségrégation des cas de cancers dans la famille sont également réalisés au cours de cette consultation. Si une composante héréditaire est suspectée dans la famille, une analyse moléculaire sera proposée au meilleur candidat de la famille en fonction des informations collectées (ex. cancer le plus jeune dans la famille, cancer le plus évocateur du spectre). Lors de cette analyse moléculaire, seuls les gènes impliqués dans le spectre seront étudiés comme par exemple les gènes impliqués dans les cancers du spectre sein-ovaire.

► Carte de France des laboratoires d'oncogénétique

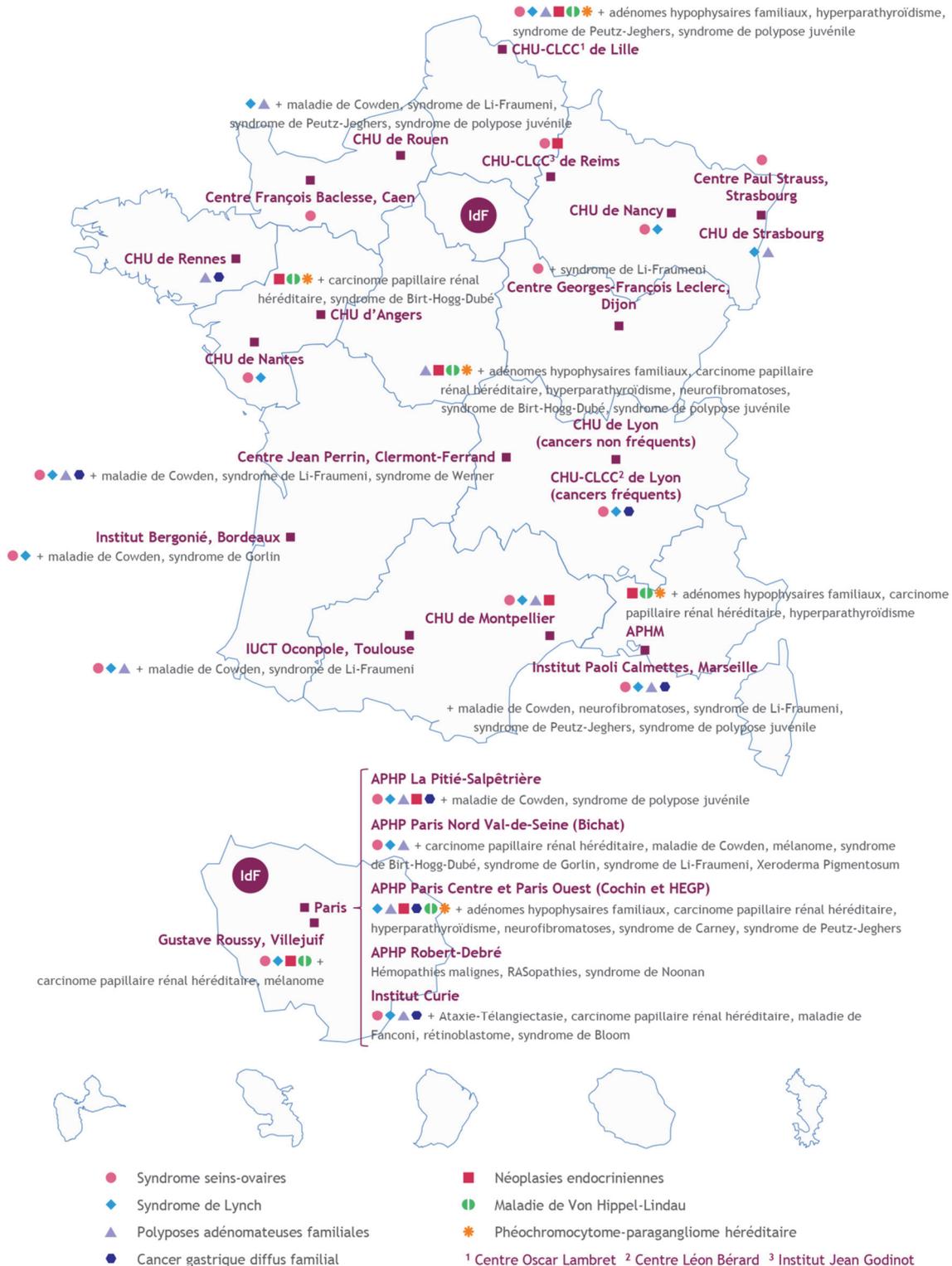
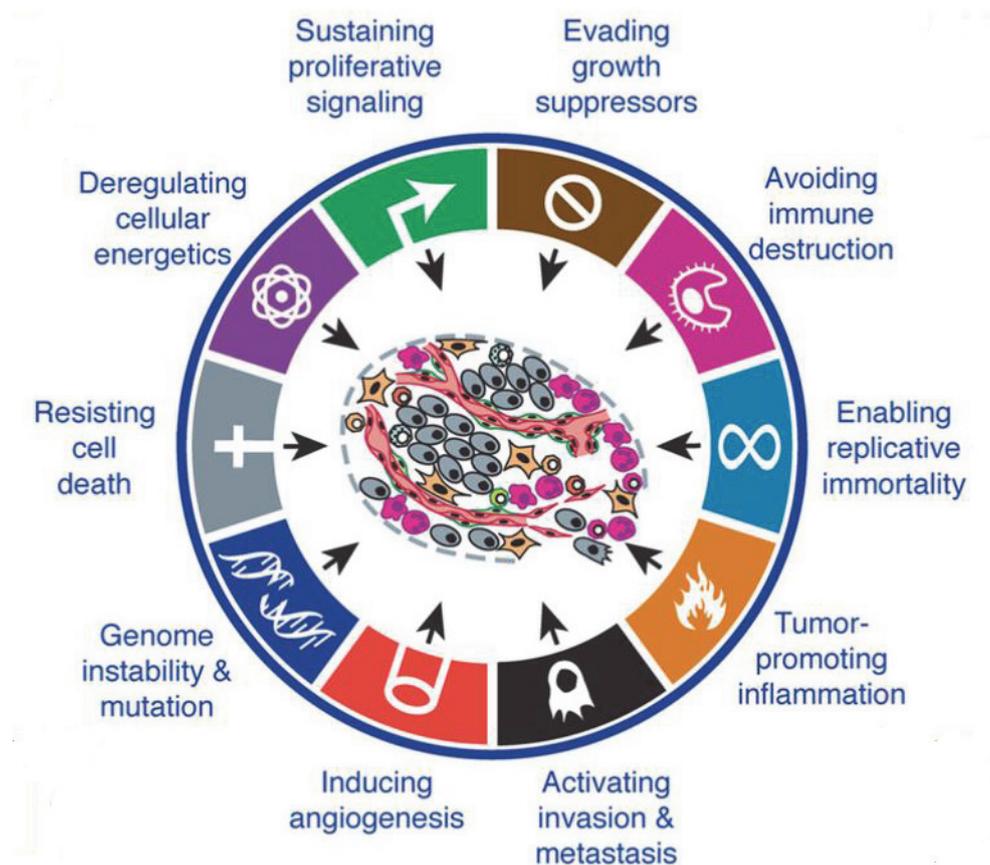


Figure 5: Réseau français des laboratoires d'oncogénétique

## II) Cancers du sein : gènes de prédisposition impliqués et stratégie diagnostique

Une cellule tumorale présente des caractéristiques qui lui sont propres par rapport à une cellule saine. En effet, la succession d'altérations génétiques au cours de la tumorigénèse permet à la cellule d'acquérir des propriétés communes à toutes les cellules cancéreuses comme l'immortalité cellulaire (résistance aux processus d'apoptose), résistance au système immunitaire, capacité de prolifération, instabilité génomique, capacité d'invasion et de métastase (18). L'ensemble de ces caractéristiques sont schématisées dans la Figure 6 ci-dessous.



**Figure 6: Caractéristiques biologiques des tumeurs (18)**

Par conséquent les gènes impliqués dans la prédisposition au cancer du sein ont un rôle dans un de ces systèmes biologiques.

## A) Gènes de prédisposition au cancer du sein

L'instabilité génétique est un des points clés du processus de tumorigénèse. En effet, c'est grâce à cette instabilité génétique que des mutations drivers vont survenir et permettre l'obtention des caractéristiques biologiques propres aux cellules cancéreuses.

Les lésions de l'ADN peuvent être de diverses natures. Par exemple, il peut s'agir d'une cassure (simple brin ou double brin), d'une erreur d'appariement de bases lors de la réplication, de lésions UV, d'oxydation ou désamination de bases, etc. Pour corriger et préserver l'intégrité de la séquence d'ADN, il existe 6 systèmes de réparation qui vont intervenir en fonction du type de lésion.

L'altération d'un de ces systèmes de réparation est un des premiers événements nécessaires au processus de tumorigénèse. C'est pourquoi bon nombre de prédisposition génétique aux cancers du sein survient dans des gènes impliqués dans les processus de réparation de l'ADN.

En effet, le syndrome seins-ovaires est une prédisposition génétique à transmission autosomique dominante liée le plus souvent à la présence d'une altération génétique constitutionnelle de deux gènes (19) :

- Le gène BRCA1 (Breast cancer gene 1) situé sur le chromosome 17.
- Le gène BRCA2 (Breast cancer gene 2) situé sur le chromosome 13.

Ces deux gènes interviennent dans un des systèmes de réparation de l'ADN, essentiel dans le maintien de la stabilité génétique des cellules, la recombinaison homologue.

Pour rappel, la recombinaison homologue est basée sur une restauration fidèle de la séquence d'ADN lésée grâce à l'utilisation de la séquence homologue du chromosome non endommagé qui va servir de modèle-support pour la réparation (20). D'autres protéines interviennent dans ce système de réparation et interagissent avec les protéines BRCA1 et BRCA2, notamment PALB2, cofacteur de BRCA2 dont le gène du même nom est également associé à un risque élevé de cancer du sein.

De plus, en fonction de la présentation clinique familiale (ex. : différents types de cancers au sein de la famille), d'autres gènes candidats peuvent être explorés. En effet, plusieurs gènes sont associés à la fois à un sur risque élevé de cancer du spectre sein-ovaire et d'autres cancers parmi lesquels (21) :

- Le gène PTEN, principalement impliqué comme régulateur de la voie signalisation PI3K. Ce gène est responsable de la maladie de Cowden ou maladie des hamartome multiples prédisposant à des cancers viscéraux multiples.
- Le gène CDH1 codant pour une E-cadhérine impliquée dans l'adhésion cellulaire. Le carcinome gastrique diffus héréditaire est dû à la présence de mutation sur ce gène.
- Le gène STK11 code pour protéine à activité kinase impliquée la transmission du signal de nombreuses voies. Ce gène est responsable du syndrome de Peutz-Jeghers, une polypose hamartomateuse digestive rare, mais est aussi impliqué dans la prédisposition de nombreux autres cancers (intestin grêle, pancréas, endomètre, testicule et sein).
- Le gène TP53 code pour la protéine p53, un facteur de transcription impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire et l'apoptose. Ce gène est impliqué dans la prédisposition de nombreux cancers comme les leucémies, les tumeurs cérébrales, les cancers du poumon broncho-alvéolaires et le cancer du sein. Ce gène est également responsable du syndrome de Li-Fraumeni qui est un syndrome rare de prédisposition à de multiples cancers chez l'enfant et l'adulte jeune.
- Les gènes du système de réparation des mésappariements de l'ADN (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2). Les mutations de ces gènes sont responsables du syndrome de Lynch qui est un syndrome de prédisposition génétique aux cancers colorectaux. Les personnes porteuses de mutations sur ces gènes sont également présentent également un sur risque de développer un cancer de l'endomètre ou de l'ovaire par rapport à la population générale.

Le développement du séquençage à haut débit et les études à grande échelle a permis d'identifier d'autres gènes de susceptibilité au cancer du spectre sein-ovaire. Cependant, ces gènes sont responsables d'un sur risque modéré ( $< x4$ ) ou faible ( $x 1,2 - 1,5$ ) de développer un cancer par rapport à la population générale. L'utilité clinique d'analyser ces gènes nécessite à ce jour d'être démontrée et ne fait l'objet d'aucune recommandation.

## B) Stratégie diagnostique et thérapeutique

### 1) Exploration par Panel de gènes standardisé : recommandations GGC

Les cancers du sein liés aux mutations constitutionnelles de BRCA1/2 représentent environ 4 à 5% des cancers du sein. La recherche d'une mutation constitutionnelle de ces gènes n'est pas systématique. Un test génétique sera proposé ou non au patient en fonction d'arguments reposant essentiellement sur l'histoire familiale et l'utilisation de modèles statistiques (Manchester, BRCAPRO) permettant d'évaluer la probabilité de détection d'une mutation chez la patiente. Généralement, un test génétique sera proposé si la probabilité de détection dépasse 10%.

À ce jour, si les gènes BRCA sont considérés comme les deux gènes majeurs à l'origine du risque très élevé de cancer du sein et/ou de l'ovaire, d'autres gènes ont été identifiés en lien avec ce syndrome.

Selon le gène, le niveau de risque et le spectre des cancers peuvent varier. Les dispositions spécifiques de prise en charge préconisées sont modulées en fonction des gènes, classés en : (1) très haut risque, tels les gènes BRCA1/2 suivant les recommandations de l'INCa 2017 ; (2) risque élevé ; (3) augmentation modérée : dans ce dernier cas, les mesures de surveillance sont similaires à la population générale.

En 2018, à partir d'une revue exhaustive de la littérature, le GGC a émis des recommandations françaises pour l'analyse en panel de gènes des prédispositions au cancer du sein ou de l'ovaire. Ces recommandations préconisent d'analyser 13 gènes identifiés d'utilité clinique, c'est-à-dire augmentant le risque relatif de développer un cancer du sein ou de l'ovaire d'un facteur supérieur à 4 par rapport à la population générale. La table 1 ci-contre) résume les recommandations de surveillance et de chirurgie de réduction des risques en fonction du gène pour lequel un variant pathogène est identifié (5).

Ces recommandations permettent une harmonisation des pratiques des laboratoires d'oncogénétique moléculaire.

	Surveillance mammaire	Chirurgie de réduction des risques (CRR)		Surveillance gynécologique
		Mammaire	Pelvienne	
<b>BRCA1</b> <b>BRCA2</b>	Sur un rythme annuel : De 30 à 65 ans IRM + Mammographie (+/- échographie). Après 65 ans Mammographie +/- Echographie (Recommandations HAS 2014 * et INCa 2017**)	Mastectomie prophylactique recevable (Recommandations HAS 2014 * et INCa 2017**)	Annexectomie prophylactique (âge à discuter à partir de 40 ans et selon la mutation et l'HF de CO) **	Avant CRR: surveillance standard, pas de dépistage ovarien efficace à préconiser **
<b>PALB2</b>			Pas de prise en charge gynécologique spécifique. Si HF de CO, prise en charge discutée en RCP	Surveillance standard
<b>CDH1</b>				Surveillance standard. Si atteinte gynécologique MC : prise en charge discutée en RCP
<b>PTEN</b>			Surveillance standard	
<b>TP53</b>	Sur un rythme annuel dès 20 ans IRM + Echographie (pas de mammographie systématique)			Surveillance standard
<b>RAD51C</b> <b>RAD51D</b>	Pas de surveillance mammaire spécifique, à adapter à l'HF de CS selon les recommandations HAS 2014*	Non indiquée	Annexectomie prophylactique (âge à discuter à partir de 45 ans et selon l'HF de CO)	Avant CRR: surveillance standard, pas de dépistage ovarien efficace à préconiser **
<b>MLH1</b> <b>MSH2 -</b> <b>EPCAM</b> <b>MSH6</b> <b>PMS2</b>			CRR ovarienne et/ou utérine à discuter en RCP selon référentiel syndrome de Lynch	Surveillance utérine selon référentiel syndrome de Lynch

**Table 1: Recommandations de prévention ou dépistage mammaires et gynécologiques des personnes porteuses d'une mutation d'un des gènes analysés dans le panel GGC-Unicancer. CS : cancers du sein ; CO : cancers de l'ovaire ; HF : histoire familiale ; PEC : prise en charge ; MC : maladie de Cowden ; RCP : réunion de concertation pluridisciplinaire ; CRR : chirurgie de réduction des risques ; \* : Recommandation Haute Autorité de santé 2014: Dépistage du cancer du sein en France: identification des femmes à haut risque et modalités de dépistage ; \*\* : © / Synthèse INCa, avril 2017- Femmes porteuses d'une mutation de BRCA1 ou BRCA2 / Détection précoce du cancer du sein et des annexes et stratégies de réduction du risque, Collection recommandations et référentiels.**

## 2) Surveillance et thérapeutique : gène dépendant

Dans le cadre du syndrome seins-ovaires, les mesures de surveillance et de prophylaxie mises en place chez les patientes porteuses d'une mutation de prédisposition sont modulées en fonction du gène touché, de l'âge de la patiente ainsi que son histoire familiale.

Par exemple, en fonction de ces différents paramètres, le clinicien peut par exemple proposer, pour une patiente porteuse d'une mutation sur le gène PALB2, une surveillance mammaire annuelle par IRM et mammographie entre 30 et 65ans et une surveillance gynécologique standard puisque PALB2 est essentiellement décrit comme responsable d'un sur risque de cancers du sein. Inversement, chez une patiente porteuse d'une mutation sur le gène RAD51C qui est associé à une augmentation du risque de tumeurs ovariennes, aucune surveillance mammaire spécifique, d'une manière générale, ne sera préconisée. (Table 1).

Outre la mise en place des mesures de surveillance et prophylactiques, connaître le statut mutationnel des patientes pour ces gènes a également un intérêt théranostique. En effet, l'identification d'une mutation constitutionnelle va conditionner les choix thérapeutiques, c'est pourquoi l'oncogénétique peut entrer dans le domaine de l'urgence, dans certaines situations, en particulier pour des patientes métastatiques (22).

Nous avons décrit précédemment le rôle clé des protéines BRCA1/2 dans le système de réparation des cassures doubles brins de l'ADN. Lorsqu'une mutation sur l'un de ces gènes est présente, le système de recombinaison homologue est alors défaillant et cela conduit à une augmentation de l'instabilité génétique. Un autre système de réparation, majoritaire chez l'homme, permet de réparer ces cassures doubles brins, la recombinaison non homologue par jonction des extrémités (NHEJ). Elle consiste à « rabouter » les extrémités de la cassure et implique essentiellement les protéines du complexe DNA-PK associé à la protéine Artémis. Cette voie est plus rapide que la recombinaison homologue, mais génère des erreurs d'insertion ou de délétion de quelques bases, l'information génétique au niveau de la lésion est alors perdue (20). Des cassures simple brin peuvent également survenir. Un système de réparation appelé, réparation par excision de base, existe pour réparer ce type de cassure et fait intervenir les enzymes PARP (Poly ADP-ribose polymérase) (20). Depuis 2014, des inhibiteurs de ces protéines sont indiqués chez les patientes atteintes de cancer de l'ovaire et du sein qui sont porteuses d'une mutation sur les gènes BRCA (19). Cette thérapie ciblée, notamment l'Olaparib, empêche au niveau cellulaire, l'action des enzymes PARP par fixation au site actif et bloque ainsi le processus de réparation de l'ADN.

Le système de réparation homologue défaillant associé à l'utilisation d'antiPARP engendre une accumulation des lésions de l'ADN non réparables ce qui, in fine, induit le déclenchement de l'apoptose cellulaire des cellules cancéreuses (source : VIDAL)

À noter, que le statut mutationnel des patientes est également un critère d'inclusion et d'évaluation pris en compte dans la plupart des essais cliniques en développement pour le cancer du sein et/ou de l'ovaire, ce qui confirme la place centrale de l'oncogénétique dans la prise en charge thérapeutique.

### III) Particularités du cancer triple négatif :

Le cancer du sein est en réalité une entité hétérogène composée de multiples types de tumeurs. En effet, l'avènement des techniques d'analyse moléculaires (génomiques, transcriptomiques, tumeur microarray) a permis d'identifier différents sous-types de cancers du sein, de pronostic distinct. En routine, au diagnostic, une analyse immunohistochimique de l'expression des récepteurs hormonaux et de surexpression du récepteur au facteur de croissance de l'épiderme humain (HER2), permet une classification rapide et facile de ces tumeurs, bien que celle-ci soit imparfaite.

Les cancers du sein triple négatif (CSTN) est un groupe de cancer du sein défini en pratique clinique par l'absence d'expression des récepteurs à l'estradiol, à la progestérone et par l'absence de surexpression de la protéine HER2/ERBB2. Cette entité représente 10 à 15% de l'ensemble des cancers du sein. Cette entité diffère des cancers du sein hormono-dépendants (exprimant les récepteurs hormonaux et HER2) par leur mauvais pronostic global expliqué en partie par l'absence de thérapies ciblées efficaces.

De plus, les cancers du sein triple négatif se distinguent des autres formes de cancer du sein par un âge au diagnostic inférieur et un plus mauvais pronostic à 5 ans des patientes atteintes (23). Au niveau tumoral ces tumeurs se caractérisent par un haut grade histopronostique, une plus forte prolifération ainsi qu'un risque de rechute métastatique plus important dans les 5 premières années surtout au niveau viscéral (poumons, foie et système nerveux central) (24).

En 2010, aucune étude portant sur l'analyse des principaux gènes de prédisposition n'avait été menée dans ce sous-type de cancer du sein pour tenter de comprendre la genèse de ce phénotype particulier.

C'est dans ce contexte que le Programme Hospitalier de Recherche Clinique SA03 a été initié en 2010. Le but de cette étude était d'évaluer dans un premier temps l'incidence des mutations constitutionnelles des principaux gènes de prédisposition chez les femmes ayant un CSTN puis d'évaluer l'impact de ces mutations sur la clinique, les caractéristiques tumorales (histologie, grade, profil moléculaire des tumeurs), ainsi que sur l'évolution des patientes (réponse au traitement, rechute, survie globale).

Au cours de cette étude prospective, une cohorte de patientes atteintes de CSTN non métastatique au diagnostic a été constituée durant une phase d'inclusion de 4ans. L'ensemble des données clinico-biologiques ont été collectées et les analyses moléculaires constitutionnelles et tumorales (transcriptomique et profil d'expression génique) réalisées. Chacune des patientes incluses a été suivie pendant 5 ans pour l'analyse pronostique, de la survie sans récurrence et de la survie globale en fonction des paramètres biologiques. L'étude s'est clôturée en 2019.

## PARTIE III :

### Travail de recherche

---

#### A) Objectifs

L'objectif principal de ce travail était d'évaluer l'incidence des mutations constitutionnelles de la cohorte du PHRC SA03

Puis nous avons tenté de mettre en évidence diverses corrélations entre prédisposition génétique et clinique, le profil histologique de la tumeur, le pronostic ou encore avec la survie.

#### B) Matériels et méthodes

##### 1) Population étudiée et données collectées

Nous avons étudié une cohorte de patientes incluses dans le programme hospitalier de recherche clinique (PHRC-SA03) entre 2010 et 2014. Ces patientes ont par la suite été suivies pendant 5 ans après leur diagnostic. Les critères d'inclusion qui ont permis d'inclure ces femmes sont les suivants: i) être âgée de plus de 18 ans, ii) être atteinte d'un cancer du sein non métastatique diagnostiqué à partir du 01/01/2010, iii) En immunohistochimie: absence d'expression des récepteurs à l'estradiol et la progestérone et une expression de HER2=0, 1 ou 2 si le test d'amplification montrait un ratio  $< 1,8$ , iv) double lecture de l'immunohistochimie par 2 pathologistes, v) pouvant recevoir un traitement approprié (radiothérapie, chirurgie, médicamenteux) vi) pouvant être suivi pendant 5 ans après le diagnostic, vii) être affiliée à un régime de sécurité sociale, viii) avoir un performance status  $\leq 1$ , ix) avoir signé un consentement éclairé. L'ensemble des données cliniques et biologiques ont été récupérées, incluant l'âge de diagnostic, l'histoire familiale, le type histologique tumorale, les traitements, et les données de survie.

##### 2) Échantillonnage et Extraction d'ADN

Pour chaque patiente, un échantillon sanguin prélevé sur tube EDTA a été envoyé au laboratoire d'oncogénétique de l'Institut Paoli-Calmettes à Marseille, France.

L'extraction d'ADN a été réalisée en utilisant le Qiasymphony DNA kit (Qiagen). Tous les échantillons d'ADN ont été quantifiés au Nanodrop™One (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) avant double purification réalisée avec les billes AMPure XP (Beckman

Coulter). Enfin, les échantillons d'ADN ont été à nouveau quantifiés en utilisant le ds-DNA Broad Rangey kit sur Qubit (Thermo-Fisher).

### 3) Panel de gènes testés

Une stratégie d'analyse ciblée par panel de gènes a été réalisée au cours de ce travail. Afin de déterminer les gènes candidats pour cette étude, nous nous sommes basés sur les recommandations actuelles du Groupe génétique et Cancer ainsi qu'à l'étude familiale nationale TUMOSPEC.

#### a) Groupe Génétique et Cancer

Le panel diagnostique 13 gènes recommandé par le GGC a été analysé au cours de ce travail de thèse

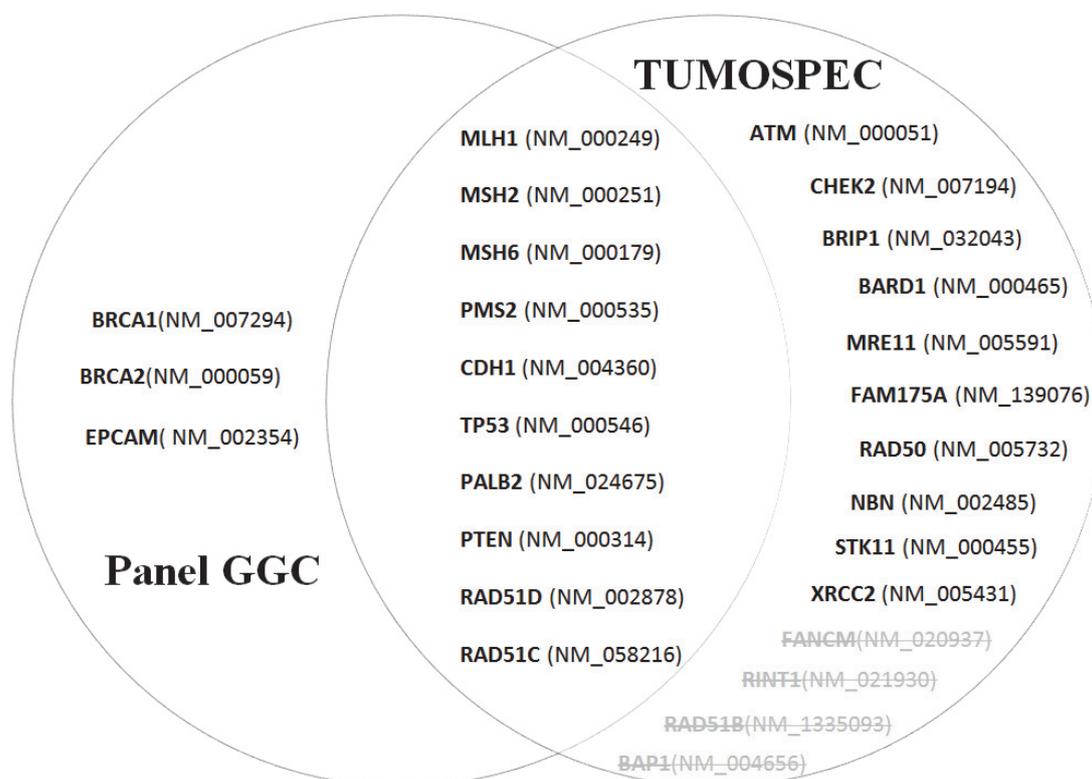
Cependant d'autres gènes candidats pourraient avoir une utilité clinique, mais n'ont pas été retenus par le groupe génétique et cancer faute de preuves suffisantes. En cas de résultat négatif de l'analyse génétique de ce panel 13 gènes, il est possible d'étudier d'autres gènes candidats si l'histoire familiale est fortement évocatrice de prédisposition au cancer du sein ou de l'ovaire. Afin de statuer sur le bénéfice clinique d'étudier de ces autres gènes candidats, l'étude TUMOSPEC a été créée.

#### b) Protocole TUMOSPEC

Le protocole TUMOSPEC, initié en décembre 2016, a pour objectif principal d'évaluer l'utilité clinique de l'identification d'une mutation dans un gène de prédisposition au cancer du sein et/ou de l'ovaire autre que BRCA1 et BRCA2 par l'estimation précise et sans biais des risques de cancer. Pour cela sont inclus dans ce protocole les femmes et hommes reçus en consultation d'oncogénétique et auxquels un test génétique pour BRCA1, et BRCA2 aura été proposé dans le cadre du soin. Une analyse complémentaire d'un panel de 24 gènes sera alors réalisée en parallèle de l'analyse génétique prescrite (BRCA1, BRCA2) pour chacune des personnes incluses. Si une mutation délétère est retrouvée, les apparentés du cas index sont invités à se faire tester pour la mutation familiale identifiée afin d'étudier la ségrégation du variant avec le cancer.

Ce panel TUMOSPEC inclus notamment des gènes impliqués dans les mécanismes de réparation des cassures double-brin de l'ADN par recombinaison homologue, la voie Fanconi, ou dans des prédispositions à des cancers d'autres organes. Dix des 24 gènes étudiés dans ce protocole font déjà partie des recommandations du GGC (Figure 7).

Dans ce travail, nous nous sommes donc inspirés des recommandations GGC et du protocole TUMOSPEC pour l'analyse génétique de notre cohorte de patientes. Nous avons utilisé le kit commercial HCS (Hereditary Cancer Solution) de Sophia Genetics, incluant un panel de 26 gènes d'intérêt associés aux cancers du sein et de l'ovaire ainsi qu'aux syndromes de polyposes intestinales. Nous avons utilisé ce kit, car celui-ci est utilisé en routine au laboratoire d'oncogénétique. À partir de ce kit, 23 gènes ont été analysés incluant l'ensemble des gènes recommandés par le GGC ainsi que 20 des 24 gènes proposés dans le protocole TUMOSPEC. 4 gènes de ce protocole ont été exclus de notre étude (FANCM, RINT1, RAD51B, BAP1), car le kit commercial HCS ne contient pas ces gènes (Figure 1).



**Figure 7: Panel 23 gènes utilisé pour la recherche de prédisposition au cancer du sein triple négatif.** Les gènes barrés ne sont pas explorés par le kit HCS Sophia et ont été exclus de cette étude.

#### 4) Séquençage à haut débit (NGS)

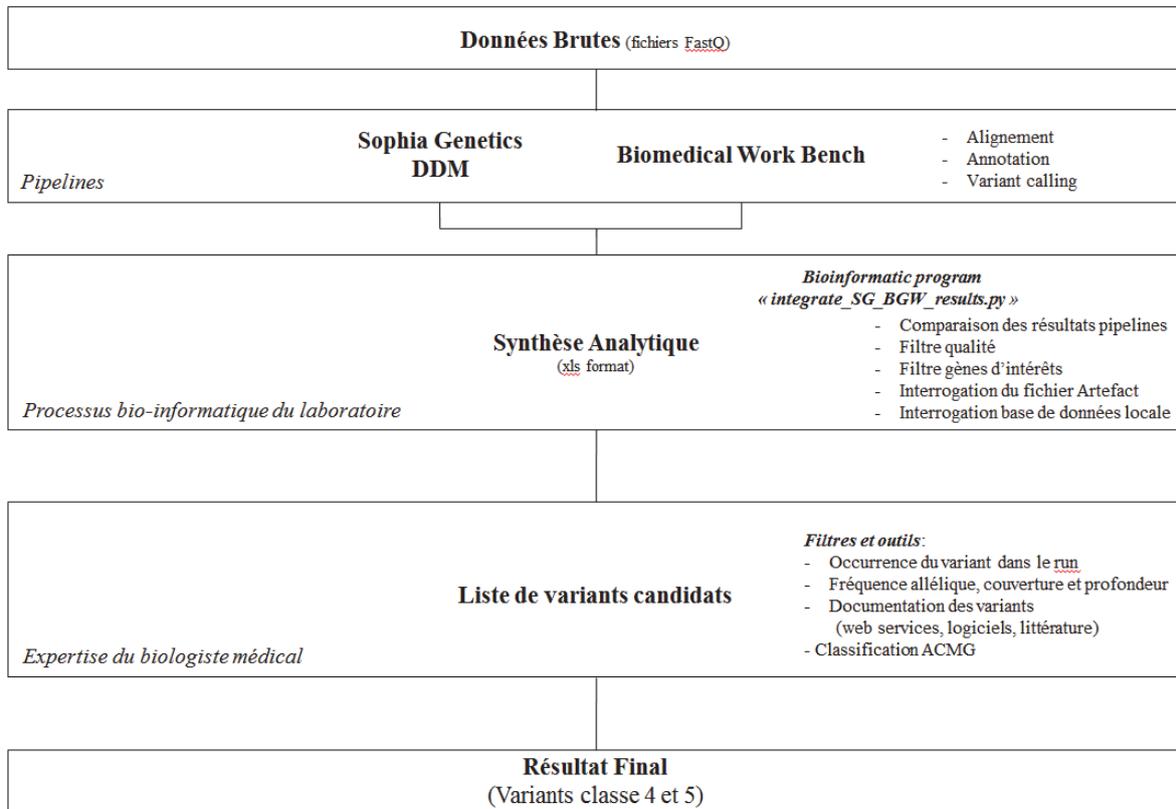
Les exons codants et les régions introniques flanquantes (25bp) des gènes du panel ont été séquencés en utilisant le séquenceur MiSeq d'Illumina, conformément aux méthodologies utilisées au laboratoire d'oncogénétique moléculaire de l'Institut Paoli-Calmettes, accrédité ISO EN 15189. La construction des librairies et l'enrichissement des cibles par capture ont été réalisés à partir de 200ng d'ADN génomique en utilisant le kit Qiaseq FX DNA library kit (QIAGEN), KAPA Library Amplification kit (KAPA BIOSYSTEM, HCS kit (SOPHIA GENETICS) et TapeStation Agilent High Sensitivity kit, en accord avec les recommandations fabricants.

#### 5) Analyse des données

L'analyse des données de séquençage a été réalisée en utilisant le process accrédité du laboratoire. Les principales étapes sont énumérées dans la Figure 8 ci-contre.

Tout d'abord les données brutes sont traitées par deux pipelines d'analyses, Sophia DDM (<https://www.sophiagenetics.com/hospitals/sophia-ddm>) et Biomedical Genomics Workbench (BGW) (<https://digitalinsights.qiagen.com>). Puis, grâce à un script informatique développé par le bioinformaticien du laboratoire, une synthèse est générée à partir des résultats des deux pipelines. En effet ce script va automatiquement comparer les fichiers de résultats et appliquer différentes règles incluant un filtre sur les gènes pour ne conserver que les variants des gènes d'intérêt, un filtre qualité pour identifier les zones des gènes mal couvertes lors du séquençage (< 300X de profondeur), marquer les variants situés en dehors des zones d'intérêt, interroger une base de données locale des variants afin de récupérer les informations sur la pathogénicité si le variant a déjà été identifié au laboratoire .

À partir de cette synthèse analytique, une documentation de l'ensemble des variants est réalisée en utilisant divers logiciels et webservices comme gnomAD, Clinvar, Varsome (8), Alamut 2.14<sup>®</sup>, UMD predictor<sup>®</sup>, Human splicing Finder<sup>®</sup>. Cette documentation permet de classer les variants selon notamment la classification ACMG. Par ailleurs à partir de l'ensemble des runs de séquençage, une analyse in silico des variations du nombre de copies (CNV) est réalisée grâce au pipeline Sophia DDM.



**Figure 8: Worflow d'analyse des données de séquençage**

## C) Résultats

### 1) Cohorte de patientes

297 femmes atteintes d'un cancer du sein triple négatif non métastatique ont été incluses au diagnostic dans le PHRC SA03/IPC 2010-003 et suivies pendant 5 ans

### 2) Analyse des variants

Dans un travail préliminaire datant de 2018, Naïbo. P et al, ont analysés les gènes BRCA1 et BRCA2 chez 288 patientes par technologie Sanger et MLPA. Ils ont notamment mis en évidence une mutation délétère ou un réarrangement de grande taille dans ces gènes chez 40 patientes ce qui représentait une prévalence de 13,9% (25). Au cours de cette étude, ils ont notamment démontré que les patientes porteuses de ces anomalies BRCA avaient un âge significativement plus jeune que les patientes non mutées.

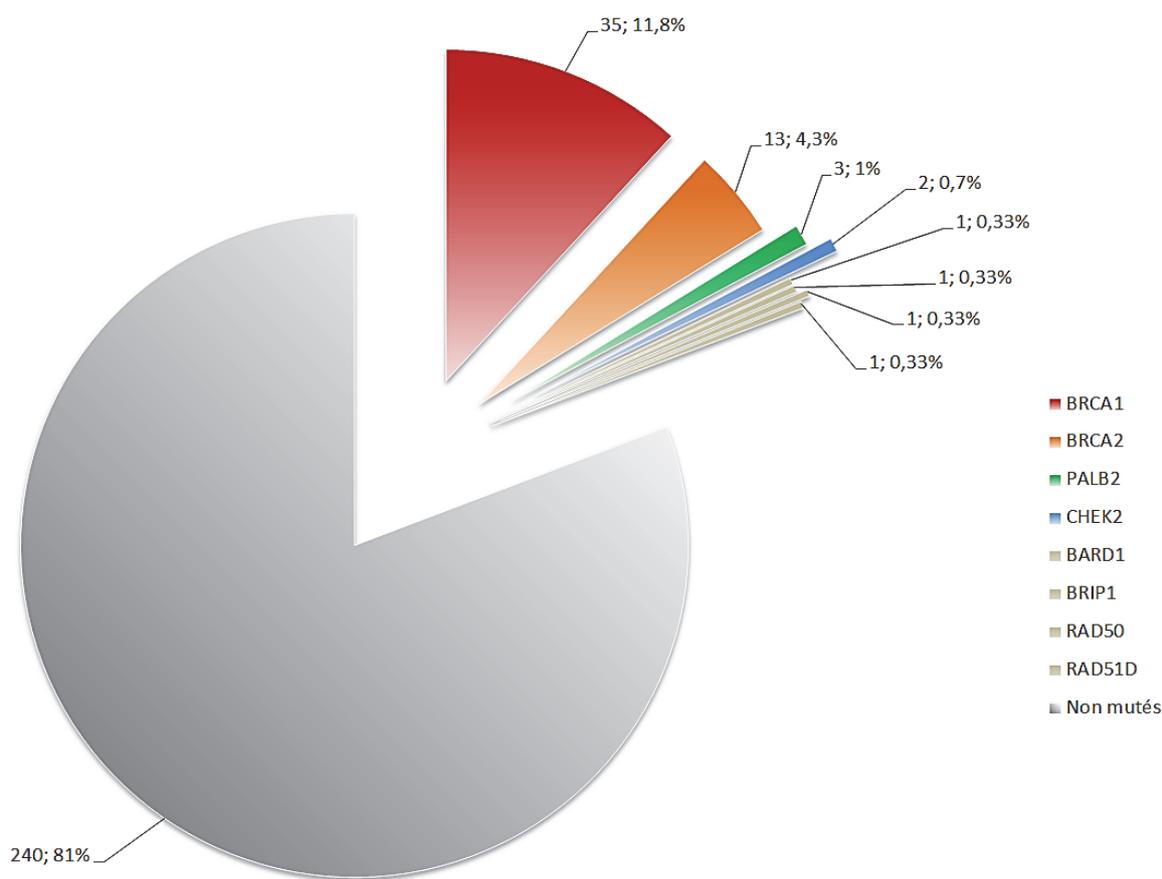
Ici, nous avons séquencé et analysé l'ensemble des 23 gènes d'intérêt par NGS de la cohorte finalisée incluant 297 patientes.

L'alignement et le variant calling de l'ensemble des séquences obtenues ont permis de générer 20564 variants.

Parmi eux, nous avons pu identifier un variant de classe 4 ou 5 chez 56 patientes, ce qui représente une incidence globale de 18,9% (56/297).

Une mutation délétère ou un réarrangement des gènes BRCA1/2 a été identifié chez 48 patientes soit une incidence de 16,16% comprenant l'ensemble des anomalies identifiées dans l'analyse préliminaire. Par ailleurs, le gène BRCA1 est retrouvé plus souvent muté que le gène BRCA2 (12% vs 5%), comme précédemment décrit par Naïbo et al.

Concernant les gènes de prédisposition autre que BRCA, nous avons identifié un variant probablement pathogène ou pathogène chez 9 patientes, ce qui représente une incidence globale de 3,03% (n=9/297) (Figure 9).



**Figure 9 : Incidence mutationnelle de prédisposition au cancer du sein de la cohorte clinique**

Les variants de classe 4 ou 5 ont été identifiés dans 5 gènes incluant PALB2 (n=3), BARD1 (n=1), BRIP1 (n=1), CHEK2 (n=2), RAD51D (n=1) et RAD50 (n=1) (Table 2). PALB2 est le gène autre que BRCA qui est retrouvé le plus souvent muté avec une incidence de 1% de la cohorte (n=3/297). Par ailleurs, parmi le panel 13 gènes recommandé par le GGC, mis à part les gènes BRCA, seuls les gènes PALB2 et RAD51D ont été retrouvés mutés dans notre cohorte clinique

Par ailleurs, nous avons identifié une co-occurrence de mutations délétères chez une seule patiente (Table 3) sur les gènes BRCA2 et RAD50. La patiente était atteinte d'un carcinome canalaire infiltrant identifié à 56ans sans histoire familiale informative. La tumeur a été classé T1 selon la classification TNM sans infiltration ganglionnaire. Durant le suivi, aucune rechute n'a été constatée et la patiente est toujours en vie.

**Table 2 : Variants de classe 4 et 5 identifiés dans les gènes autres que BRCA**

Gène	Patiente (ID)	c.	p.	rs	VAF (%)	Profondeur SG-BGW (X)
PALB2	E131673	c.932_933insC	p.(Lys311Asnfs*10)	rs1060502772	45.96	866
	E141180	c.3140_3155delAAAAGATGCACATTGA	p.(Lys1047Metfs*23)	/	49.0	381
	E141272	c.560delC	p.(Pro187Leufs*6)	/	44.59	933
BARD1	E121445	c.1939C>T	p.(Gln647*)	rs1350570988	47.32	579
BRIP1	E142070	c.2990_2993delCAAA	p.(Thr997Argfs*61)	rs771028677	34.17	600
CHEK2	E120724	c.1100delC	p.(Thr367Metfs*15)	rs555607708	45.44	1195
	E141443				46.89	885
RAD50	E141271	c.541dupT	p.(Ser181Phefs*7)	rs786201531	47.1	1205
RAD51D	E120247	c.137C>G	p.(Ser46Cys)	rs587780102	45.61	912

VAF : Fréquence allélique du variant

**Table 3 : Informations patiente porteuse d'une co occurrence de mutations constitutionnelles**

Patiente	Gène	c.	p.	DDN	Âge au diagnostic	Histologie	TNM	GRADE	Histoire familiale	Rechute
E141271	BRCA2	c.3680_3681delTG	p.Leu1227Glnfs*5				T1			
	RAD50	c.541dupT	p.Ser181Phefs*7	13/07/57	56 ans	CCI	N0	NP	Négative	Non
							M0			

### 3) *Variant et impact clinique*

Ici nous confirmons que la présence d'une mutation sur un des gènes BRCA est associée à un âge au diagnostic des patientes significativement plus jeune, ce qui a été précédemment décrit par l'étude menée par Naïbo. P. Cependant, l'âge moyen au diagnostic des patientes porteuses d'une mutation sur un gène autre que BRCA ne diffère pas significativement de l'âge moyen au diagnostic des patientes non mutées (Table 4).

Par ailleurs le type histologique tumoral ne diffère pas en fonction du statut mutationnel des patientes, le type canalaire infiltrant étant identifié chez près de 90% des patientes. De plus, le Grade tumoral ne diffère pas non plus significativement entre les patientes porteuses d'une mutation constitutionnelle et les patientes non mutées.

Concernant l'histoire familiale de cancers sein-ovaire, 107 patientes incluses avaient une histoire familiale positive définie par la présence d'au moins un cancer du spectre sein ovaire chez les apparentés du 1<sup>er</sup> et/ou 2<sup>nd</sup> degré. Une mutation constitutionnelle délétère a été identifiée chez 29 de ces patientes ce qui représente 27% des cas présentant une histoire familiale positive. Parallèlement, 56% des patientes étaient porteuses d'une mutation délétère sur les gènes BRCA, et 22% d'une mutation sur les autres gènes.

En effet, les variants de classe 5 BARD1 c.1939C>T (p.Gln647\*) et BRIP1 c.2990\_2993delCAAA (p.Thr997Argfs\*61) ont été identifiés chez des patientes qui présentaient une histoire familiale évocatrice.

Concernant le suivi des patientes, nous avons observé que la survie globale à 5 ans était de 85% et la survie sans progression était de 80% chez les patients sans mutation. De plus, nous n'avons pas observé de rechute ni de décès chez les patientes porteuses de mutations sur les gènes autres que BRCA. Aucune différence significative n'a été trouvée entre ces deux groupes.

**Table 4: Statut mutationnel comparé aux caractéristiques épidémiologiques et histologiques des patientes incluses dans la cohorte**

	Patientes mutées BRCA1/2	Patientes non mutées	Patientes mutées autres gènes
Nombre échantillons	48	240	9
Âge au diagnostic : moy ± SD	<b>48,46 ± 11,42</b>	52,6±11,37	<b>53,64 ± 11,06</b>
p value	<b>p&lt;0,05</b>		<b>p=0,22</b>
GRADE SBR Nb (%)			
II	8 (16,6%)	34 (14,2%)	/
III	32 (66,6%)	190 (79%)	8 (89%)
NP	8 (16,6%)	16 (6,7%)	1 (11%)
Type Histologique			
Canalaire infiltrant	42 (87,5%)	213 (88,7%)	8 (88,9%)
Lobulaire	1 (2,1%)	4	/
Métaplasique	/	2	1
In situ	/	2	/
Médullaire	/	6	/
Epidermoïde	/	1	/
Apocrine	/	1	/
NP	5	11	/
Histoire familiale positive sein- ovaire 1 <sup>er</sup> /2 <sup>nd</sup> degré	27 (56%)	78 (32,5%)	2 (22%)

#### 4) TP53 et hématopoïèse clonale

Parmi les gènes constituant le panel d'étude, le gène TP53, outre son implication dans les syndromes héréditaires de cancers (Li-Fraumeni), est aussi impliqué dans certaines hémopathies malignes. L'analyse constitutionnelle se faisant sur sang périphérique, des mutations somatiques sur ce gène peuvent être identifiées dans les cellules hématopoïétiques. L'hématopoïèse clonale de signification indéterminée est définie par la présence de mutation somatique dans les cellules hématopoïétiques à une fréquence allélique  $\geq$  à 2%, chez des individus sans maladie hématologique (26).

Au cours de notre étude, une mutation somatique sur le gène TP53 a été identifiée chez 6 patientes avec des fréquences alléliques comprises entre 2 et 10% suggérant que ces mutations soient de nature somatique et non constitutionnelle. (Table 5).

Parmi ces 6 patientes, 2 sont décédées durant les 5 ans de suivi. À noter qu'une mutation de prédisposition a été identifiée chez une seule patiente porteuse d'une probable hématopoïèse clonale et celle-ci fait partie des patientes décédées.

Nous avons pu récupérer les données cliniques et thérapeutiques d'une seule des deux patientes décédées. Ces données nous ont cependant permis d'observer que la patiente porteuse de la mutation TP53 c.673-2A>G ; p ? est décédée d'un syndrome myélodysplasique post chimiothérapie, acutisé en leucémie aigüe myéloïde, caryotype complexe en 2016, à l'âge de 69ans. L'analyse génétique a été réalisée sur un prélèvement datant de 2012 soit antérieur au traitement suggérant que l'hématopoïèse clonale que présentait la patiente n'a pas été induite par les traitements anticancéreux.

**Table 5 : TP53 et Hématopoïèse clonale identifiée chez les patientes de la cohorte**

N° ADN	DDP	c.	p.	VAF (%)	Mutation constitutionnelle	Âge au diagnostic (ans)	Histoire familiale	TTT	Hémapathie	Autre cancer famille	Évolution
E140645	2014	c.844C>T	p.Arg282Trp	2.8	Non	48	-	NC	NC	Prostate 1 <sup>er</sup> degré	Vivant
<b>E121040</b>	<b>2012</b>	<b>c.673-2A&gt;G</b>	<b>p?</b>	<b>3.15</b>	<b>Non</b>	<b>65</b>	<b>-</b>	<b>Chimio, Radio, Hormono</b>	<b>AREB2 -&gt; LA (avril 2016)</b>	<b>/</b>	<b>DCD (69ans)</b>
E150050	2015	c.742C>T	p.Arg248Trp	2.21	Non	79	-	NC	NC	Rein 1 <sup>er</sup> degré	Vivant
E100830	2010	c.818G>A	p.Arg273His	2.07	Non	63	-	Chirurgie / chimio / Radio	Non	/	Vivant
E111774	2011	c.720T>A	p.Ser240Arg	6.03	Non	64	+	Chirurgie / Chimio/Radio	Non	/	Vivant
E130107	2013	<b>c.782+1G&gt;A</b>	<b>p?</b>	<b>3</b>	<b>BRCA1 : c.211delA, p.Arg71Glyfs*</b>	49	+	NC	NC	NC	<b>DCD</b>

Légende : NC : non communiqué ; VAF : fréquence allélique ; TTT : traitement ; DDP : date de prélèvement ; DCD = décédé

## D) Discussion

Ici, nous avons évalué l'incidence des mutations constitutionnelles de prédisposition aux cancers du sein triple négatif et nous avons observé les relations entre clinique et mutation de prédisposition, notamment sur les gènes autres que BRCA1/2. Au lancement de ce programme de recherche hospitalier en 2010, aucune étude semblable n'avait été menée. Ces dernières années avec l'avènement du séquençage à haut débit, plusieurs études évaluant l'incidence et l'impact des mutations de prédisposition dans le cancer du sein triple négatif sont parues.

En 2015, Couch et al, ont évalué l'incidence mutationnelle de 17 gènes de prédisposition connus chez une cohorte rétrospective de 1824 femmes atteintes de cancer du sein triple négatif issues de 12 centres. Ils ont identifié une mutation délétère chez 14,6% de la cohorte. Ils ont notamment mis en évidence que BRCA1 était plus fréquemment muté que BRCA2 (8,5% vs 2,7%). L'incidence globale des mutations sur les autres gènes était de 3,7%, PALB2 étant le gène retrouvé le plus souvent muté dans 1,2% des cas. De plus, ils ont mis en évidence que le l'âge au diagnostic des patientes était significativement plus jeune chez celles présentant une mutation sur l'un des gènes BRCA par rapport aux patientes non mutées (27), De plus, la présence d'une histoire familiale positive étaient significativement enrichie chez les patientes porteuses d'une mutation BRCA1/2. Au niveau histologique, les patientes BRCA1/2 mutées présentaient plus de tumeurs de haut grade. Cependant concernant les autres gènes, aucun paramètre n'était significativement associé (épidémiologique, clinique, ou histologique). Ces résultats ont par la suite été confirmés dans plusieurs études (28,29). Par ailleurs, au cours de cette étude, 4 patientes présentaient plus d'une mutation délétère, incluant une patiente porteuse d'une double mutation BRCA1c.68\_69delAG et BRCA2 c.5946delT diagnostiquée à l'âge de 68 ans. Aucune de ces patientes n'avait une histoire familiale positive de cancers du sein ou de l'ovaire, et aucune corrélation avec le phénotype clinique n'a été mise en évidence dans cette étude. Ceci suggère que la présence de co-occurrence de mutation est à la fois un évènement rare et non corrélé au phénotype clinique.

ANNEXE 1.

Dans notre étude, le taux d'incidence des mutations constitutionnelles des gènes BRCA1/2, PALB2, BARD1 et BRIP1 est comparable aux données de la littérature.

L'incidence des mutations d'autres gènes, par exemple RAD51C, TP53 ou PTEN étant inférieure à 0,5%, nous n'avons pas pu les mettre en évidence dans notre cohorte de 297 patientes.

De plus, plusieurs études ont évalué l'impact des mutations constitutionnelles sur la rechute et la survie des patientes atteintes de CSTN.

En 2016, Baretta et al ont montré que parmi les patientes atteintes de CSTN, celles qui étaient porteuses d'une mutation sur les gènes BRCA1/2 avec une meilleure survie globale que les patientes non mutées (30).

En 2018, Yadav et al, ont analysé une cohorte rétrospective de 266 patientes pour lesquelles une analyse des gènes BRCA1/2 a été réalisée. L'ensemble des données de suivi ont été récupérées et aucune différence significative sur la rechute n'a été identifiée chez les patientes mutées vs non mutées. Wang et al, ont analysé une cohorte prospective de 480 patientes Chinoises pour laquelle un panel 20 gènes a été étudié. Ils ont notamment mis en évidence un taux de rechute à 5 ans significativement plus élevé chez les patientes mutées BRCA1/2 par rapport aux patientes non mutées. Aucune différence significative n'a été mise en évidence pour les patientes porteuses d'une mutation sur un gène autre (31). La même année, Cospon et al ont analysé une cohorte prospective de patientes issues de 127 hôpitaux au Royaume Uni. Les patientes incluses dans cette étude étaient atteintes d'un cancer du sein invasif diagnostiqué avant l'âge de 40 ans. Parmi ces patientes, 558 avaient un CSTN et 136 d'entre elles étaient porteuses d'une mutation sur les gènes BRCA1/2. Ils ont mis en évidence une différence de survie globale au cours des premières années après le diagnostic avec une meilleure survie globale chez les patientes porteuses d'une mutation sur BRCA par rapport aux non-porteuses. Selon eux, cela pourrait être expliqué par une sensibilité accrue à la chimiothérapie (32).

Dans le travail de Naïbo et al portant sur l'étude des gènes BRCA de notre cohorte, aucune différence significative n'a été identifiée entre les patientes mutées et non mutées sur la PFS et la survie globale (25).

Dans notre étude, du fait du faible échantillonnage, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence significative en terme de PFS et de survie globale chez les patientes porteuses d'une mutation sur les gènes autres que BRCA1/2 vs les non mutées. Cependant, selon les données de la littérature, cela ne semble pas être un facteur pronostic.

Par ailleurs, l'analyse par panel de gènes incluant TP53 a permis de suggérer l'existence d'une hématopoïèse clonale chez 6 patientes de notre cohorte. Nous n'avons pas pu confirmer le caractère somatique de ces mutations par analyse génétique d'un tissu sain autre que le sang, car aucun échantillon de cette nature n'avait été prélevé chez ces patientes.

Cependant, parmi ces patientes, une d'entre elle est décédée d'une hémopathie myéloïde au cours du suivi. En effet, l'apparition d'hémopathies secondaires post-traitement anticancéreux est bien connue (33) . Cependant, si la patiente présente une hématopoïèse clonale avant tout traitement, est-ce un marqueur prédictif d'hémopathie secondaire ? En 2010, Slovak et al ont mené une étude de dépistage de l'hématopoïèse clonale basée sur l'HUMARA assay (Human androgen receptor X-chromosome inactivation assay) pour déterminer si cela pouvait être un marqueur prédictif de développement d'une néoplasie myéloïde liée au traitement dans le cancer du sein. L'étude n'a pas été concluante puisqu'une seule patiente sur 274 a développé une leucémie aigüe myéloïde à 3 ans et 5 mois de suivi (34).

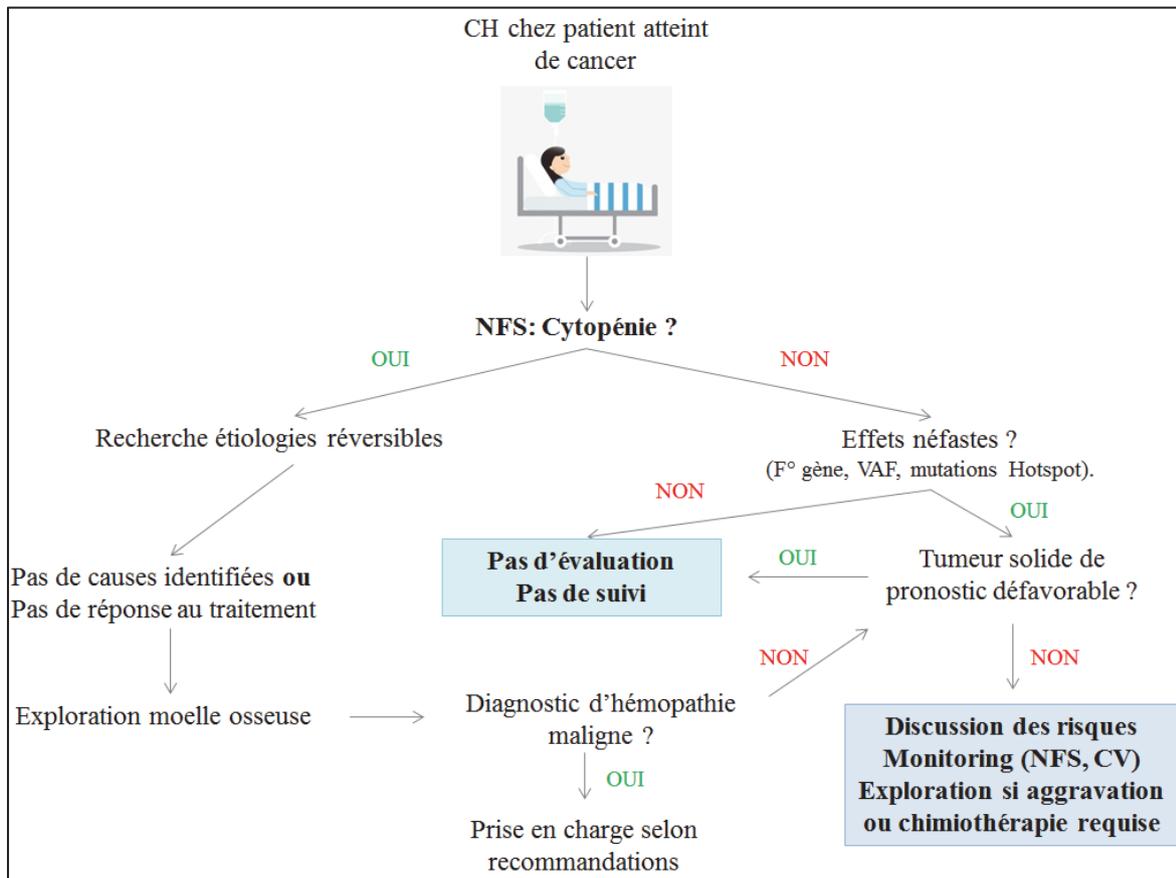
Depuis l'essor du séquençage à haut débit, les gènes impliqués dans l'hématopoïèse clonale et le risque d'évolution vers une hémopathie maligne sont bien caractérisés. En effet, les études de population basées sur le séquençage à haut débit ont montré qu'environ 30% des sujets âgés de plus de 60 ans présentent une hématopoïèse clonale détectable et celle-ci est responsable à la fois d'une augmentation du risque de développer une hémopathie maligne, mais est aussi associée à une augmentation de mortalité par pathologies cardiovasculaires (26,35)

Concernant le gène TP53, en 2019, Desai et Roboz ont examiné dans leur revue l'association entre hématopoïèse clonale et risque de développement d'hémopathies myéloïdes liées à la thérapie anticancéreuse ainsi que les stratégies possibles de prévention (33). Ils mentionnent dans cette revue que les mutations de TP53 sont présentes dans 23% des leucémies aiguës myéloïdes post thérapie et dans plus de 50% chez les patientes présentant au diagnostic un caryotype complexe et des CNV sur les chromosomes 5, 7 et 17.

Ceci est le cas de notre patiente puisqu'elle présentait un syndrome myélodysplasique avec un caryotype complexe de pronostic défavorable avec un clone majoritaire porteur d'une délétion 5q et 7q. De plus, ils expliquent que dans la grande majorité des cas, les mutations TP53 sont déjà présentes chez les patientes avant chimiothérapie à de faibles fréquences allélique et que les clones porteurs de ces mutations étaient résistants à la chimiothérapie ce qui provoque un avantage sélectif et donc un risque accru d'entraîner une hémopathie myéloïde secondaire par expansion de ces clones mutés TP53.

Enfin, la découverte fortuite d'une hématopoïèse clonale au cours de la prise en charge des patientes atteintes de cancer soulève certaines interrogations. Faut-il systématiquement explorer cette hématopoïèse clonale par un panel dédié de gènes impliqués dans les hémopathies malignes ? Faut-il mettre en place une surveillance précoce chez les patientes qui présentent une hématopoïèse clonale avant tout traitement anticancéreux ? Faut-il adapter le traitement anticancéreux ?

Dans une revue de la littérature, Parl et Bejar suggèrent un algorithme décisionnel pour l'évaluation et le management des patients atteints de cancer pour lesquels une hématopoïèse clonale est identifiée (Figure 10). Dans cet arbre décisionnel, la présence ou non d'une cytopénie, le pronostic de la tumeur solide et la nature de l'hématopoïèse clonale (gène, type de mutation, VAF) sont les éléments clés décisionnels à prendre en compte.



**Figure 10 adaptée de l’algorithme décisionnel pour l’évaluation et le management des patients atteints de cancer présentant une hématoïèse clonale (36).**

## CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

L'étude de l'incidence des mutations de prédisposition dans le cancer du sein triple négatif nous a permis de montrer que les gènes majeurs impliqués dans ce phénotype particulier ne diffèrent pas des autres sous-types de cancers du sein. En effet, malgré l'analyse d'un panel étendu de 23 gènes connus comme impliqués dans la prédisposition aux cancers du sein, BRCA1, BRCA2 et PALB2 restent les 3 gènes majeurs mutés dans les CSTN. Les recommandations actuelles du GGC basées sur l'analyse d'un panel restreint de 13 gènes dans le cancer du sein semblent donc adaptées pour la prise en charge des patientes atteintes de ce phénotype particulier et l'élargissement du panel ne semble pas actuellement présenter d'intérêt pour les patientes.

Cependant, l'analyse par panel de gènes n'a permis d'expliquer qu'environ un quart des cas de patientes avec histoire familiale positive de cancers du sein ou de l'ovaire. On peut donc penser qu'outre des causes environnementales, d'autres causes génétiques encore non connues pourraient exister comme la découverte d'autres gènes impliqués dans ce phénotype, l'impact des mutations introniques, la présence éventuelle de gènes modificateurs, ou encore de modulations épigénétiques. Dans les cas où la ségrégation familiale de cancers reste inexplicée, l'élargissement de l'analyse génétique par de l'exome ou du génome garde un intérêt. En effet, après une première analyse génétique négative et dans le cas de cancers avec antécédents familiaux particulièrement sévères évocateurs de prédisposition génétique ou de phénotypes tumoraux « extrêmes » sans antécédent familial, il peut être proposé lors d'une réunion de concertation pluridisciplinaire une analyse de génome entier pour ces patients. Ceci s'inscrit dans le cadre du plan France médecine génomique 2025 (<https://pfm2025.aviesan.fr/>). Ce plan a pour objectif de préparer l'intégration de la médecine génomique dans le parcours de soins courant et la prise en charge des pathologies. Pour cela, une filière nationale centrée sur des plateformes de séquençage à haut débit est en train d'être mise en place.

De plus, après avoir identifié des mutations sur des gènes de prédisposition, analyser l'impact clinique éventuel de celles-ci est indispensable. Au cours de notre étude, nous avons tenté d'observer des corrélations entre le statut mutationnel des patientes, les caractéristiques épidémiologiques, histologiques et l'évolution clinique. D'autres corrélations sont encore à l'étude au sein du programme hospitalier de recherche clinique SA03. En effet, des analyses transcriptomiques et d'expression génique des prélèvements de tumeurs des patientes sont

encore en cours. Confronter ces données aux données de mutations constitutionnelles permettrait d'en savoir plus sur les mécanismes d'apparition de ce sous-type de cancer du sein.

Pour conclure, la génétique, que ce soit en oncologie, dans les maladies rares ou encore dans les maladies infectieuses, est une discipline en plein essor grâce notamment au développement rapide des technologies de biologie moléculaire. Grâce à ces technologies, les biologistes médicaux sont et seront des acteurs dont l'expertise sera incontournable dans la prise en charge des patients et dans leurs parcours de soin.

## ANNEXE 1 : Comparaison des études analysant l'incidence des mutations de prédisposition et leurs impacts dans les CSTN.

Ref (année)	Couch et al (2015) (27)	Shimelis et al (2018) (28)	Buyts et al (2017) (29)	Engel et al (2018) (37)	Yadav et al (2018) (38)	Wang et al (2018) (31)	Etude SA03 (2010-2019)
Cohorte	Rétrospective, multicentriques (n=12)	Rétrospective, multicentriques	Rétrospective	TNBC sans histoire familiale de cancers, allemande	Rétrospective	Prospective	Prospective
Nb patientes	1824	8753 (Cohorte clinique)	2148 (Cohorte TNBCC)	4797	802	266	480
Séquençage	17 gènes	21 gènes	17 gènes	25 gènes	BRCA1/2	BRCA1/2	20 gènes
Incidence globale mutations de prédisposition	14,60%	14,40%	14,50%	14,40%	15,80%	27%	13,50%
BRCA1	8,50%	6	7,7	7,2	14,70%		1,25%
BRCA2	2,70%	2,3	2,7	2,6	1%		7,10%
<b>Gènes autre (global)</b>	<b>3,70%</b>	<b>6%</b>	<b>4%</b>	<b>4,60%</b>			<b>5,20%</b>
<b>PALB2</b>	<b>1,20%</b>	<b>1%</b>	<b>1,60%</b>	<b>1,25%</b>			<b>1,90%</b>
BARD1	0,50%	0,50%	0,70%	0,47%			0,20%
BRIP1	0,40%	0,42%	0,47%	0,60%			0,20%
RAD51D	0,40%	0,26%	0,37%	0,12%			1,25%
RAD50	0,30%	0,22%	0,28%	/			0,20%
RAD51C	0,30%	0,48%	0,37%	0,39%			0,41%
CHEK2	0	0,33%	0,09%	0,23%			/
CDH1	0	0,06%	/	0,04%			/
STK11	0	/	/	0			/
ATM	0,11%	0,19%	0,18%				0,60%
MRE11A	0,11%	0,06%	0,18%				
NBN	0,05%	0,13%	0,09%				
PMS2	0	0,10%	0,04%				0,20%
TP53	0,05%	0,16%	0,09%				0,20%
PTEN	0,05%	0,04%	0,04%				
XRCC2	0,16%	0	0,09%				
MLH1	0	0,05%	/				
MSH2	0	0,03%	0				
MSH6	0	0,10%	0,04%				
CDKN2A	0	0,05%	/				
Nb patients avec Co-occurrence	4	/	/			/	1

	Couch et al (2015) (27)	Engel et al (2018) (37)	Yadav et al (2018) (38)	Wang et al (2018) (26)	Etude SA03
Age au diagnostic	< mutés BRCA < mutés autres (vs non mutés)	< BRCA1 vs BRCA2	< BRCA1/2 vs non mutés	/	<BRCA1 vs BRCA2  <BRCA1/2 vs non mutés
Histoire familiale enrichie	BRCA1 (ovaire + sein) BRCA2 (ovaire) Autres gènes (non)	/	/	/	BRCA1/2
Caractéristiques tumorales	BRCA1/2 et haut grade  Autres gènes (non)	/	/	Ganglions chez mutés BRCA1/2 (vs non mutés)  Pas de différence entre mutés autres gènes et non mutés	Pas de différence
Traitement	/	/	> mastectomie bilatérale < radiation (chez les mutés)	/	/
Rechute / PFS	/	/	Pas de différences BRCA1/2 mutés vs non mutés	+ de rechute chez BRCA mutés vs non mutés à 5ans  Pas de différence gènes autres vs non mutés	Pas de différences (données Naïbo) MAJ
Survie	/	/	Pas de différence à 2 et 5 ans	Pas de différence à 5 ans (BRCA) Pas de différence gènes autres vs non mutés	Pas de différences (données Naïbo)

## RÉFÉRENCES

1. Gonçalves A, Sabatier R, Charafe-Jauffret E, Gilabert M, Provansal M, Tarpin C, et al. Triple-negative breast cancer: histoclinical and molecular features, therapeutic management and perspectives. *Bull Cancer (Paris)*. mai 2013;100(5):453-64.
2. Moretta J, Berthet P, Bonadona V, Caron O, Cohen-Haguenaer O, Colas C, et al. Recommandations françaises du Groupe Génétique et Cancer pour l'analyse en panel de gènes dans les prédispositions héréditaires au cancer du sein ou de l'ovaire. *Bull Cancer (Paris)*. oct 2018;105(10):907-17.
3. Centre de référence national sur la maladie de Huntington. Protocole national de diagnostic et de soins- Maladie de Huntington.
4. Ministère de la Santé et des Solidarités. Plan national maladies rares 2005-2008.
5. Boisson-Dupuis S, Ramirez-Alejo N, Li Z, Patin E, Rao G, Kerner G, et al. Tuberculosis and impaired IL-23-dependent IFN- $\gamma$  immunity in humans homozygous for a common *TYK2* missense variant. *Sci Immunol*. 21 déc 2018;3(30):eaau8714.
6. Jacob R, Tremblay A, Drapeau V, Provencher V, Pérusse L. Susceptibilité à l'obésité : rôle des déterminants génétiques des comportements alimentaires. *Can J Diet Pract Res*. déc 2017;78(4):197-203.
7. Pon JR, Marra MA. Driver and Passenger Mutations in Cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 24 janv 2015;10(1):25-50.
8. Alizadeh AA, Aranda V, Bardelli A, Blanpain C, Bock C, Borowski C, et al. Toward understanding and exploiting tumor heterogeneity. *Nat Med*. août 2015;21(8):846-53.
9. Oncogénétique en 2017 - Laboratoires et consultations.
10. HAS 2014. Dépistage du cancer du sein en France: Identification des femmes à haut risque et modalités de dépistage. 2014;34.
11. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*. juin 2016;17(6):333-51.
12. Selecting the best NGS enrichment assay for your needs. :8.
13. Illumina. An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology.
14. « Homogénéisation de l'interprétation de variants de séquence. :22.
15. Plon SE, Eccles DM, Easton D, Foulkes WD, Genuardi M, Greenblatt MS, et al. Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. *Hum Mutat*. nov 2008;29(11):1282-91.

16. Defossez G, Le Guyader-Peyrou S, Uhry Z, Grosclaude P, Colonna M, Dantony E, et al. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Synthèse. Saint-Maurice : Santé publique France, 2019. 20 p.
17. Espié M, Hamy A-S, Eskenazy S, Cuvier C, Giacchetti S. Épidémiologie du cancer du sein. EMC - Gynécologie. oct 2012;7(4):1-17.
18. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell. mars 2011;144(5):646-74.
19. Recommandations INCa - femmes porteuses d'une mutation de BRCA1 ou BRCA2.
20. Pourquier P. La réparation de l'ADN, cible potentielle d'un développement thérapeutique en cancérologie. Bull Cancer. 2006;21.
21. Association des praticiens de génétique moléculaire (ANPGM). Etude des prédispositions génétiques aux cancers sein/ovaire.
22. Cohen-Haguenauer O. Prédisposition héréditaire au cancer du sein (2): Risques et prise en charge. médecine/sciences. avr 2019;35(4):332-45.
23. Haffty BG, Yang Q, Reiss M, Kearney T, Higgins SA, Weidhaas J, et al. Locoregional Relapse and Distant Metastasis in Conservatively Managed Triple Negative Early-Stage Breast Cancer. J Clin Oncol. 20 déc 2006;24(36):5652-7.
24. Bhargava R, Striebel J, Beriwal S, Flickinger JC, Onisko A, Dabbs DJ. Prevalence, Morphologic Features and Proliferation Indices of Breast Carcinoma Molecular Classes Using Immunohistochemical Surrogate Markers. 2009;12.
25. Naïbo P. Cancer du sein triple négatif: histoire naturelle et étude des facteurs génétiques impliqués. Sciences du Vivant [q-bio].2018. dumas-02023905;
26. Danlos F-X, Papo M, Micol J-B. L'hématopoïèse clonale : un concept émergent à la croisée des spécialités. Rev Médecine Interne. oct 2019;40(10):684-92.
27. 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. 1 févr 2015;33(4):304-11.
28. 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. 1 août 2018;110(8):855-62.
29. 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: Panel Testing in Women With Breast Ca. Cancer. 15 mai 2017;123(10):1721-30.

30. Baretta Z, Mocellin S, Goldin E, Olopade OI, Huo D. Effect of BRCA germline mutations on breast cancer prognosis: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. oct 2016;95(40):e4975.
31. Wang YA, Jian J-W, Hung C-F, Peng H-P, Yang C-F, Cheng H-CS, et al. Germline breast cancer susceptibility gene mutations and breast cancer outcomes. *BMC Cancer* [Internet]. déc 2018 [cité 26 févr 2020];18(1). Disponible sur: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-018-4229-5>
32. Copson ER, Maishman TC, Tapper WJ, Cutress RI, Greville-Heygate S, Altman DG, et al. Germline BRCA mutation and outcome in young-onset breast cancer (POSH): a prospective cohort study. *Lancet Oncol*. févr 2018;19(2):169-80.
33. Desai P, Roboz GJ. Clonal Hematopoiesis and therapy related MDS/AML. *Best Pract Res Clin Haematol*. mars 2019;32(1):13-23.
34. Slovak ML, Bedell V, Lew D, Albain KS, Ellis GK, Livingston RB, et al. Screening for clonal hematopoiesis as a predictive marker for development of therapy-related myeloid neoplasia (t-MN) following neoadjuvant therapy for breast cancer: a Southwest Oncology Group study (S0012). *Breast Cancer Res Treat*. janv 2010;119(2):391-8.
35. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al. Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *N Engl J Med*. 25 déc 2014;371(26):2488-98.
36. Park SJ, Bejar R. Clonal hematopoiesis in cancer. *Exp Hematol*. mars 2020;83:105-12.
37. on behalf of the German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer (GC-HBOC), Engel C, Rhiem K, Hahnen E, Loibl S, Weber KE, et al. Prevalence of pathogenic BRCA1/2 germline mutations among 802 women with unilateral triple-negative breast cancer without family cancer history. *BMC Cancer* [Internet]. déc 2018 [cité 6 juill 2020];18(1). Disponible sur: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-018-4029-y>
38. Yadav S, Ladkany R, Yadav D, Alhalabi O, Khaddam S, Isaac D, et al. Impact of BRCA Mutation Status on Survival of Women With Triple-negative Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*. oct 2018;18(5):e1229-35.

## SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.
- D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.
- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.
- En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.



## RÉSUMÉ

L'oncogénétique est une discipline de la génétique humaine, dont l'objectif est d'identifier les personnes porteuses d'altérations génétiques constitutionnelles prédisposantes aux cancers dans le but de leur proposer une prise en charge adaptée. En effet, près de 5% de cancers sont liés à la présence d'altérations génétiques constitutionnelles et parmi les formes héréditaires les plus fréquentes on retrouve le syndrome seins-ovaires. Les gènes majeurs de susceptibilité impliqués dans le syndrome seins-ovaires sont aujourd'hui bien caractérisés incluant notamment les gènes *BRCA1*, *BRCA2* et *PALB2* impliqués dans le mécanisme de réparation des cassures double brins de l'ADN. De plus, depuis 2018, les gènes à analyser en routine au laboratoire d'oncogénétique pour explorer ce syndrome font l'objet de recommandations nationales. Cependant, ces recommandations ne prennent pas en compte le sous-type de cancer du sein. Le cancer du sein triple négatif (CSTN) est une entité représentant environ 10 à 15% des cancers du sein et se distingue des autres formes par un âge plus jeune des patientes au diagnostic, un risque de rechute plus élevé ainsi qu'une plus grande fréquence des métastases pulmonaires et cérébrales, à l'origine d'un pronostic plus sombre.

C'est dans ce contexte que le Programme Hospitalier de Recherche Clinique SA03 a été initié en 2010. Le but de cette étude prospective était d'évaluer dans un premier temps l'incidence des mutations constitutionnelles des principaux gènes de prédisposition chez les femmes ayant un CSTN puis d'évaluer l'impact de ces mutations sur la clinique, les caractéristiques tumorales (histologie, grade, profil moléculaire des tumeurs), ainsi que sur l'évolution des patientes (réponse au traitement, rechute, survie globale). Ce travail de thèse a eu pour objectif principal d'évaluer l'incidence des mutations constitutionnelles de prédisposition au sein de cette cohorte.

Au cours de notre étude, portant sur 297 patientes atteintes d'un CSTN, une mutation délétère ou un réarrangement des gènes *BRCA1/2* a été identifié chez 48 patientes soit une incidence de 16,16%. Concernant les gènes de prédisposition autre que *BRCA*, nous avons identifié un variant probablement pathogène ou pathogène chez 9 patientes, ce qui représente une incidence globale de 3,03% (n=9/297). Ce travail nous a permis de montrer que les gènes majeurs impliqués dans ce phénotype particulier ne diffèrent pas des autres sous-types de cancers du sein. Ceci suggère que les recommandations actuelles du GGC basées sur l'analyse d'un panel restreint de 13 gènes dans le cancer du sein semblent adaptées pour la prise en charge des patientes atteintes de cancer du sein triple négatif