



Université de Liège

Faculté de médecine

Unité de génétique humaine
GIGA- Cancer research

Promoteur : Pr. V. BOURS

**Evaluation des paramètres moléculaires BRCA1 et des
micro-ARN comme facteurs pronostiques pour les cancers
du sein triples négatifs**



Thèse soumise en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences
Biomédicales et Pharmaceutiques

Meriem BOUKERROUCHA

Année académique : 2015-2016



Université de Liège

Faculté de médecine

Unité de génétique humaine
GIGA- Cancer research

Promoteur : Pr. V. BOURS

**Evaluation des paramètres moléculaires BRCA1 et des
micro-ARN comme facteurs pronostiques pour les cancers
du sein triples négatifs**



Thèse soumise en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences
Biomédicales et Pharmaceutiques

Meriem BOUKERROUCHA

Année académique : 2015-2016

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury de me faire l'honneur d'examiner mon travail.

Je tiens à exprimer ma gratitude envers mon promoteur le professeur Vincent Bours pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, je le remercie de m'avoir permis de participer à un projet intéressant et passionnant, je le remercie pour sa disponibilité et ses précieux conseils, tout au long de ma thèse.

Je remercie également le professeur Guy Jerusalem pour ses précieux conseils concernant l'aspect clinique de ce projet. Je remercie également Dr. J. Collignon pour avoir participé au lancement de ce projet, et en particulier de la partie éthique.

Je remercie docteur Claire Josse pour son accueil au laboratoire, sa contribution au projet, ses conseils, et pour la relecture de ma thèse.

Je remercie toutes les personnes qui ont contribué à cette belle expérience qu'est la thèse. Une expérience riche en émotions, tant sur le plan professionnel que personnel.

Je remercie mes chers collègues du laboratoire de génétique humaine : Sonia, un grand merci pour ton sourire le matin, tes encouragements quand je n'y croyais plus, les pré-PCR, les cafés et repas partagés me manquent déjà. Pierre, merci pour ta bonne humeur, tes commérages et les bons moments. Corinne, je te remercie pour ton sourire ta gentillesse et ta patience. Tiberio, merci pour tes encouragements, tes rendez-vous avec l'histoire et tes mélodies me manqueront. Marie, Stéphane et Nadège, merci pour vos encouragements, votre sourire et vos potins ...

Je remercie la meilleure secrétaire au monde, Marianne, merci pour ta présence, tes bonbons, toutes les commandes réalisées pour mon projet et surtout ton grand sourire et tes chocolats pour la surveillance des examens.

Je remercie également Bouchra, Fairouz, Laurent Schoysman, Mohamed, Lucia, Maria, Nassim, William, Ayman, Jérôme K, Jérôme T, Sarah D, Sarah S, Karim, Latifa, Karin Segers, Helene Schroeder et Audrey pour leurs conseils et pour les bons moments partagés.

Je remercie le professeur Touil-Boukoffa Chafia de l'USHB de m'avoir initiée à la recherche scientifique

Je tiens à remercier ma famille, en particulier mes parents pour leurs sacrifices tout au long de mes études et leurs encouragements pendant ma thèse. Mes parents sans qui je ne serai pas ce que je suis aujourd'hui, toute une vie ne serait pas suffisante pour les remercier....

*Je remercie mon époux pour son soutien durant ma thèse, merci de m'avoir remonté le moral
Je remercie mes sœurs et mon frère pour m'avoir encouragée et surtout m'avoir fait rire à plus de 2000Km*

Je remercie également ma belle mère pour ses encouragements, Caroline et Aimé pour les discussions enrichissantes et surtout les belles soirées.

Enfin, ma thèse n'aurait pas le même goût sans ma raison d'être, ma fille : Neyla.

Liste des abréviations :

AC : Adjuvant Chemotherapy
ADN : Acide Desoxyribo Nucléique
AGO2 : protéine Argonaute 2
ARN : Acide Ribo Nucléique
ATM : Ataxia Telangectasia Mutated
BL : Basal-Like
BRCA1 ou 2 : BREast CAncer genes 1 ou 2
BARD1 : BRCA1 associated RING domain protein 1
CCND2 et CCND3 : Cyclines D2 et D3
CGH : Comparative Genomic Hybridization
CHEK2 : CHEckpoint Kinase 2
CK : CytoKératine
Cys :cysteine
DAB : 3,3' Diaminobenzidine
EIF4E : Eukaryotic translation Initiation factor 4E
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
ER : Récepteur aux Estrogènes
ESMO : European Society of Medical Oncology
FFPE : Formalin Fixed Paraffin Embedded
HR : Homologous Recombination
Her2 : Human epidermal factor receptor 2
His : histidine
LHRh : Luteinizing Hormone Releasing Hormone
LOH : perte d'hétérozygotie
MGMT : O⁶-methylguanine DNA methyltransferase
miR : microARN
mTOR :mammalian Target Of Rapamycin
NAC : Neo-Adjuvant Chemotherapy
NHEJ : Non Homologous End Joining
OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PALB2 : Partener And Localizer of BRCA2
PARP : PolyADP Ribose Polymérase
PARPi : PARP inhibitor
pb : baire de bases
PI3k :Phosphatidylinositol 3kinase
PLA : Proximity Ligation Assay
PR : Récepteur à la Progestérone
RING : Really Interesting New Gene
RISC : RNA Inducing Silencing Complex
RNA POL II : RNA polymerase II
SERM : Selective Estrogen Receptor Modulator
TBE : Tris Borate EDTA
TN : Triple Négatif
TNBC : Triple Negative Breast Cancer
TNM : Taille, Node, Metastases
UTR : UnTranslate Region (région non traduite)

Table des matières

CHAPITRE I : INTRODUCTION

1. La glande mammaire	1
2. La cancérogenèse	2
3. Le cancer du sein	4
3.1. Généralités	4
3.2. Classification	5
3.2.1. Classification histologique	5
3.2.2. Classification clinique	6
3.2.3. Classification moléculaire	8
3.3. Les facteurs de risque	11
3.3.1. Les facteurs génétiques	11
3.3.2. Les facteurs hormonaux	12
3.3.3. Les facteurs environnementaux	13
3.4. Les facteurs pronostiques et prédictifs	13
3.5. Les traitements	14
3.5.1. La chirurgie	14
3.5.2. La radiothérapie	14
3.5.3. La chimiothérapie	14
3.5.4. Les thérapies ciblées	15
4. Les cancers du sein Triples Négatifs (TN)	17
4.1. Définition	17
4.2. Classification moléculaire des TNBC	18
4.3. Hétérogénéité des TNBC	19
5. Le gène BRCA1	21
5.1. Définition	21
5.2. Structure de la protéine BRCA1	22
5.3. Fonctions de la protéine BRCA1	23
5.3.1. Réparation de l'ADN et contrôle du cycle cellulaire	24
5.3.2. Autres fonctions de BRCA1	29
5.4. Mécanismes de perte de l'expression de BRCA1 dans les cancers du sein	30
5.4.1. La Méthylation du promoteur	30
5.4.2. Interaction avec les microARN	31
5.4.3. Les Mutations	32
5.5. BRCA1 dans les cancers du sein triples négatifs	32
5.6. BRCA1 et la réponse aux traitements	33
6. Micro-ARN	35
6.1. Définitions	35
6.2. Biogenèse	35
6.3. Mécanismes d'actions des micro-ARNs	36
6.3.1. Dégradation de l'ARNm cible	36
6.3.2. Inhibition de la traduction	37
6.4. Les micro-ARN dans les cancers du sein	38
7. Références bibliographiques	40
<u>BUT DU TRAVAIL</u>	46
<u>CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES</u>	48
1. Cohorte	49

1.1 Comité d'éthique	49
1.2 Tumeurs	49
2. Lignées cellulaires	49
3. Extraction et qualité des acides nucléiques	50
3.1 Extraction des acides nucléiques	50
3.2 Qualité des acides nucléiques	50
4. Promoteur BRCA1 : Methylation Specific – Polymerase Chain Reaction (MS-PCR)	51
5. Expression de la protéine BRCA1 : Proximity ligation assaye (PLA)	52
5.1. Principe de la proximity ligation assaye	52
5.2. PLA protéine BRCA1	53
6. Expression de l'ARNm BRCA1 : hybridation in situ (ISH)	53
6.1. Principe de l'hybridation in situ	53
6.2. ISH ARNm BRCA1	53
7. Profil des microARN par RT-qPCR	54
8. Analyses statistiques	55
9. Références bibliographiques	56
<u>CHAPITRE III : RESULTATS</u>	57
I. Evaluation des paramètres moléculaires BRCA1 et des micro-ARN comme facteurs pronostiques pour les cancers du sein triples négatifs	58
I.1 Résumé	59
I.2. Abstract	60
I.3. Background	61
I.4. Materials and methods	63
I.4.1. Ethical statement	63
I.4.2. Patient and sample collection and study design	63
I.4.3. DNA and RNA extraction	66
I.4.4. BRCA1 promoter methylation	66
I.4.5. BRCA1 mRNA expression	66
I.4.6. BRCA1 protein expression and interaction with BARD1	66
I.4.7. Tumoral miRNA expression assessment	66
I.4.8. Statistical analysis	67
I.5. Results	68
I.5.1. Quantification of <i>in situ</i> BRCA1 mRNA and protein expression	68
I.5.2. Quantification of <i>in situ</i> BRCA1-BARD1 interaction	70
I.5.3. BRCA1 promoter methylation and survival	70
I.5.4. Micro-RNA profiling in tumors	70
I.5.5. Prediction of relapse using multivariate analysis	71
I.6. Discussion	76
I.7. Conclusions	78
II. Les mutations germinales BRCA1 et le développement du glioblastome : rapport de deux cas.	85
II.1. Résumé	86
II.2. Abstract	87
II.3. Introduction	88
II.4. Ethic statement	88
II.5. Cases description	89
II.6. Molecular analysis	91
II.6.1. DNA isolation	91
II.6.2. BRCA1 gene analysis	92

II.6.3. BRCA1 and O ⁶ -methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) methylation status	92
II.6.4. <i>BRCA1</i> mRNA expression	93
II.6.5. BRCA1 protein expression	94
II.7. Discussion	97
II.8. Conclusion	98
<u>CHAPITRE IV : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</u>	102
1. Conclusions et perspectives	103
2. Références bibliographiques	109
LISTE DES PUBLICATIONS	111
<u>ANNEXE 1</u>	112

CHAPITRE I : INTRODUCTION

1. La glande mammaire

Le sein est l'organe qui renferme la glande mammaire. Cette glande exocrine d'origine ectodermique, sécrète du lait. La glande mammaire est nichée dans du tissu adipeux (Figure 1.A). Elle est composée de 15 à 20 lobes glandulaires qui contiennent des lobules. Chaque lobule contient des alvéoles ou acini. L'unité de base est l'alvéole ou l'acinus, une cavité à activité sécrétrice. Chaque acinus se draine par un canal alvéolaire. Les acini et les canaux alvéolaires forment le lobule qui se draine par un canal lobulaire. Plusieurs lobules réunis forment un lobe glandulaire qui se draine par un canal galactophore ou lactifère (Figure 1.B). Les lobes sont entourés de tissu conjonctif, de filets nerveux, de vaisseaux sanguins et de vaisseaux lymphatiques. La majorité des vaisseaux lymphatiques se jette dans les ganglions axillaires.

Le développement anatomique de cette glande commence dès les premières semaines de vie foetale et suit les étapes hormonales de la vie de la femme.

(Hennighausen & Robinson 2001)

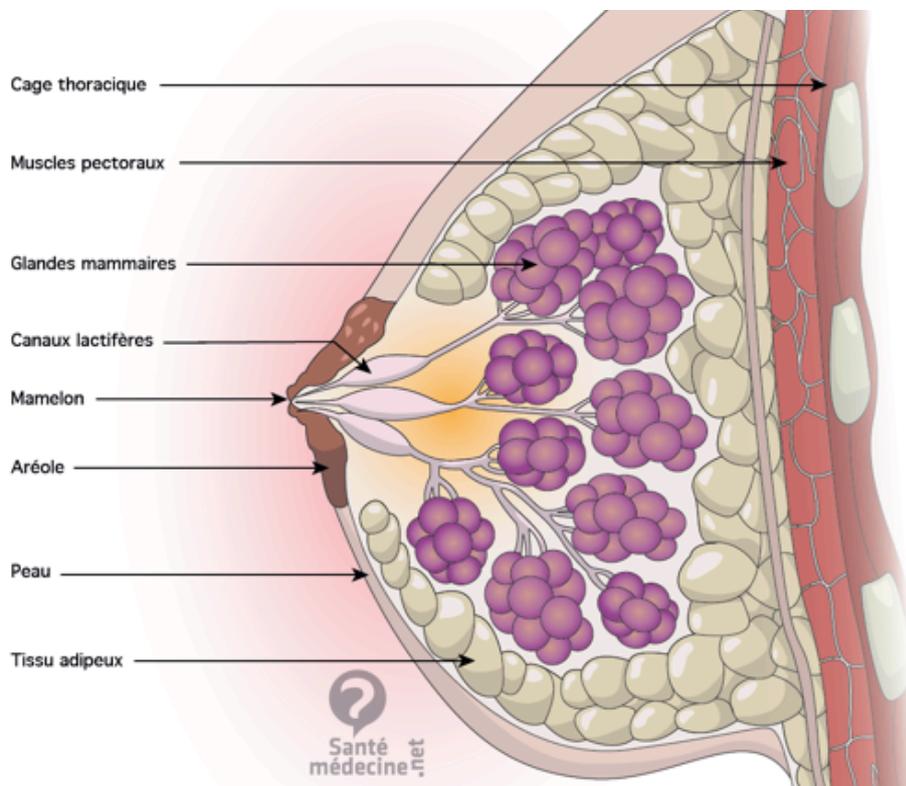


Figure 1. A. Schéma représentant une coupe para-sagittale du sein.

(<http://sante-medecine.commentcamarche.net>)

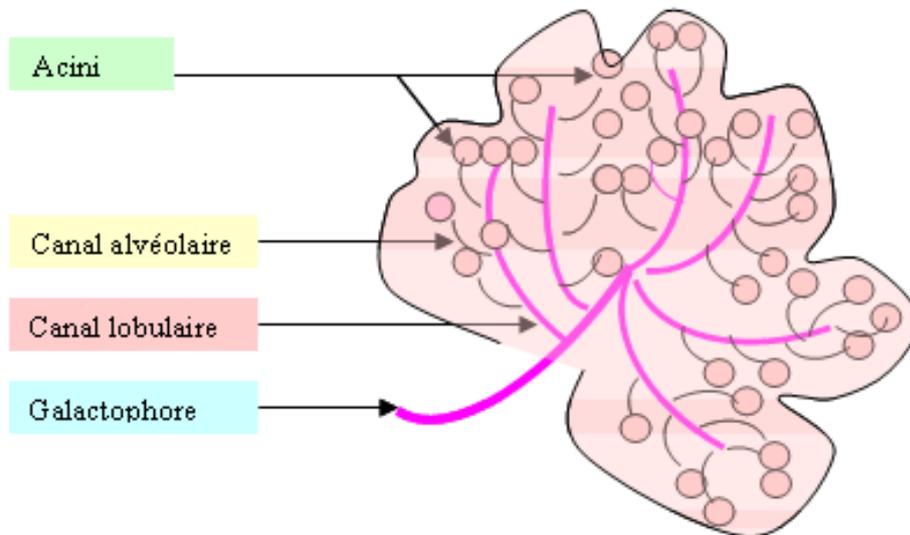


Figure 1. B. Schéma représentant un lobe glandulaire.

(<http://olympusmom.wordpress.com>)

2. La cancérogenèse

L'exposition à certains agents mutagènes externes conduit à l'initiation de la cancérogenèse de même que des mutations ponctuelles et aléatoires de l'ADN.

Le mécanisme de cancérogenèse est initié par l'accumulation de plusieurs altérations au niveau du génome. En effet, l'accumulation de mutations dans plusieurs gènes d'une même cellule est indispensable pour conférer à cette cellule le caractère cancéreux. Ces mutations sont dites « conductrices » (driver mutations). Ces mutations résultent en l'activation d'oncogènes et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs et altèrent le contrôle du cycle cellulaire ainsi que les mécanismes de réparation de l'ADN induisant ainsi une prolifération cellulaire qui résulte en la formation de tumeur. La prolifération cellulaire est suivie par une expansion clonale de cellules ayant la même cellule d'origine. L'origine cellulaire de chaque cancer est donc très importante pour suivre l'évolution du génome cancéreux. (Figure 2)

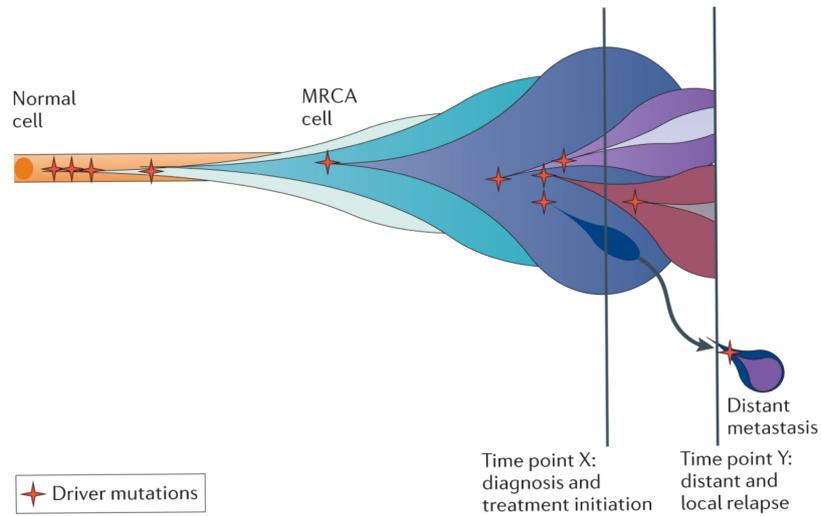


Figure 2 : L'évolution du génome cancéreux et apparition des mutations conductrices.
(Campbell 2012)

Le tableau ci-dessous représente quelques gènes cibles de mutations les plus fréquentes dans les cancers du sein et les cancers du sein triple négatifs.

Gène	Cancers du sein (%)	TNBC (%)
<i>TP53</i>	35	54
<i>PIK3CA</i>	34	8
<i>GATA3</i>	9	0
<i>MAP3K1</i>	8	0
<i>MLL3</i>	6	3
<i>CDH1</i>	6	2
<i>USH2A</i>	5	8
<i>PTEN</i>	3	3
<i>RUNX1</i>	3	0
<i>MAP2K4</i>	3	1
<i>NCOR1</i>	3	1
<i>RBI</i>	3	5
<i>TBX3</i>	2	1
<i>PIK3R1</i>	2	2
<i>CTCF</i>	2	1

<i>NF1</i>	2	1
<i>SF3B1</i>	2	0
<i>AKT1</i>	2	0
<i>CBFB</i>	1	1
<i>FOXA1</i>	1	1

Tableau 1: Liste des gènes les plus fréquemment mutés dans les cancers du sein

Les nouvelles techniques et méthodes de séquençage ont permis de comprendre l'évolution du génome cancéreux et de définir l'hétérogénéité tumorale. En effet, le séquençage du génome cancéreux permet de définir les mutations somatiques acquises au cours de la cancérogenèse s'il est comparé à un séquençage du tissu sain où ne seront présentes que les mutations germinales. Par ailleurs, le séquençage peut cibler uniquement certains gènes, ou encore l'ensemble des exons, et permet d'identifier avec précision les mutations qui altèrent certains gènes. Les avancées technologiques en la matière permettent également de séquencer un génome d'une cellule cancéreuse et le comparer au génome d'une autre cellule cancéreuse issue d'une même tumeur dans le but d'en définir l'hétérogénéité intra-tumorale. Cette méthode de séquençage dite « single-cell sequencing » couplée aux différents outils bioinformatiques permet d'établir la phylogénie du cancer.

L'application de ces méthodes en clinique lors du diagnostic permettra d'arriver à établir une cartographie des gènes mutés pour chaque patient et de choisir le schéma thérapeutique adéquat pour arriver à une « médecine personnalisée ».

Cependant, il apparaît que la combinaison des gènes mutés retrouvée est unique à chaque cancer, ce qui complique considérablement l'application de cette médecine personnalisée.

(Campbell 2012)

3. Le cancer du sein

3.1. Généralités

Le cancer du sein est un problème de santé publique. C'est le cancer le plus fréquent dans le monde pour les femmes, et le 2^{ème} cancer le plus fréquent dans l'ensemble, avec plus de 1.676.000 nouveaux cas diagnostiqués en 2012 (<http://www.cancerresearchuk.org>). En Belgique,

10531 cas ont été diagnostiqués en 2012 (Registre national Belge du cancer). Les cliniciens estiment qu'environ 30% des patientes présenteront une rechute.

L'incidence du cancer du sein augmente au fil des années, probablement à cause des progrès de dépistage et des campagnes de sensibilisation, sans compter le vieillissement de la population.

Le cancer du sein est une maladie multifactorielle caractérisée par une importante hétérogénéité intra et inter tumorale. Par ailleurs, cette hétérogénéité se traduit par la réponse aux traitements. En effet, certains patients d'un même groupe de tumeurs répondent différemment au même traitement.

3.2. Classification

3.2.1. Classification histologique

La plupart des tumeurs malignes du sein se développent à partir de cellules épithéliales des canaux galactophores (carcinome canalaire) ou des lobules glandulaires (carcinome lobulaire). Ces deux types représentent plus de 90% des tumeurs et sont généralement infiltrants. Dans certains cas, les cellules cancéreuses prolifèrent sans rupture de la lame basale, aboutissant à un carcinome in situ.

La classification histologique utilisée est celle établie par l'organisation mondiale de la santé (OMS) en 2003 (Tavassoéli F.A 2003)

Tableau 2 : Classification histologique des tumeurs mammaires d'origine épithéliale selon l'OMS

Tumeurs épithéliales non infiltrantes
Carcinome canalaire in situ (intra-canalaire) (CCIS)
Carcinome lobulaire in situ (CLIS)
Tumeurs épithéliales infiltrantes
Carcinome canalaire infiltrant de forme commune
Carcinome canalaire infiltrant avec composante intra-canalaire prédominante

Carcinome lobulaire infiltrant
Carcinome mucineux
Carcinome médullaire
Carcinome papillaire
Carcinome tubuleux
Carcinome adénoïde kystique
Carcinome sécrétant juvénile
Carcinome apocrine
Carcinome métaplasique de type épidermoïde
Carcinome métaplasique de type à cellules fusiformes
Carcinome métaplasique de type chondroïde et osseux
Carcinome métaplasique de type mixte
Maladie de Paget du mamelon

3.2.2. Classification clinique

Les récepteurs hormonaux et le récepteur Her2 :

En clinique, la classification des cancers du sein est basée sur l'expression des récepteurs hormonaux, les récepteurs aux estrogènes (ER) et les récepteurs à la progestérone (PR), ainsi que sur la surexpression du récepteur tyrosine kinase Her2. L'expression des récepteurs est estimée par immunohistochimie sur coupes de tumeurs par les pathologistes.

Cette classification permet de distinguer 3 grands groupes :

Les cancers hormono-sensibles

Les cancers Her2+

Les cancers triples négatifs

Les cancers hormono-sensibles sont les plus fréquents (environ $\frac{3}{4}$ des cancers du sein) et de pronostic favorable. Ces tumeurs expriment les récepteurs aux estrogènes et/ou les récepteurs à la progestérone. Ces tumeurs répondent à une hormonothérapie.

Les cancers Her2+ sont des cancers avec une amplification du gène Her2+. Ces tumeurs représentent environ 20% des cancers du sein et sont traitées par un anti-Her2, comme le trastuzumab (herceptine) un anticorps monoclonal dirigé contre Her2.

Les cancers triples négatifs sont définis par l'absence d'expression des récepteurs aux estrogènes, des récepteurs à la progestérone et des récepteurs tyrosine kinase Her2. Ce groupe est de mauvais pronostic car à l'heure actuelle les cliniciens ne disposent pas de cibles thérapeutiques spécifiques pour ces tumeurs très agressives.

La classification TNM :

Cette classification repose sur l'évaluation de 3 paramètres : la taille de la tumeur (T), l'envahissement ganglionnaire (N), les métastases (M). Ces paramètres permettent d'évaluer l'extension tumorale locale, régionale et métastatique.

La taille de la tumeur : T varie de x à 4. Tx quand la tumeur primaire ne peut pas être évaluée. Au contraire à T3 ou la taille de la tumeur est supérieure à 5 cm. T4 est attribuée à une tumeur de n'importe quelle taille avec une extension directe à la paroi thoracique et/ou la peau.

L'envahissement ganglionnaire : N varie de x à 3. pNx quand les ganglions lymphatiques ne peuvent pas être évalués . pN3 signifie que plus de 10 ganglions lymphatiques ou sous-claviculaires sont atteints par les cellules tumorales.

Les métastases : M varie de 0 à 1. M0 correspond à l'absence de détection de métastases contrairement à M1.

La combinaison de ces 3 paramètres permet de déterminer le stade du cancer du sein.

Stade	Définition
Stade 0	Les cellules anormales restent confinées à l'intérieur du canal où elles sont apparues initialement
Stade I	La tumeur mesure moins de 2 cm et de petits amas de cellules cancéreuses sont retrouvés dans les ganglions lymphatiques. Le cancer de stade I est divisé en stades IA et IB.
Stade II	Soit la tumeur mesure moins de 2 cm et s'est propagée aux ganglions lymphatiques de l'aisselle, soit la tumeur mesure entre 2 cm et 5 cm de diamètre sans s'être propagée vers les ganglions lymphatiques de l'aisselle. Le cancer de stade II est divisé en stades IIA et IIB.
Stade III	La tumeur peut avoir n'importe quelle taille, mais : <ul style="list-style-type: none"> • elle s'est propagée à la paroi thoracique et/ou la peau du sein ; • elle s'est propagée à au moins 10 ganglions lymphatiques de l'aisselle ou les ganglions de l'aisselle adhèrent les uns aux autres ou à d'autres structures ; • elle s'est propagée aux ganglions lymphatiques à proximité du sternum ; • elle s'est propagée aux ganglions lymphatiques situés en dessous ou au dessus de la clavicule. Le cancer de stade III est divisé en stades IIIA, IIIB et IIIC
Stade IV	Le cancer s'est propagé à d'autres organes du corps, le plus souvent les os, les poumons, le foie ou le cerveau. Ces tumeurs se développant à distance sont appelées métastases.

Tableau 3 : Les différents stades du cancer du sein établis par l'ESMO.

Par ailleurs, la prolifération cellulaire est mesurée par les pathologistes en utilisant un indice de prolifération, le Ki67. Le Ki67 est une protéine nucléaire exprimée pendant tout le cycle cellulaire sauf en phase G0.

3.2.3. Classification moléculaire

Dans les années 2000, des études de l'expression génique des cancers du sein par microarray ont permis d'établir une classification moléculaire.

En effet, cette classification moléculaire basée sur l'expression d'un panel de gènes dans les cancers du sein a permis de classer les tumeurs du sein en 4 groupes (Figure 2) (Perou et al. 2000)(Sørlie et al. 2001):

Luminal (A et B) : ces groupes comprennent les cancers qui expriment les récepteurs aux estrogènes (ER+).

Les tumeurs luminal A présentent une expression élevée des gènes : ER α , GATA 3, XBP1 (X-box binding protein 1), TFF3 (trefoil factor 3), HNF3 (hepatocyte nuclear factor 3), et les gènes LIV-1, qui codent pour des transporteurs de zinc, régulés par les estrogènes

Les tumeurs luminal B présentent une faible expression du gène ER et des gènes régulés par les estrogènes. Ces tumeurs présentent une forte expression des gènes liés à la prolifération (ki67).

Her2+ : ce groupe de tumeurs est caractérisé par une sur-expression des gènes situés sur le chromosome 17q22.24 (amplicon de ERBB2) tels que ERBB2 et GRB7.

Basal-like : les tumeurs de ce groupe présentent une forte expression des kératines 5 et 17, laminine et FABP7 (Fatty Acid Binding Protein 7).

Normal breast-like : les tumeurs de ce groupe sur-expriment les gènes exprimés par les adipocytes et les cellules non épithéliales.

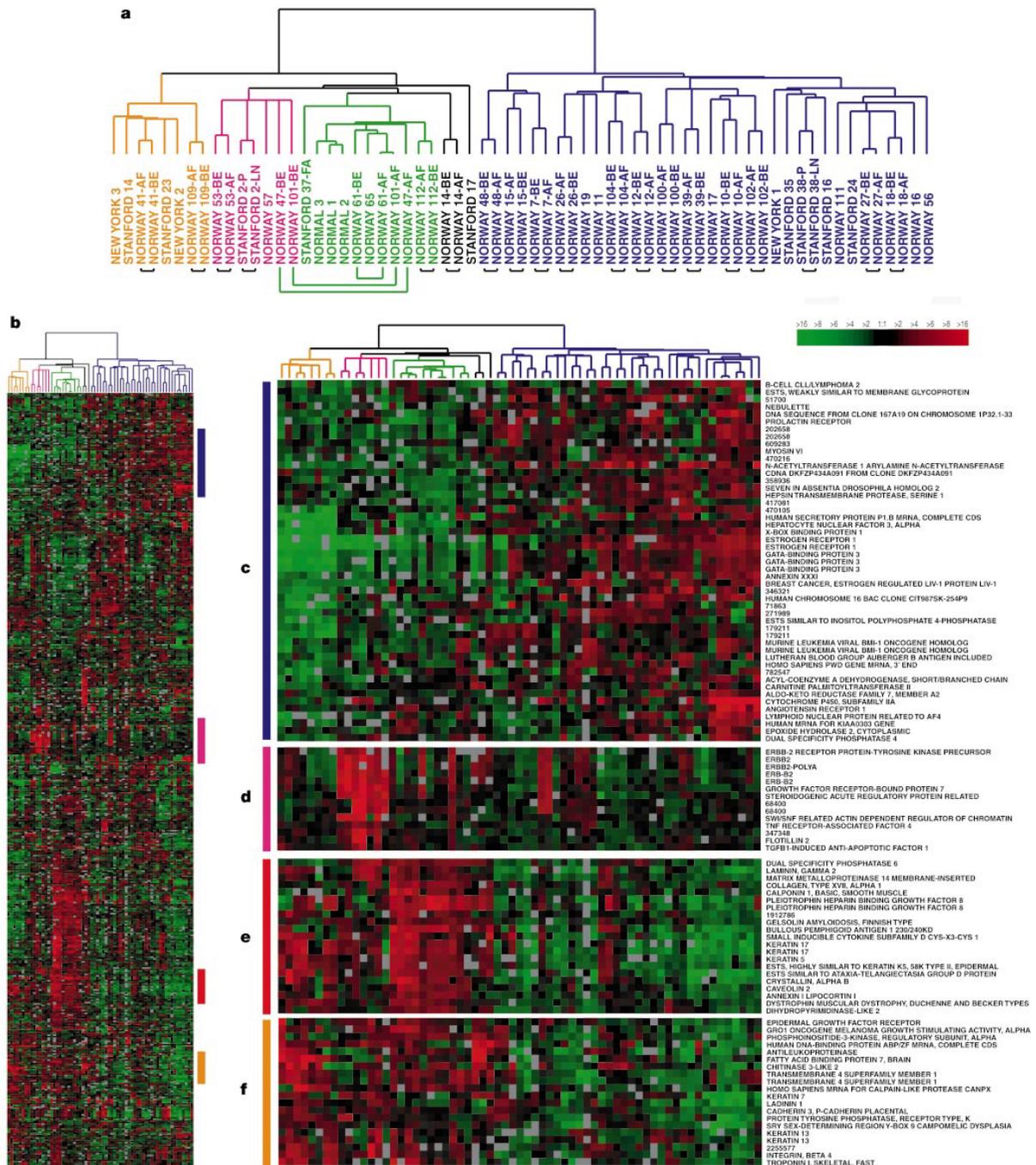


Figure 3: Classification moléculaire des cancers du sein (Perou et al. 2000)

Quelques années plus tard, un autre sous-type dit “claudin low” a été décrit par Hennessy et ses collaborateurs. Ce sous type présente les mêmes caractéristiques que les cancers basal-like métaplasiques suggérant une origine cellulaire commune. En effet, ce sous type représente 5 à 10% des cancers du sein et jusqu’à 30% des tumeurs triple négatives (B. T. Hennessy et al. 2010).

Les classifications moléculaires et cliniques ne se superposent pas tout à fait. De plus, les classifications existantes ne correspondent pas systématiquement aux variations de la réponse aux traitements, ni aux différents pronostics. L'hétérogénéité tumorale est sans doute la cause de ces discordances. En effet, l'épithélium de la glande mammaire est composé de deux types de cellules, qui sont les descendantes de deux types de cellules souches unipotentes : les cellules luminales qui expriment les cytokératines 8/18 et les cellules basales qui expriment les cytokératines 5/14 et/ou l'actine et/ou p63. A leur tour, ces deux types de cellules souches unipotentes proviennent de cellules multipotentes. Des études récentes, ont montré que la mutation PIK3CA-H1047R lorsqu'elle survient dans les cellules souches unipotente basales, pouvaient les entraîner à se différencier en cellules multipotentes, générant ainsi une grande hétérogénéité tumorale car la tumeur lors de son évolution peut ensuite présenter la mutation PI3K à la fois dans les cellules basales et luminales. Or la présence de la mutation PI3K dans ces différents types cellulaires ne conduit pas aux mêmes sous-types de tumeur, ni aux mêmes pronostic.(Koren et al. 2015)

3.3. Les facteurs de risque

Les facteurs de risque de développer un cancer du sein sont classés en 3 groupes : les facteurs génétiques, hormonaux et environnementaux.

3.3.1. Les facteurs génétiques

La prédisposition génétique à développer un cancer du sein est transmise de façon autosomale dominante.

Plusieurs gènes sont impliqués dans les cancers du sein. Les gènes *BRCA* (*BRCA1* et *BRCA2*) sont les premiers gènes de prédisposition au cancer du sein. *BRCA1* sera décrit en détails au point 5 de cette introduction. Les gènes *BRCA* sont mutés dans 20% des cancers du sein familiaux. La prévalence des mutations dans les gènes *BRCA* dépend de l'origine ethnique des populations.

D'autres gènes sont connus pour favoriser le cancer du sein, notamment : *PALB2*, *CHEK2*, et *TP53*.

PALB2 (partner and localizer of *BRCA2*) est un gène qui code pour une protéine impliquée dans la localisation nucléaire et la stabilité de *BRCA2*. *PALB2* est requise pour certaines fonctions de *BRCA2* dans la recombinaison homologue. La mutation bi allélique de *PALB2*

est impliquée dans l'anémie de Fanconie. Rahman et ses collaborateurs ont montré qu'une mutation mono-allélique de PALB2 prédispose à un risque de cancer sein. (Rahman et al. 2007)

CHEK2 code pour une protéine impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire. Cette protéine est activée par phosphorylation par ATM suite aux dommages à l'ADN par des radiations ionisantes. Le rôle de CHEK2 est de bloquer l'entrée en mitose suite aux dommages à l'ADN. Une étude a évalué la fréquence d'une mutation (CHEK2*1100delC) dans CHEK2 chez les patients atteints de cancer du sein et a montré que cette mutation prédispose à un risque modéré de cancer du sein. (Meijers-Heijboer et al. 2002)

Le gène *TP 53*, surnommé le gardien du génome, impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire est un suppresseur de tumeur fréquemment muté dans plusieurs types de cancers. Ce gène est muté dans 20 à 30% des cancers du sein. Cependant la fréquence de mutations diffère en fonction du type moléculaire de cancer du sein. Dans les cancers du sein type basal-like TP53 est muté dans 88% des cas. (Langerod et al. 2007) (Haupt et al. 2015)

Des mutations germinales dans certains gènes favorisent les cancers du sein triple négatifs. Couch et ses collaborateurs ont étudié 17 gènes de prédispositions au cancer du sein dans une cohorte de 1824 cancers TN. Après analyse des mutations dans ces 17 gènes dont les gènes BRCA, PALB2, BARD1, CHEK2 et TP53, ils concluent que les gènes BRCA prédisposent un haut risque de cancer du sein TN comparé aux autres gènes. D'autres part, ils retrouvent 81% de mutations germinales concernent des gènes impliqués dans la recombinaison homologue.

(Couch et al. 2014)

3.3.2. Les facteurs hormonaux

Au cours de la vie, le corps de la femme subit plusieurs changements des niveaux de la production d'hormones. Des études ont démontré que l'apparition des menstrues de façon précoce (avant l'âge de 12 ans) augmente le risque de développer un cancer du sein, suite à l'exposition à des taux d'estrogènes relativement élevés et régulièrement à un jeune âge. D'autre part, les femmes qui sont ménopausées tardivement (après 50 ans) comparées à celles qui sont ménopausées avant l'âge de 50 ans, auraient plus de risque de développer un cancer du sein. De plus, les femmes ayant une première grossesse tardive (après 30 ans) ou celles n'ayant pas eu de grossesses sont plus exposées au développement d'un cancer mammaire. (Dumalaon-Canaria et al. 2014)

3.3.3 Les facteurs environnementaux

L'alimentation, l'excès de poids ou encore le manque d'activité physique augmentent le risque de développement de plusieurs cancers dont le cancer du sein, de même que la consommation de tabac ou même l'exposition passive, ou encore la consommation de boissons alcoolisées. Des infections virales pourraient être impliquées dans le développement du cancer du sein (Parkin et al. 2011)

Une exposition à des agents exogènes comme les métaux lourds (cadmium) ou bien à certains pesticides tels le DDT ou DDE accroîtrait de risque de développer un cancer du sein. D'autre part, l'exposition fréquente aux radiations ionisantes, considérées comme agents cancérigènes, contribuerait au développement d'un cancer mammaire. D'autres facteurs environnementaux tel le stress, pourraient contribuer à un risque plus élevé de développer un cancer mammaire.(Dumalaon-Canaria et al. 2014)

3.4 Les facteurs pronostiques et prédictifs

Les facteurs pronostiques sont des facteurs qui permettent de définir le risque de rechute locale ou métastatique ainsi que le risque de décès. Les facteurs prédictifs, quant à eux, ils permettent de définir la réponse aux traitements

Facteurs	Pronostiques	Prédictifs
Ganglions envahis	Oui	
Taille de la tumeur	Oui	
Index de prolifération (Ki67)	Oui	
Age	oui	
Infiltration lymphovasculaire	Oui	
Récepteurs ER et PR	Oui	Oui
Récepteur Her2	Oui	Oui
Profil moléculaire	Oui	Oui

Tableau 4 : Les facteurs pronostiques et prédictifs dans les cancers du sein

(Freres et al. 2010)

Les facteurs prédictifs de la réponse aux traitements sont malheureusement peu nombreux comme on peut le constater dans le tableau. L'identification de nouveaux facteurs prédictifs permettrait de mieux orienter les patientes vers un traitement plus approprié et de développer une médecine personnalisée.

3.5 Les traitements

Le choix du schéma thérapeutique est basé sur le type de tumeur. Une tumeur localisée nécessite un traitement qui contrôle localement la tumeur à savoir la chirurgie et la radiothérapie. Par contre, une tumeur métastatique nécessite un traitement de contrôle local et de contrôle à distance.

Les cliniciens se basent sur la classification clinique (TNM+ expression des récepteurs) pour le choix du schéma thérapeutique. Les classifications histologiques et moléculaires ont jusqu'à présent peu d'incidence dans les choix du traitement.

3.5.1 La chirurgie

Le choix du type de chirurgie dépend du stade de la tumeur, de l'âge de la patiente, ses antécédents familiaux, son statut ménopausique, et éventuellement d'autres pathologies chez la patiente.

La chirurgie consiste en l'ablation de la tumeur « tumorectomie » et le reste du sein est conservé (chirurgie conservatrice), ou bien l'ablation entière du sein « mastectomie ». De plus, une ablation des ganglions est réalisée lorsqu'ils sont atteints par les cellules tumorales. (ESMO Guidelines 2013)

3.5.2 La radiothérapie

La radiothérapie consiste en l'utilisation de rayonnements ionisants radioactifs à haute énergie pour détruire les cellules cancéreuses et réduire le risque de rechutes. Le sein est irradié directement ce qui réduit le risque de rechute locale. La radiothérapie est combinée à la chirurgie et/ou chimiothérapie selon les cas. (ESMO Guidelines 2013)

3.5.3 La chimiothérapie

Il existe deux modes d'administration de la chimiothérapie : la chimiothérapie adjuvante (AC) et la chimiothérapie néo-adjuvante (NAC).

Cette dernière est administrée avant la chirurgie, dans les cas de tumeur de très grande taille pour réduire la taille de la tumeur ou bien à un stade très avancé (T4) pour réduire les métastases. La chimiothérapie adjuvante est administrée après la chirurgie pour diminuer le risque de rechute et augmenter le pronostic vital. Le choix des agents dépend du type moléculaire de la tumeur.

Les agents thérapeutiques utilisés sont en général les anthracyclines (epirubicine, doxorubicine) et/ou les taxanes (paclitaxel ou docétaxel). Ces agents agissent principalement sur les mécanismes de division cellulaire : les anthracyclines bloquent la topoisomérase II pendant la réplication et les taxanes empêchent la dépolymérisation des microtubules pendant la mitose.

La chimiothérapie est administrée en 4 à 8 cycles (12 à 24 semaines). D'autres agents non-anthracycliques peuvent être utilisés chez les patients qui risquent des complications cardiaques.

Par ailleurs, d'autres traitements qui ciblent certaines voies de signalisation comme l'inhibiteur oral de mTOR (Etorolimus) sont utilisés en combinaison avec d'autres agents chez certaines patientes.

(ESMO Guidelines 2013) (Makhoul & Kiwan 2011) (Collignon et al. 2011)

3.5.4 Les thérapies ciblées

Certains sous-groupes de cancers du sein peuvent bénéficier de thérapies ciblées.

Les cancers hormonosensibles sont traités après la chirurgie avec des antagonistes aux récepteurs aux estrogènes appelés « SERMs » (Selective Estrogen Receptor Modulators) le tamoxifène est l'agent utilisé pour les cancers du sein. Il peut être utilisé seul ou en combinaison avec d'autres agents. Les SERMs sont en compétition avec les estrogènes pour se fixer sur les récepteurs. Chez les patientes non ménopausées, ou ayant subi une ovariectomie, des analogues de l'hormone de libération de la lutéinostimuline (LHRH) sont utilisés. Ces molécules bloquent la production des estrogènes par les ovaires diminuant ainsi le taux des estrogènes.

D'autres thérapies sont utilisées, comme les inhibiteurs des aromatasés, ces agents bloquent la synthèse des estrogènes en inhibant les aromatasés.

Les cancers Her2+ bénéficient de traitement au trastuzumab (herceptine), un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur Her2. Le traitement au trastuzumab dure pendant 1 an après la chirurgie pour les cancers localisés.

Ce traitement ne peut pas être combiné à d'autres anthracyclines dans certains cas à cause de l'effet cardiotoxique du trastuzumab.

Par contre, les tumeurs du groupe triple négatif ne bénéficient d'aucune thérapie ciblée car à l'heure actuelle, il n'y a pas de cible thérapeutique spécifique à ce groupe de tumeurs. Cependant, les dérivées de platine seraient de bons agents pour les tumeurs TN avec un défaut de réparation de l'ADN. Les EGFR étant souvent surexprimés dans les cancers TN, les inhibiteurs de l'EGFR seraient potentiellement efficaces pour ce type de tumeurs. Par ailleurs, les inhibiteurs de la PARP sont les plus étudiés et les plus efficaces dans les cas de tumeurs TN et plus particulièrement les tumeurs présentant une mutation BRCA. Ce point sera abordé dans la partie BRCA de cette introduction.

(Drew et al. 2011)(Collignon et al. 2011) (Visovsky 2014)

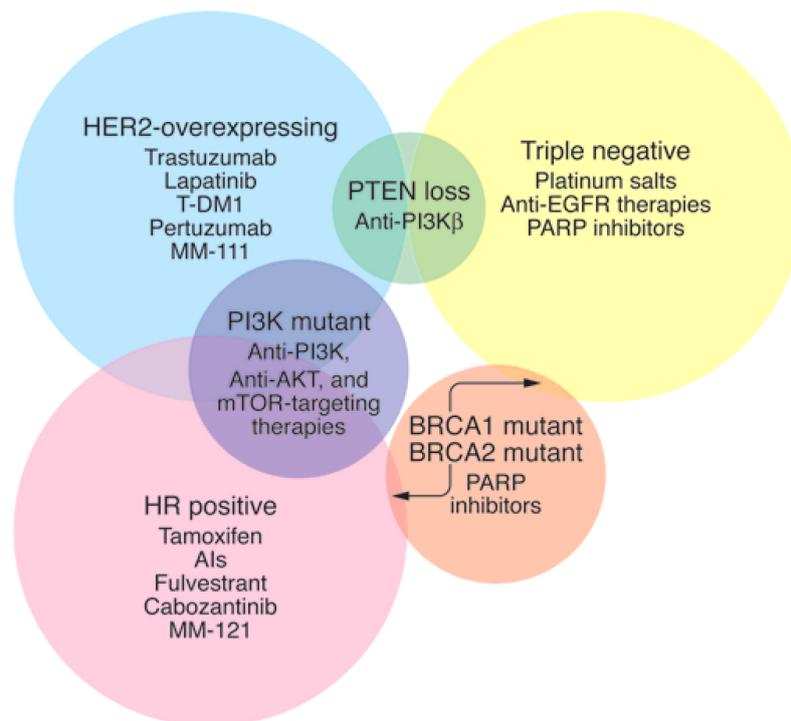


Figure 4 : Représentation schématisée des thérapies ciblées utilisées dans les cancers du sein. (Higgins & Baselga 2011)

Les combinaisons des différentes thérapies sont utilisées en fonction des sous-types moléculaires et surtout de l'évolution de la tumeur (Rechutes et apparition de résistance). (ESMO Guidelines 2013)

4. Les cancers du sein Triples Négatifs (TN)

4.1 Définition

Les cancers du sein dits « triples négatifs » représentent 10 à 15% de tous les cancers du sein. Ils sont caractérisés par l'absence de l'expression des récepteurs aux estrogènes (ER), absence d'expression des récepteurs à la progestérone (PR) et l'absence de surexpression du récepteur tyrosine kinase Her2, d'où leur nom « Triple Négatif ». Ces cancers sont majoritairement des carcinomes canaux infiltrants de haut grade (grade III) et surviennent le plus souvent chez les patientes jeunes avec une tumeur de grande taille et un envahissement ganglionnaire au moment diagnostic.

Les cancers TN sont des cancers de mauvais pronostic avec un taux de rechute élevé à 3 ans (Figure5) ; les rechutes sont souvent viscérales et cérébrales avec moins de métastases osseuses.

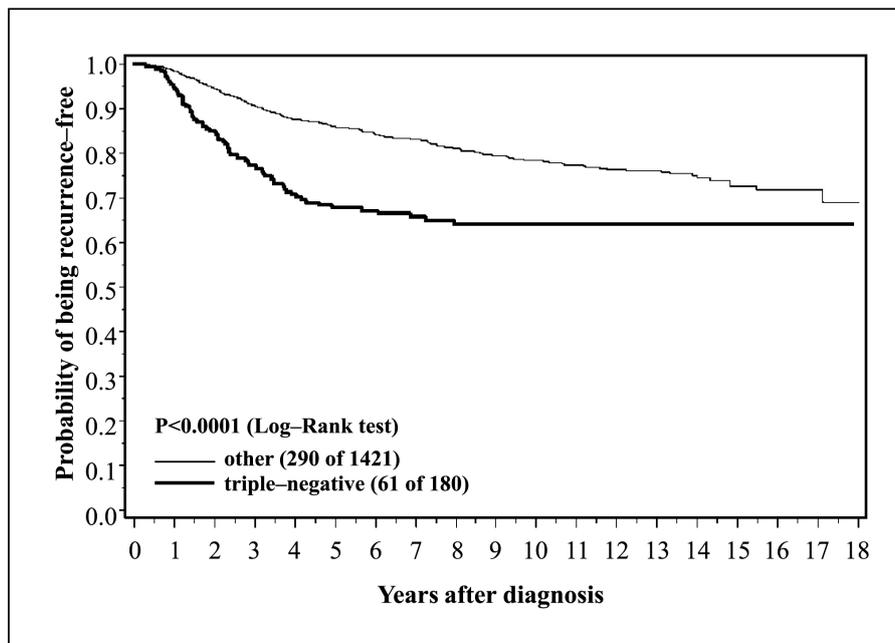


Figure 5 : Rechutes des cancers triples-négatifs comparés à tous les cancers du sein.

(Dent et al. 2007)

Ce groupe hétérogène constitue un challenge pour le développement de traitement spécifique vu l'absence de cible. La connaissance des altérations génétiques responsables de leur développement représente une étape primordiale activement étudiée dans l'espoir de trouver des cibles thérapeutiques potentielles.

(Haffty et al. 2006) (Dent et al. 2007) (Collignon et al. 2011)

4.2 Classification moléculaire des TNBC

Les cancers du sein TN sont souvent assimilés au type moléculaire Basal-like (BL). Cependant, toutes les tumeurs TN n'expriment pas les marqueurs des cellules basales. Certaines exprimeraient des marqueurs retrouvés dans le type Luminal. En effet, une majorité des tumeurs BL sont triples négatives mais seulement 50 à 80% des tumeurs TN sont de type BL. Par ailleurs, le sous-type claudin-low représente jusqu'à 30% des tumeurs TN.

Les cancers triples négatifs sont très hétérogènes et une classification moléculaire plus précise est nécessaire. Brian D Lehmann et ses collaborateurs ont réalisé une étude basée sur une analyse d'une compilation de données de profils d'expression génique de 3 247 cancers du sein. Ces données ont été obtenues de 21 études et ont été subdivisées en 2 groupes de données ; données d'étude et données de validation. Cette étude a permis d'identifier 6 sous-types moléculaires au sein des TNBC (Figure 6) :

Basal-like1 (BL1)

Basal-like2 (BL2)

Immunomodulatory (IM)

Mesenchymal-like (M)

Mesenchymal Stem-like (MSL)

Luminal AR (LAR)



Figure 6 : Identification des sous-types moléculaires des TNBC
 (B. D. B. Lehmann et al. 2011)

Cependant, à l'heure actuelle cette classification n'est pas utilisée en clinique lors du diagnostic (B. D. Lehmann et al. 2011) (Collignon et al. 2011)

4.3 Hétérogénéité des TNBC

Les tumeurs TN présentent de nombreuses aberrations chromosomiques et sont souvent favorisées par des mutations germinales. Certaines patientes TN sont porteuses de mutations

germinales BRCA1 et présentent une expression réduite de la protéine. La relation TN / BRCA1 sera abordée en 5.5. D'autres mutations germinales sont associées au groupe TNBC. Couch et ses collaborateurs ont étudié certaines mutations germinales dans les cancers TNBC et ont constaté que 81% des mutations germinales surviennent dans des gènes impliqués dans la recombinaison homologue PALB2, RAD51C, RAD51D, BRIP1 et BARD1. Cette observation suggère qu'un défaut de recombinaison homologue pourrait être associé au développement des TNBC. Les mutations germinales RAD51C et RAD51D également associées à un risque élevé de développer un cancer de l'ovaire pourraient être associées à un risque de développer des cancers du sein de type triple négatif et/ou basal-like.

Les tumeurs TN sont très hétérogènes et sont souvent assimilées aux tumeurs basal-like même si toutes les tumeurs TNBC ne sont pas des BL. Il arrive que certains cancers triples négatifs n'expriment pas les marqueurs caractéristiques des cancers BL comme les CK5/6. Cependant, au niveau morphologique, ces tumeurs TN et les tumeurs BL partagent certaines caractéristiques comme la taille de la tumeur, l'infiltration lymphocytaire ainsi que la présence de nécrose.

Par ailleurs, les TNBC sont souvent des tumeurs très complexes avec une grande infiltration lymphocytaire. Le rôle du système immunitaire pourrait être crucial dans le développement de nouvelles cibles thérapeutiques pour les TNBC. En effet, certaines études ont démontrées un pronostic favorable des tumeurs TN présentant une importante infiltration lymphocytaire et des nouveaux agents thérapeutiques sont à l'étude afin de stimuler la réponse immunitaire anti-tumorale.

Le plus complexe dans ces tumeurs TN réside dans l'hétérogénéité intra-tumorale. En effet, une tumeur TN de grande taille est caractérisée par certaines zones nécrosées, d'autres zones riches en lymphocytes et d'autres riches en cellules épithéliales. Ces tumeurs se présentent comme une mosaïque cellulaire. Pour comprendre et définir cette hétérogénéité intra-tumorale il faudrait séquencer le génome de plusieurs cellules prélevées de différentes zones de la même tumeur.

(Foulkes et al. 2003)(Lakhani et al. 2005)(Metzger-Filho et al. 2012)(Couch et al. 2014)

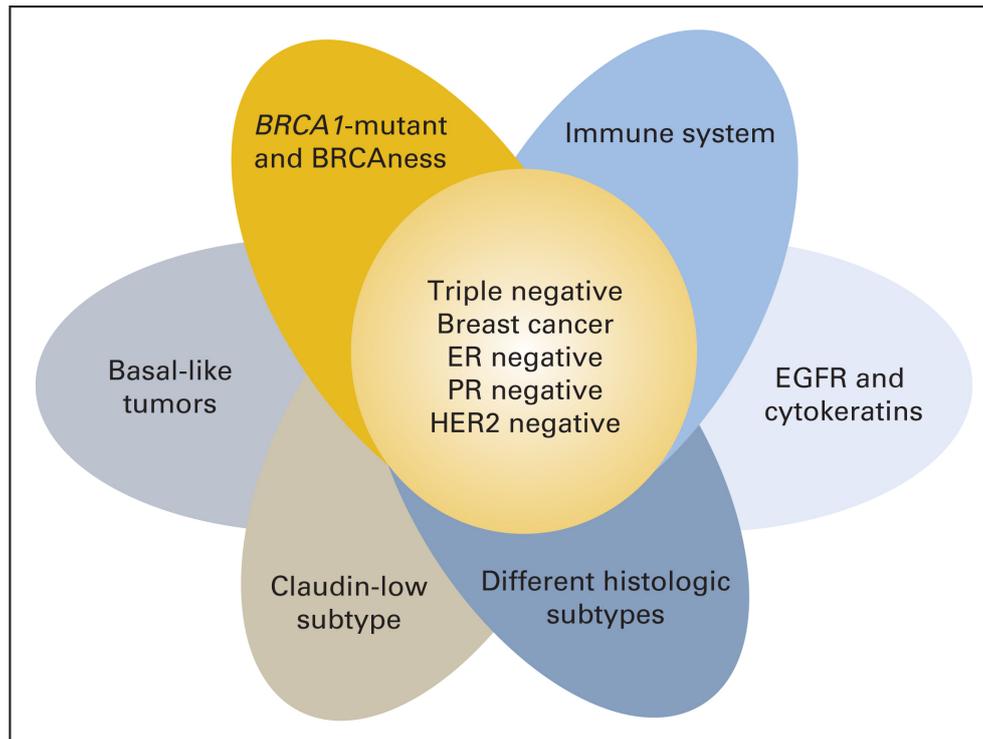


Figure 7 : Représentation schématique de l'hétérogénéité des tumeurs TNBC (Metzger-Filho et al. 2012)

5. Le gène BRCA1

5.1. Définition

BRCA1 est le premier gène de prédisposition génétique identifié dans le cancer du sein et de l'ovaire en 1994. Ce gène est localisé en sur le chromosome 17 (17q21.31) et code pour une phosphoprotéine impliquée dans plusieurs processus cellulaires. Plusieurs études ont montrés que des mutations germinales dans ce gène prédisposent les individus à des cancers du sein et de l'ovaire. En effet, les femmes porteuses de mutations germinales BRCA1 auraient un risque de 45% à 80% de développer un cancer du sein et un risque cumulé de 36% à 66% de l'ovaire à l'âge de 70 ans. La fréquence des mutations varie dans les populations et le type de mutation est parfois spécifique de l'origine ethnique des patientes. Dans la population Russe, les mutations BRCA1 surviennent dans 79% des cancers du sein et de l'ovaire familiaux. Chez les juives Ashkénazes, les mutations BRCA1 les plus fréquentes, 185delAG et 5382insC, surviennent dans 47% des cancers familiaux. En Belgique, la fréquence des mutations BRCA1 est inférieure à 5%.

BRCA1 est composé de 24 exons dont 2 non codants (E1 et E4). L'exon 11 est le plus grand exon et est souvent site de mutations essentiellement germinales. L'ARN messenger de 7224 pb est traduit en une protéine multifonctionnelle. Cette protéine contient plusieurs domaines qui permettent la liaison avec d'autres protéines pour former un complexe protéique appelé BASC (BRCA1 associated genome surveillance complex) responsable du maintien de la stabilité génomique dans la cellule. Les épissages alternatifs de l'ARNm ont été décrits dans la littérature et suggèrent l'existence potentielle de plusieurs isoformes.

(Miki et al. 1994) (Hall et al. 1990) (Orban & Olah 2003) (Satagopan et al. 2001)(Clark et al. 2012)(Szabo & King 1997) (Cecener et al. 2014)

5.2. Structure de la protéine BRCA1

La protéine BRCA1 est composée de 1863 acides aminés et de poids moléculaire avoisinant les 2200Da. Sa structure primaire est composée de plusieurs domaines. Chaque domaine permet la liaison à un partenaire déterminé pour intervenir dans un processus cellulaire défini (Figure 8).

La localisation de cette protéine est essentiellement nucléaire mais certaines études ont démontré par immunohistochimie la localisation cytoplasmique de BRCA1 dans les cas de cancer du sein. Et de ce fait, les séquences NLS (Nuclear Localization Sequence) situées au niveau du plus grand exon, l'exon 11, permettraient le retour de la protéine dans le noyau.

Le domaine N-terminal est un domaine catalytique impliqué dans l'ubiquitination et l'interaction protéine-protéine. Ce domaine contient un domaine dit « RING » qui est un domaine en motifs Zn-finger, riche en répétitions Cys3-His-Cys4. Ces répétitions permettent la liaison d'autres protéines dont la protéine BARD1 via son domaine RING aboutissant à la formation de l'hétérodimère BRCA1/BARD1. De plus, ce domaine contient deux motifs NES (Nuclear Export Sequence).

Le domaine C-terminal contient essentiellement deux domaines BRCT conservés (BRCA1 C-Terminal Domain), ces domaines sont communs à plusieurs protéines impliquées dans la réparation d'ADN. Les domaines BRCT reconnaissent des motifs phosphorylés permettant ainsi la liaison de la protéine BRCA1 avec des protéines phosphorylées telles que p53 et Abraxas.

(Clark et al. 2012)(Savage & Harkin 2014)

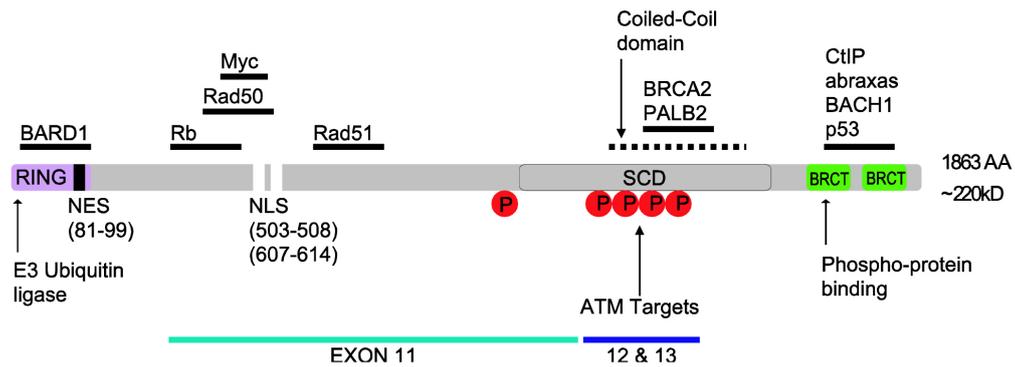


Figure 8 : Structure primaire de la protéine BRCA1 (Clark et al. 2012)

5.3. Fonctions de la protéine BRCA1

La protéine BRCA1 est impliquée dans plusieurs processus cellulaires : réparation des cassures double-brin de l'ADN, contrôle du cycle cellulaire, ubiquitination, apoptose, régulation de la transcription, remodelage de la chromatine, et serait aussi impliquée dans l'inactivation du chromosome X (Figure 9)

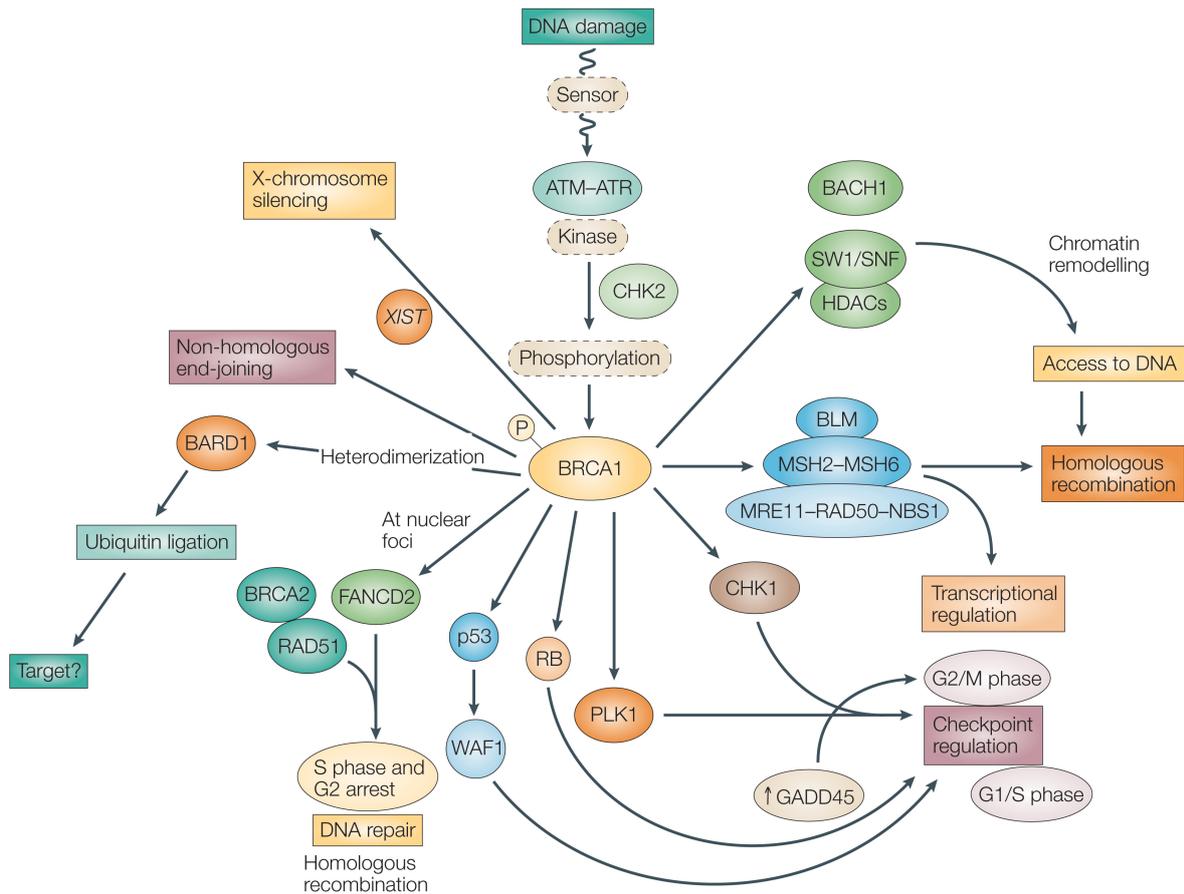


Figure 9 : Fonctions de la protéine BRCA1 (Narod & Foulkes 2004)

5.3.1. Réparation de l'ADN et contrôle du cycle cellulaire

L'absence de réparation des cassures double brin conduit à une augmentation de l'instabilité génomique, des translocations, des délétions de petites ou grandes régions chromosomiques ainsi que des pertes d'hétérozygotie et donc au développement de cancers. BRCA1 est un suppresseur de tumeurs grâce à sa principale fonction « la réparation d'ADN ».

BRCA1 joue un rôle crucial dans la réparation d'ADN et le contrôle du cycle cellulaire. Cette fonction est la fonction la plus connue et la plus étudiée de la protéine BRCA1. En s'associant avec différents partenaires, elle intervient dans la réparation d'ADN via 2 mécanismes : la recombinaison homologue (HR) ou la recombinaison non-homologue NHEJ (Non-Homologous End Joining), un autre type de réparation de l'ADN.

NHEJ : ce mécanisme est initié via la liaison de l'hétéro-dimère protéique Ku70/80 aux extrémités des cassures doubles brin (figure10). Cette liaison entraîne un recrutement d'autres

protéines via l'activation d'Artemis, une nucléase ATM- MRN dépendante pour les cassures complexes. Le rôle exact de la protéine BRCA1 dans ce processus n'est pas bien déterminé. La localisation de BRCA1 dans les sites des cassures doubles brin suggère un rôle de BRCA1 dans le processus NHEJ. NHEJ est un mécanisme dit « error prone » qui répare les lésions tout au long du cycle cellulaire ce qui en fait un mécanisme de réparation prédominant. Selon l'étude de Wei et ses collaborateurs dans des lignées cellulaires, BRCA1 interagit avec Ku80 via son domaine N-terminal lors de l'initiation du processus NHEJ. En effet, les expériences de co-immunoprécipitation avant et après irradiation des cellules résultent en la précipitation des deux protéines. Cependant, l'étude ne détecte pas une interaction directe entre BRCA1 et Ku80. Ce résultat suggère que l'interaction BRCA1/Ku80 nécessite la présence d'autres facteurs ou des changements de conformation des protéines et cette interaction intervient pendant les phases précoces du processus NHEJ. En effet, Jiang et ses collaborateurs ont démontré que l'interaction BRCA1/ku80 intervenait lors de la phase G1 du cycle cellulaire pour une réparation fidèle des cassures doubles brin.

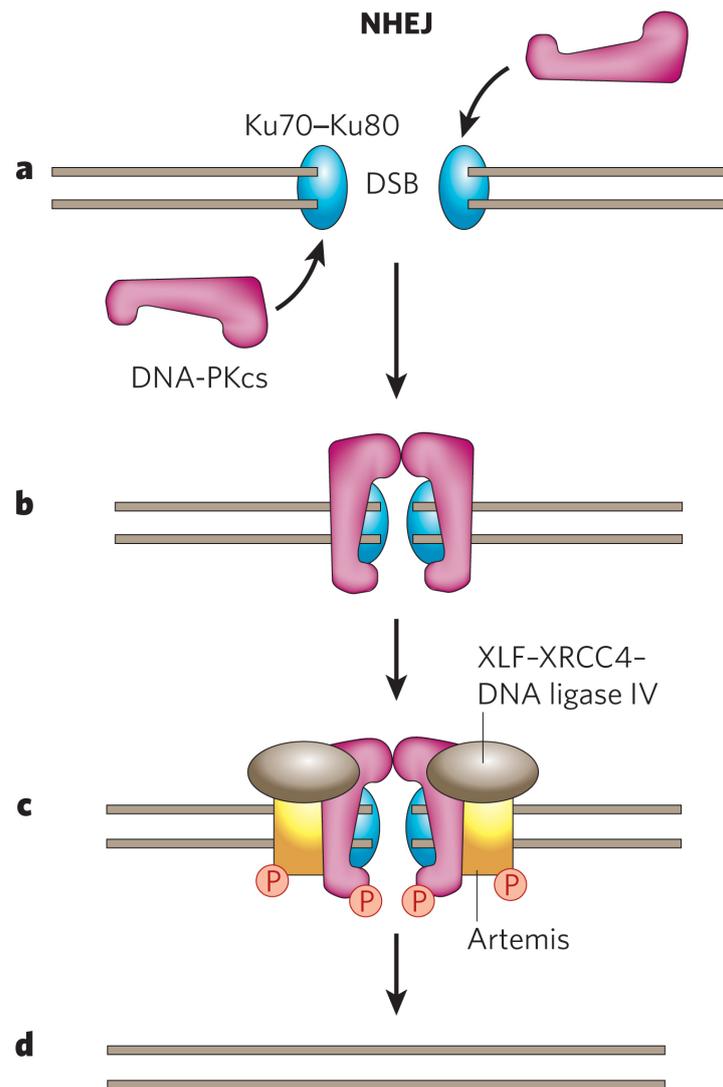


Figure 10 : Réparation des cassures doubles brin par la recombinaison non-homologue (NHEJ) (Downs et al. 2007)

HR : la recombinaison homologue utilise la chromatide sœur intacte pour restaurer l'information perdue. Ce mécanisme de réparation intervient essentiellement pendant les phases S et G2 du cycle cellulaire car il requière la chromatide sœur pour la réparation des cassures double-brin. BRCA1 participe à la formation de 4 complexes illustrés dans la Figure 11 :

1/le complexe BRCA1_C : avec le complexe MRN (Mre11, Nbs1, Rad50) et CtIP interagit dans le processus « end resection » des cassures double-brin. Dans ce complexe, BRCA1 joue

un rôle dans le repositionnement de la protéine 53BP1 et la génération de simple brin associé à la protéine RPA. Le complexe BRCA1-C active la voie de signalisation ATR/CHK1 pour arrêter le cycle cellulaire en phase S et éviter la réplication de l'ADN endommagé.

2/ le complexe BRCA1_A : formé de 3 protéines en plus de BRCA1 et Abraxas. Ce complexe induit l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M en maintenant la signalisation en réponse aux dommages à l'ADN à partir des sites de cassure.

3/ le complexe BRCA1_B : composé de BRCA1, BRIP1, et TopBP1, ce complexe joue un rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase S via l'activation de la voie de signalisation ATR et un rôle dans la recombinaison homologe probablement via l'activité DNA hélicase de BRIP1 dans le processus « end resection ».

4/ le complexe BRCA1_D : contient BRCA1/BRCA2/PALB2/RAD51. Ce complexe échange les protéines RPA contre RAD51 pour faciliter l'accessibilité à la chromatide sœur pour la restauration de l'information génétique.

La présence de la protéine BRCA1 dans plusieurs complexes impliqués dans la réparation des cassures doubles brin suggère son importance dans le recrutement d'autres protéines pour la recombinaison homologue qui assure le maintien de la stabilité génomique de la cellule.

(Wei et al. 2008)(Henderson 2012)(Savage & Harkin 2014) (Wei et al. 2008)(Jiang et al. 2013)

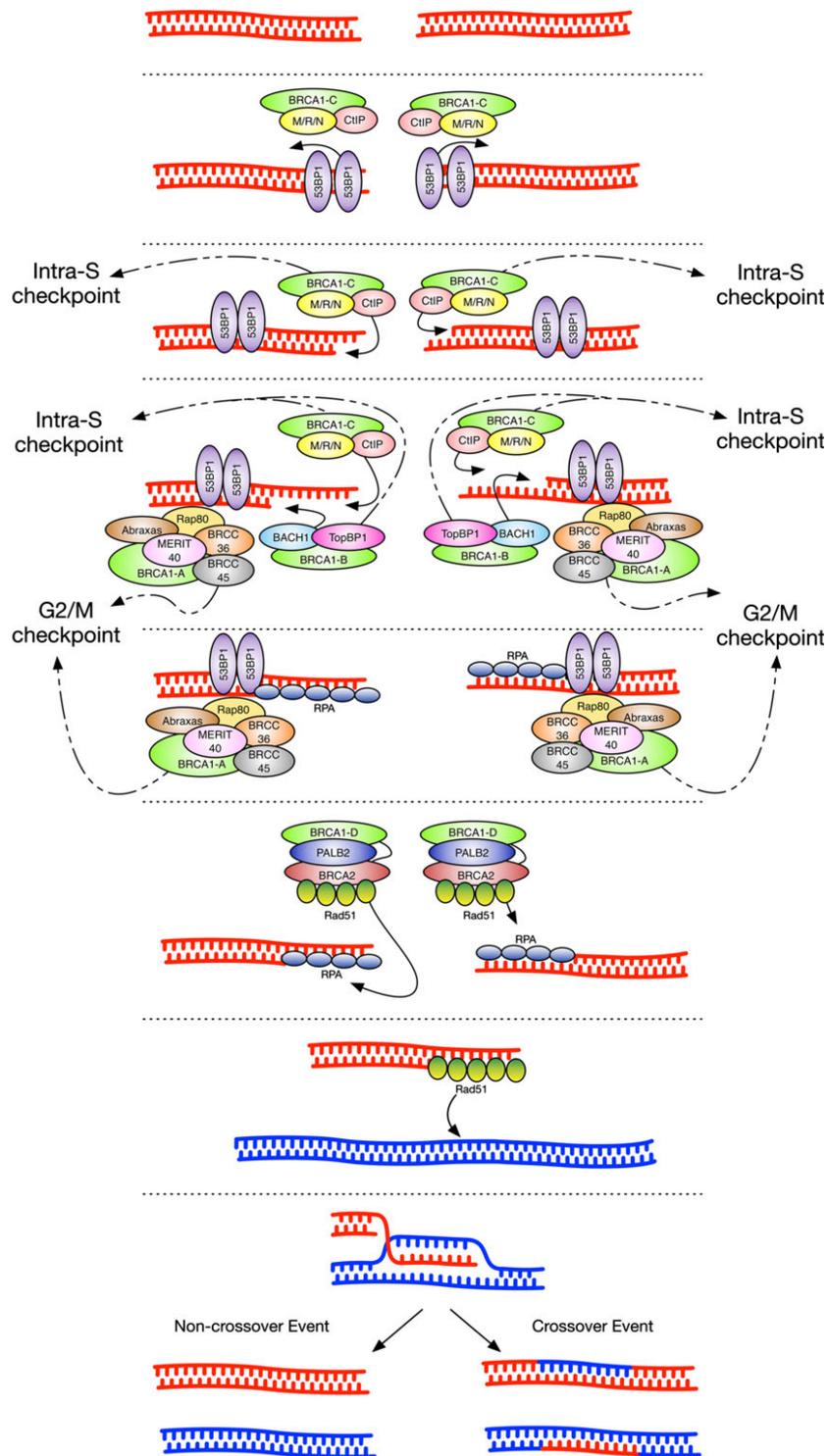


Figure 11 : Rôle de BRCA1 dans la recombinaison homologue et le contrôle du cycle cellulaire. (Savage & Harkin 2014)

5.3.2. Autres fonctions de BRCA1

Duplication du centrosome :

BRCA1 est impliquée dans d'autres processus cellulaires tels que la régulation de la duplication du centrosome lors de la mitose. La duplication des centrosomes est coordonnée avec le cycle cellulaire et n'arrive qu'une fois pendant le cycle cellulaire pour permettre la ségrégation égale des chromosomes lors de la mitose. La dérégulation de cette duplication induit des anomalies malignes dont des tumeurs. La protéine BRCA1 joue un rôle dans le contrôle de la duplication des centrosomes et a été décrite comme interagissant physiquement avec le centrosome. En effet, 30% des cellules avec une délétion de l'exon 11 de BRCA1 possèderaient plusieurs centrosomes. Ceci résulte en une aneuploïdie, c'est à dire un nombre anormal de chromosomes.

Régulation de la transcription :

Parallèlement, BRCA1 est impliquée dans régulation de la transcription via son domaine BRCT qui lui permet de se lier à d'autres facteurs de transcription dont p53. D'autre part, ce même domaine interagit avec l'enzyme RNA POL II comme activateur de la transcription.

Ubiquitine ligase :

D'autre part, son domaine RING Zn Finger, lui permet d'interagir avec plusieurs protéines dont BARD1 formant un hétérodimère. Les études *in vitro* ont démontré une activité E3 ubiquitine ligase de cet hétérodimère. Une autre étude a montré que l'hétérodimère BRCA1/BARD1 ubiquitine spécifiquement l'histone H2A *in vivo* et *in vitro* au niveau des résidus lysine K127 et K129 dans le nucléosome, ce qui suggère que le domaine RING de cet hétérodimère permet de discriminer le nucléosome-H2A de l'histone H2A libre.

Polyadénylation de l'ARNm :

Par ailleurs, une autre étude a montré une interaction du complexe BRCA1/BARD1 avec un facteur de polyadénylation dans les cellules Hela. Ce facteur se fixe sur l'extrémité 3' de l'ARN synthétisé pour créer un site de polyadénylation. La surexpression de BARD1 inhibe ce mécanisme et l'addition d'anticorps anti-BARD1 rétablit la polyadénylation. BRCA1

connu pour sa localisation au site de dommage à l'ADN, BARD1 est aussi localisée au niveau des mêmes sites pendant la phase S du cycle cellulaire. L'inhibition de la polyadényation pourrait avoir un effet protecteur et prévenir une mauvaise maturation de l'ARN transcrit au site de dommage.

(Kalb et al. 2014)(Deng & Brodie 2000)

5.4. Mécanismes de perte de l'expression de BRCA1 dans les cancers du sein

Les mécanismes qui régulent l'expression des gènes peuvent survenir à différents niveaux, autrement dit, la régulation de l'expression peut être transcriptionnelle et/ou post-transcriptionnelle.

L'expression de BRCA1 peut être régulée par plusieurs mécanismes.

5.4.1. La Méthylation du promoteur

La méthylation de l'ADN est un mécanisme de régulation épigénétique au niveau transcriptionnel et consiste en l'addition d'un résidu méthyl « CH₃ » sur le carbone 5 des bases cytosines (C) particulièrement dans les îlots CpG. Cette réaction est assurée par les enzymes « DNA méthyl transférases ». La méthylation peut être transmise lors de la mitose et c'est **une méthylation de maintien** comme elle peut être acquise et c'est **une méthylation *de novo***.

La méthylation des cytosines entraîne une modification de l'architecture de la chromatine aboutissant à une compaction des nucléosomes, empêchant ainsi l'accès des facteurs de transcriptions ou des protéines de liaison à l'ADN.

Les cancers sont en général caractérisés par une hypométhylation globale et une hyperméthylation des gènes suppresseurs de tumeur dont BRCA1. Le statut de méthylation BRCA1 pourrait constituer un bon marqueur prédictif dans les cancers du sein comme c'est le cas de la méthylation du promoteur MGMT dans le glioblastome. Le promoteur MGMT est souvent méthylé dans les cas de glioblastome. La méthylation du promoteur MGMT est utilisée comme facteur prédictif en clinique et est associée à une probabilité accrue de réponse à la témozolomide.

D'autre part, la méthylation du promoteur BRCA1 est très étudiée et particulièrement dans les cancers du sein. La méthylation du promoteur BRCA1 pourrait constituer un marqueur pronostique puisque des études ont montré que le statut de méthylation du promoteur BRCA1

dans les globules blancs (sang périphérique) reflèterai le statut de méthylation dans la tumeur. De plus, l'expression de l'ARNm et de la protéine BRCA1 est réduite quand le promoteur BRCA1 est méthylé.

(Rice et al. 1998) (Hegi et al. 2008)

(Boukerroucha et al. 2015)(Iwamoto et al. 2011) (Esteller 2008)(Bosviel et al. 2012)

5.4.2. Interaction avec les microARN

Les microARN sont abordés plus en détail au point 6 de cette introduction.

Les micro-ARN sont de petites molécules d'ARN modulateurs de l'expression génique. Ces molécules régulent l'expression de BRCA1 en interagissant avec son extrémité 3' non traduite (3'UTR) comme par exemple le miR-146a, miR-205. Parallèlement BRCA1 peut réguler l'expression de certains miR (miR155, miR29). En effet, BRCA1 régule la biosynthèse des micro ARN via un son interaction avec Droscha. (Chang & Sharan 2012)(Kawai & Amano 2012)

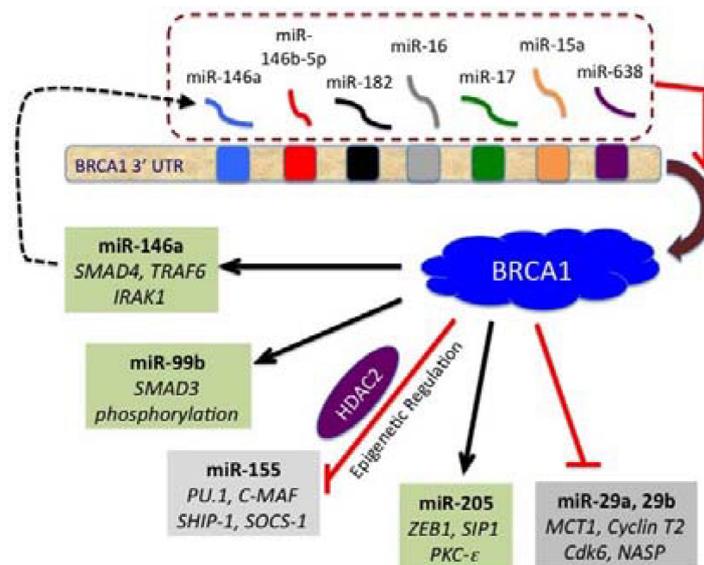


Figure 12 : Exemples d'interactions de BRCA1 avec des microARN (Chang & Sharan 2012)

Une perturbation de l'équilibre BRCA1-miR peut conduire au développement tumoral. En effet, l'expression réduite de BRCA1 peut induire une augmentation de certains miRs caractérisés comme oncogéniques. Par ailleurs, le changement du niveau d'expression de

certain miRs peut affecter le niveau d'expression de BRCA1 et aboutir à une instabilité génomique.

5.4.3. Les Mutations

La mutation est définie comme étant une modification de l'information génétique.

Les mutations germinales sont des mutations qui surviennent dans les cellules germinales. Ces mutations sont transmises et donc héréditaires. Selon la théorie de Knudson, pour les gènes suppresseurs de tumeurs, le premier 'hit' est constitué par une mutation germinale qui inactive un seul allèle. Le deuxième 'hit' inactive le deuxième allèle aboutissant à une perte de fonction. Cette inactivation peut survenir suite à une délétion, perte chromosomique ou une conversion génique.

Plusieurs mutations germinales dans le gène BRCA1 ont été caractérisées et répertoriées. Ces mutations sont responsables du développement des cancers familiaux. Les mutations BRCA1 dans les cancers du sein seront abordées plus loin dans cette introduction.

Les tumeurs du sein déficientes en BRCA1 suivent l'hypothèse de Knudson. Le premier 'hit' résulte en une mutation germinale alors que le deuxième 'hit' résulte en une perte d'hétérozygotie (LOH), ou la perte du deuxième allèle par délétion.

Les mutations somatiques BRCA1 sont rares et très peu décrites dans la littérature dans les cancers du sein. Les mutations somatiques BRCA représentent environ 1/3 des mutations BRCA dans le cancer de l'ovaire.

(Knudson 1971) (Curtit et al. 2015)(B. T. J. Hennessy et al. 2010)

5.5. BRCA1 dans les cancers du sein triples négatifs

BRCA1 semble particulièrement associée aux TNBC et pourrait jouer un rôle étiologique. En effet, des mutations germinales dans BRCA1 augmenteraient le risque de développer des cancers du sein dont 70% à 80% sont de type triple négatif. Ces derniers présentent un taux important de réarrangements chromosomiques dus en partie à l'absence de l'activité de BRCA1 dans la réparation de l'ADN.

D'autre part, les TNBC sporadiques présentent un profil d'expression génique semblable à celui des cancers du sein de patientes mutées BRCA1. Ces cancers présentent une expression réduite de la protéine BRCA1 et sont caractérisés comme « BRCA-ness ». Cette diminution ou perte d'expression de BRCA1 peut être due à des mutations somatiques mais le plus souvent due à des délétions dues à l'instabilité génique, à une régulation négative de la

transcription par les microARNs et /ou une régulation épigénétique par méthylation. En effet, l'expression de BRCA1 est réduite suite à la méthylation du promoteur BRCA1 dans environ 15% des TNBC sporadiques. La méthylation du promoteur et les mutations germinales étaient souvent décrits comme évènement « mutuellement exclusifs ». Cependant, des cas ont été rapportés dans la littérature observant les deux évènements chez la même patiente.

(Foulkes et al. 2003)(Lakhani et al. 2005)(Lips et al. 2013)(Boukerroucha et al. 2015)

5.6 BRCA1 et la réponse aux traitements

L'absence d'activité de BRCA1 dans les cancers du sein est dite « BRCA-ness ». Les tumeurs sporadiques BRCA-ness partagent les mêmes caractéristiques clinicopathologiques que les tumeurs porteuses d'une mutation germinale BRCA. Cette BRCA-ness se traduit par un taux élevé de réarrangements chromosomiques et une instabilité génétique dus à l'absence de fonction BRCA dans la réparation de l'ADN. Ces tumeurs présentent un profil CGH particulier.

En effet, Vollebergh et ses collaborateurs ont développé une classification qui permet de différencier les tumeurs présentant une mutation germinale BRCA1 des tumeurs BRCA1-like en se basant sur les profils CGH des tumeurs. Cette classification basée sur les profils CGH permet de détecter les tumeurs avec perte de fonction BRCA1 et qui pourraient bénéficier de certains agents thérapeutiques dérivés de platine.

Stefansson et ses collaborateurs ont montré que les cellules de cancers du sein et de l'ovaire avec l'inactivation de BRCA1 par méthylation répondent mieux aux cisplatine et carboplatine.

En effet, les cancers BRCA-ness sont sensibles à certaines chimiothérapies comme les traitements dérivés du platine. Ces tumeurs répondent favorablement au traitement cisplatine ou carboplatine, agents dits « intercalants », qui induisent des cassures d'ADN sur les deux brins. En absence de réparation des cassures double brin par BRCA1 la cellule tumorale progresse vers l'apoptose et donc une mort cellulaire.

Par ailleurs, Xu et ses collaborateurs ont réalisé une étude sur 167 patientes atteintes de cancers du sein TN et qui ont reçu une chimiothérapie néoadjuvante. Dans cette étude, les patientes présentant une inactivation de l'expression de BRCA1 par méthylation avaient une survie supérieure à celle des patientes exprimant BRCA1.

Un autre type de traitement potentiel chez les patientes présentant une BRCA-ness sont les inhibiteurs de la PARP. Les PARP (PolyADP Ribose Polymérase) sont une famille d'enzymes activées suite aux cassures d'ADN simple brin. Ces enzymes catalysent la poly ADP-riboseylation des protéines qui se lient à l'ADN. La fonction de PARP-1 nécessite du NAD⁺. Ces enzymes jouent un rôle essentiel dans le maintien de la stabilité génique et la réparation d'ADN.

En inhibant ces enzymes avec les inhibiteurs PARPi, la cassure simple brin se transforme en cassure double brin. Ce type de cassure est réparé par recombinaison homologue. En effet dans les cellules tumorales, en absence de BRCA1 et en utilisant les PARPi, une mort cellulaire est induite. Cette mort cellulaire est dite « létalité synthétique ». La létalité synthétique entre deux gènes survient quand la cellule reste viable avec la perte d'un des deux gènes mais la perte simultanée des deux gènes résulte en une mort cellulaire.

Dans le cas des deux gènes BRCA1-PARP, la létalité synthétique résulte de l'absence de recombinaison homologue et de l'absence des PARPs. Effectivement, dans les tumeurs déficientes en mécanismes de réparation de l'ADN ou BRCA-ness, les inhibiteurs de la PARP induisent une létalité synthétique suite à l'accumulation de plusieurs lésions dans l'ADN.

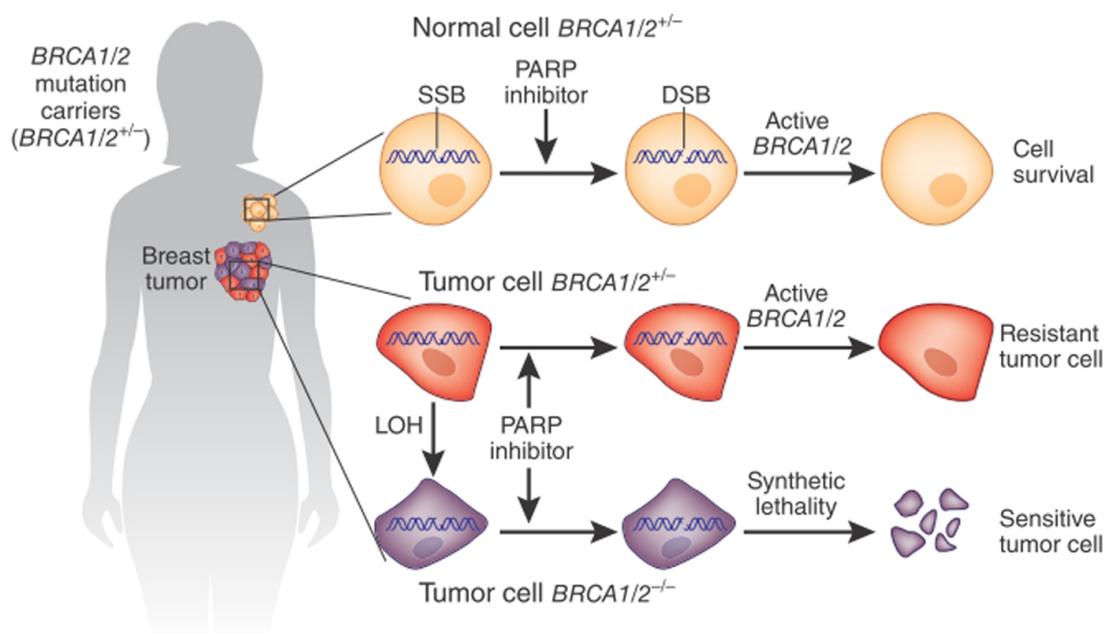


Figure 13 : Réponse aux inhibiteurs de la PARP chez les patientes BRCA1^{-/-} (Polyak & Garber 2011)

Une étude clinique en phase II a montré l'efficacité des inhibiteurs de la PARP chez les patientes mutées BRCA1. Des études cliniques de phase III sont en cours chez les patientes TNBC.

(Tutt et al. 2010) (Drew et al. 2011) (Vollebergh et al. 2011) (Xu et al. 2013) (Stefansson et al. 2012) (Helleday 2011)

6. Micro-ARN

6.1. Définitions

Les micro-ARN (miR) sont des petites molécules d'ARN non-codants d'environ 20- 24 nucléotides. Ce sont des modulateurs de l'expression génique. Les miRs régulent l'expression des gènes en se fixant l'extrémité 3' non traduite (3'UTR) de l'ARN messager. Ces petites molécules d'ARN jouent un rôle dans plusieurs processus cellulaires comme la prolifération ou la différenciation. Selon la base de données miRbase, chez l'homme, 1881 miR (miRbase 21) sont connus et régulent environ 60% des gènes. De nombreux miR ont une expression perturbée dans les cancers ou bien ils peuvent être mutés ou méthylés. (Veeck & Esteller 2010).

6.2. Biogenèse

Les gènes des miR sont transcrits par l'ADN polymérase-II ou III en un pri-miR (transcrit primaire). Ce pri-miR contient une structure en épingle à cheveux, une queue polyA en 3' et une coiffe en 5'. Le transcrit primaire est maturé par l'enzyme ribonucléase (RNase) III Drosha et son cofacteur Pasha en un précurseur dit « pré-miR » d'environ 70 nucléotides qui contient uniquement la structure en épingle à cheveux. Ce pré-miR est exporté par l'exportine 5et RNA-GTP vers le cytoplasme. Dans le cytoplasme, une autre enzyme RNase_III « Dicer » intervient pour générer une molécule d'ARN double brin de 22 à 24 nucléotides, dite « Duplex miR ». Enfin, la maturation du miR est réalisée par le complexe RISC qui va générer une molécule miR simple brin. Dans 70% des cas , ce miR mature agit sur l'ARNm cible via son extrémité 3'UTR conduisant à sa dégradation quand la complémentarité est complète ou à l'inhibition de la traduction et la déstabilisation de l'ARNm quand la complémentarité est partielle.(Esquela-Kerscher & Slack 2006)

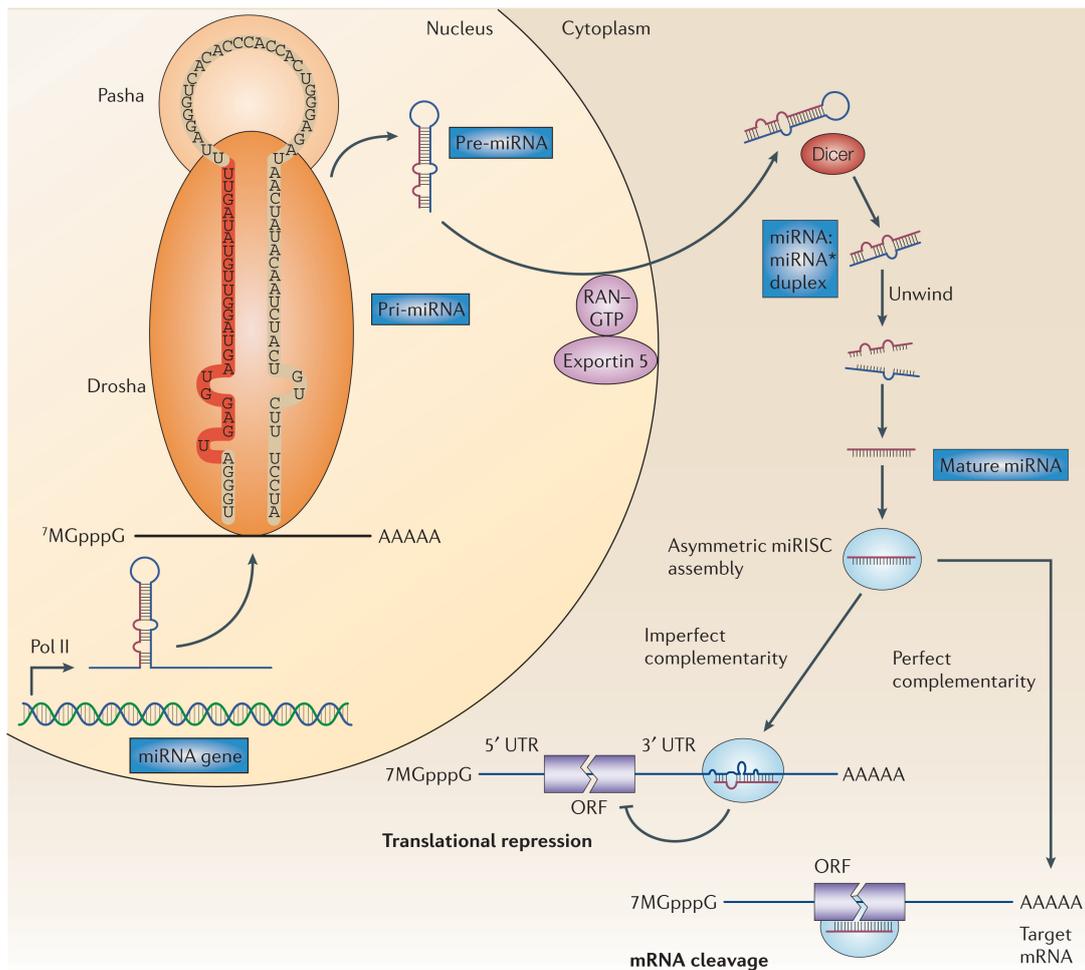


Figure 14 : Résumé de la biogénèse des micro-ARN et mécanismes d'interaction avec l'ARNm cible. (Esquela-Kerscher & Slack 2006)

6.3. Mécanismes d'actions des micro-ARNs

6.3.1 Dégradation de l'ARNm cible

Chez les plantes, la complémentarité entre la séquence du miR et la séquence cible est complète. La dégradation de l'ARNm cible par le miR est assurée par une activité endonucléase de la protéine Argonaute du complexe RISC. Les protéines Argonaute sont composées de plusieurs domaines : domaine PAZ qui permet la liaison du miR, et le domaine PIWI avec une activité catalytique RNaseH endonucléase.

Chez l'homme, la complémentarité n'est jamais parfaite. La dégradation de l'ARNm cible est donc indirecte. C'est la protéine AGO2 qui est impliquée dans la dégradation de l'ARNm par

le miR via son activité endonucléasique. Cette dégradation indirecte peut impliquer une déanylation suivie d'un décoiffage de l'ARNm cible.

(Valencia-Sanchez et al. 2006) (Carthew & Sontheimer 2009)

6.3.2 Inhibition de la traduction

L'inhibition de la traduction de l'ARNm cible peut intervenir à différentes phases de la traduction (Figure14).

D'une part, l'inhibition de la traduction est réalisée par le complexe RISC lors de l'initiation de la traduction suite à une compétition avec la machinerie de traduction. Cette compétition bloque le facteur EIF4E qui se lie à la coiffe empêchant ainsi l'initiation de la traduction. D'autre part, l'inhibition peut avoir lieu à d'autres phases de la traduction en empêchant le recrutement des sous-unités ribosomales ou en séquestrant l'ARNm cible dans un complexe inaccessible aux ribosomes (Figure14)

(Valencia-Sanchez et al. 2006)(Carthew & Sontheimer 2009)

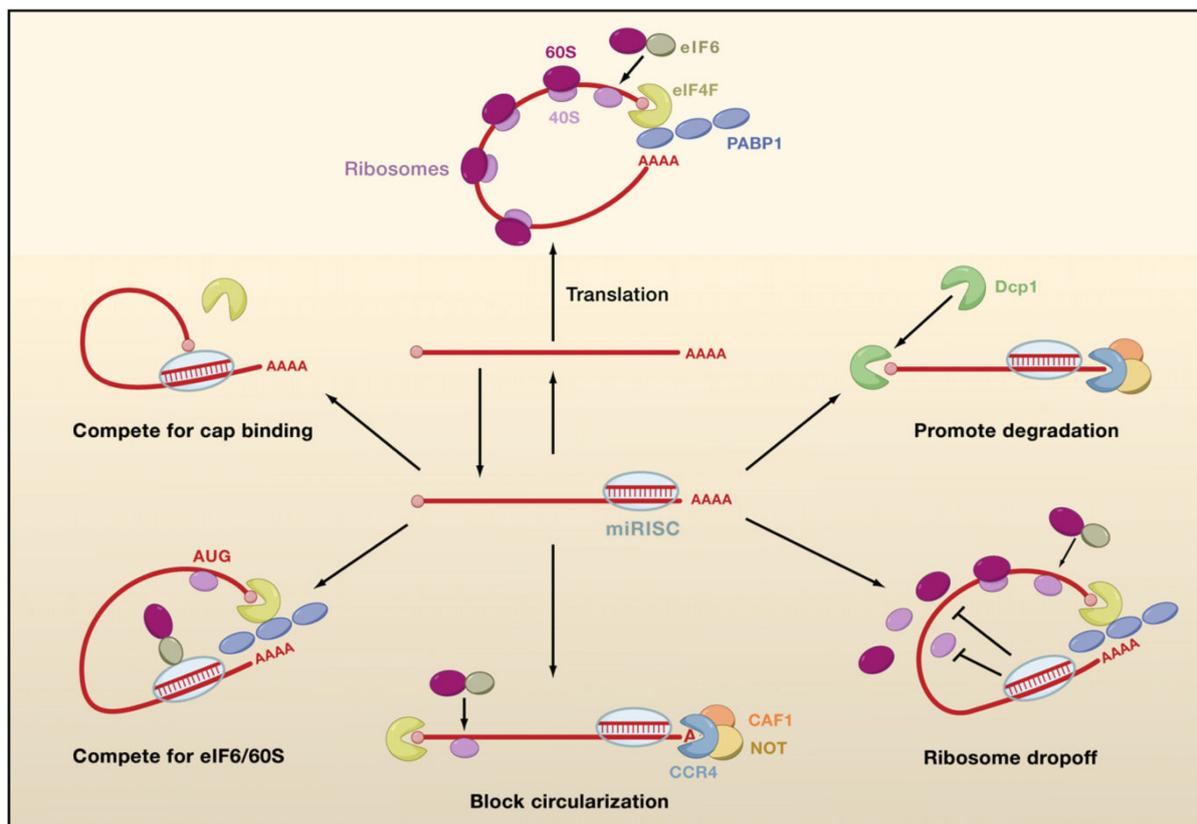


Figure 15 : Mécanismes d'inhibition de la traduction par les micro-ARN

(Carthew & Sontheimer 2009)

6.4 Les micro-ARN dans les cancers du sein

Plusieurs miRs sont connus et identifiés dans plusieurs pathologies notamment les cancers. Leur expression est dérégulée dans les cancers, elle peut être anormalement élevée ou au contraire réduite (tableau 5).

miR	Expression	Pathway /rôle
miR-210	+	Hypoxie
miR-155	+	Prolifération
miR-21	+	Métastases, apoptose, invasion
miR-31	-	Métastases
miR-125	-	Prolifération, apoptose, invasion
miR-205	-	Prolifération, invasion
miR -96a	+	Prolifération apoptose

Tableau 5 : Exemples de miR dont l'expression est dérégulée dans les cancers du sein. Adapté de (Andorfer et al. 2011).

Dans la littérature, plusieurs études sur l'expression des miRs dans les cancers du sein ont été rapportées :

Relation des miRs avec la classification

L'expression des miRs peut être associée à un certain type de cancer et pourrait permettre d'établir une classification.

Lu et ses collaborateurs ont étudié l'expression des miRs dans différents cancers humains et ont constaté une sous-expression des miRs étudiés dans les cancers comparés aux tissus sains. Cette différence d'expression est associée aux caractéristiques clinicopathologiques de la tumeur.

D'autre part, Enerly et ses collaborateurs ont analysé des données de profils d'expression de 799 miRs dans 101 cancers du sein. Ils ont constaté une différence d'expression de certains miRs en fonction du sous-type moléculaire de cancer du sein.

(Enerly et al. 2011) (Lu et al. 2005)

Les miRs comme facteurs pronostiques et/ou prédictifs

Plusieurs études ont montré une association entre l'expression de miRs et la progression de la maladie.

A titre d'exemple, le miR-210 est associé à la prolifération tumorale, l'envahissement des ganglions et à un mauvais pronostic dans les cancers du sein.

Shen et ses collaborateurs ont réalisé une étude rétrospective avec des cancers du sein triple négatifs dans le but d'établir un modèle pronostique. Leurs résultats montrent le miR-27b-3p comme facteur pronostique dans les cancers TNBC.

(Shen et al. 2014) (Rothé et al. 2011)(Buffa et al. 2011) (Volinia et al. 2012)

Les miRs comme biomarqueurs

Les micro-ARNs sont exprimés dans les tumeurs mais aussi dans plusieurs fluides comme l'urine, la salive et le plasma, on parle alors de « microARNs circulants ». Le potentiel de ces microARNs dans les cancers du sein réside dans la possibilité de les isoler via le plasma ce qui en fait des biomarqueurs intéressants. De ce fait, l'analyse de l'expression des miRs circulants peut permettre de suivre l'évolution de la maladie. (Frères et al. 2014)

Les miRs circulants comme cibles thérapeutiques

Les miRs sont de potentiels biomarqueurs mais peuvent aussi constituer des nouvelles cibles thérapeutiques comme décrit par Bertoli et ses collaborateurs.

Par ailleurs, Bovy et ses collaborateurs ont démontré le potentiel du miR-503-5p dans les lignées cellulaires. Ce miR sur-exprimé dans cellules endothéliales, peut être secrété dans des exosomes et transféré vers les cellules de cancers du sein. Ce miR inhibe la croissance tumorale en ciblant CCND2 et CCND3. De plus, la chimiothérapie néoadjuvante augmente de niveau plasmatique du miR-503-3p. Ce microARN peut être impliqué dans l'effet anti-tumoral de la chimiothérapie dans les cancers du sein.

Les microARNs circulants constituent aujourd'hui une voie d'avenir pour la recherche scientifique et translationnelle dans les cancers du sein. En effet, plusieurs miRs sont identifiés mais leurs cibles potentielles restent inconnues. Des études sur les cibles des microARNs intéressants pourraient aboutir à de nouvelles cibles thérapeutiques dans les cancers du sein et particulièrement les cancers triples négatifs.

(Heneghan et al. 2010) (Bovy et al. 2015) (Bertoli et al. 2015)

7. Références bibliographiques

- Andorfer, C. a. et al., 2011. MicroRNA signatures: Clinical biomarkers for the diagnosis and treatment of breast cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 17, pp.313–319.
- Bertoli, G., Cava, C. & Castiglioni, I., 2015. MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer. *Theranostics*, 5(10), pp.1122–1143.
- Bosviel, R. et al., 2012. BRCA1 promoter methylation in peripheral blood DNA was identified in sporadic breast cancer and controls. *Cancer Epidemiology*, 36, pp.1–6.
- Boukerroucha, M. et al., 2015. BRCA1 germline mutation and glioblastoma development: report of cases. *BMC Cancer*, 15(181).
- Bovy, N. et al., 2015. Endothelial exosomes contribute to the antitumor response during breast cancer neoadjuvant chemotherapy via microRNA transfer. *Oncotarget*, 6(12), pp.10253–66.
- Buffa, F.M. et al., 2011. microRNA-associated progression pathways and potential therapeutic targets identified by integrated mRNA and microRNA expression profiling in breast cancer. *Cancer Research*, 71, pp.5635–5645.
- Campbell, 2012. Evolution of the cancer genome. *Trends in Genetics*, 28(11), pp.155–163.
- Carthew, R.W. & Sontheimer, E.J., 2009. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4), pp.642–55.
- Cecener, G. et al., 2014. BRCA1/2 Germline Mutations and Their Clinical Importance in Turkish Breast Cancer Patients. *Cancer investigation*, (April), pp.1–13.
- Chang, S. & Sharan, S.K., 2012. BRCA1 and MicroRNAs: Emerging networks and potential therapeutic targets. *Molecules and Cells*, 34(5), pp.425–432.
- Clark, S.L. et al., 2012. Structure-Function Of The Tumor Suppressor BRCA1. *Computational and structural biotechnology journal*, 1(1).
- Collignon, J. et al., 2011. [Molecular and genetic aspects of triple negative breast cancer and therapeutic implications]. *Revue médicale de Liège*, 66(5-6), pp.393–6.
- Couch, F.J. et al., 2014. Inherited Mutations in 17 Breast Cancer Susceptibility Genes Among a Large Triple-Negative Breast Cancer Cohort Unselected for Family History of Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 33(4), pp.304–311.
- Curtit, E. et al., 2015. First description of a sporadic breast cancer in a woman with BRCA1 germline mutation. *Oncotarget*.

- Deng, C.X. & Brodie, S.G., 2000. Roles of BRCA1 and its interacting proteins. *BioEssays*, 22, pp.728–737.
- Dent, R. et al., 2007. Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence. *Clinical Cancer Research*, 13(15), pp.4429–4434.
- Downs, J.A., Nussenzweig, M.C. & Nussenzweig, A., 2007. Chromatin dynamics and the preservation of genetic information. *Nature*, 447(7147), pp.951–958.
- Drew, Y. et al., 2011. Therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor AG014699 in human cancers with mutated or methylated BRCA1 or BRCA2. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(4), pp.334–346.
- Dumalaon-Canaria, J.A. et al., 2014. What causes breast cancer? A systematic review of causal attributions among breast cancer survivors and how these compare to expert-endorsed risk factors. *Cancer Causes and Control*, 25(7), pp.771–785.
- Enerly, E. et al., 2011. miRNA-mRNA integrated analysis reveals roles for mirnas in primary breast tumors. *PLoS ONE*, 6(2).
- Esquela-Kerscher, A. & Slack, F.J., 2006. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 6, pp.259–269.
- Esteller, M., 2008. Epigenetics in Cancer. , pp.1–12.
- Foulkes, W.D. et al., 2003. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 95(19), pp.1482–1485.
- Freres, P. et al., 2010. [“Triple negative” breast cancer]. *Revue médicale de Liège*, 65(3), pp.120–6.
- Frères, P. et al., 2014. Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients induces miR-34a and miR-122 expression. *Journal of cellular physiology*, (April), pp.1–33.
- Haffty, B.G. et al., 2006. Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 24(36), pp.5652–5657.
- Hall, J.M. et al., 1990. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science (New York, N.Y.)*, 250(4988), pp.1684–9.
- Haupt, S. et al., 2015. Targeting Mdmx to treat breast cancers with wild-type p53. *Cell death & disease*, 6, p.e1821.
- Hegi, M.E. et al., 2008. Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *Journal of Clinical Oncology*, 26(25), pp.4189–4199.

- Helleday, T., 2011. The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality: clearing up the misunderstandings. *Molecular oncology*, 5(4), pp.387–93.
- Henderson, B.R., 2012. The BRCA1 Breast Cancer Suppressor: Regulation of Transport, Dynamics, and Function at Multiple Subcellular Locations. *Scientifica*, 2012, p.796808.
- Heneghan, H.M., Miller, N. & Kerin, M.J., 2010. MiRNAs as biomarkers and therapeutic targets in cancer. *Current Opinion in Pharmacology*, 10(5), pp.543–550.
- Hennessy, B.T. et al., 2010. NIH Public Access. , 69(10), pp.4116–4124.
- Hennessy, B.T.J. et al., 2010. Somatic mutations in BRCA1 and BRCA2 could expand the number of patients that benefit from poly (ADP ribose) polymerase inhibitors in ovarian cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(22), pp.3570–6.
- Hennighausen, L. & Robinson, G.W., 2001. Signaling Pathways in Mammary Gland Development. *Developmental Cell*, 1(4), pp.467–475.
- Higgins, M.J. & Baselga, J., 2011. Targeted therapies for breast cancer. *The Journal of clinical investigation*, 121(10), pp.3797–803.
- Iwamoto, T. et al., 2011. BRCA1 promoter methylation in peripheral blood cells is associated with increased risk of breast cancer with BRCA1 promoter methylation. *Breast Cancer Research and Treatment*, 129e, pp.69–77.
- Jiang, G. et al., 2013. BRCA1-Ku80 protein interaction enhances end-joining fidelity of chromosomal double-strand breaks in the G1 phase of the cell cycle. *The Journal of biological chemistry*, 288(13), pp.8966–76.
- Kalb, R. et al., 2014. BRCA1 is a histone-H2A-specific ubiquitin ligase. *Cell reports*, 8(4), pp.999–1005.
- Kawai, S. & Amano, A., 2012. BRCA1 regulates microRNA biogenesis via the DROSHA microprocessor complex. *Journal of Cell Biology*, 197(2), pp.201–208.
- Knudson, A.G., 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(4), pp.820–3.
- Koren, S. et al., 2015. PIK3CAH1047R induces multipotency and multi-lineage mammary tumours. *Nature*, 525(7567), pp.114–118.
- Lakhani, S.R. et al., 2005. Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. *Clinical Cancer Research*, 11, pp.5175–5180.
- Langerod, A. AL et al., 2007. TP53 mutation status and gene expression profiles are powerful prognostic markers of breast cancer. *Breast Cancer Research*, 9(3), p.R30.

- Lehmann, B.D. et al., 2011. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of clinical investigation*, 121(7), pp.2750–67.
- Lehmann, B.D.B. et al., 2011. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *Journal of Clinical Investigation*, 121(7), pp.2750–2767.
- Lips, E.H. et al., 2013. Triple-negative breast cancer: BRCAness and concordance of clinical features with BRCA1-mutation carriers. *British journal of cancer*, 108(April), pp.2172–7.
- Lu, J. et al., 2005. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435(7043), pp.834–8.
- Makhoul, I. & Kiwan, E., 2011. Review Neoadjuvant Systemic Treatment of Breast Cancer. , (July 2010), pp.348–357.
- Meijers-Heijboer, H. et al., 2002. Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2*1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *Nature Genetics*, 31(1), pp.55–59.
- Metzger-Filho, O. et al., 2012. Dissecting the heterogeneity of triple-negative breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 30(15), pp.1879–1887.
- Miki, Y. et al., 1994. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science (New York, N.Y.)*, 266(5182), pp.66–71.
- Narod, S.A. & Foulkes, W.D., 2004. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nature reviews. Cancer*, 4(9), pp.665–76.
- Orban, T.I. & Olah, E., 2003. Emerging roles of BRCA1 alternative splicing. *Molecular pathology : MP*, 56, pp.191–197.
- Parkin, D.M., Boyd, L. & Walker, L.C., 2011. 16. The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010. *British journal of cancer*, 105 Suppl (S2), pp.S77–81.
- Perou, C.M. et al., 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), pp.747–752.
- Polyak, K. & Garber, J., 2011. Targeting the missing links for cancer therapy. *Nature medicine*, 17(3), pp.283–4.
- Rahman, N. et al., 2007. PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nature genetics*, 39(2), pp.165–7.

- Rice, J.C., Massey-Brown, K.S. & Futscher, B.W., 1998. Aberrant methylation of the BRCA1 CpG island promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA in sporadic breast cancer cells. *Oncogene*, 17(January), pp.1807–1812.
- Rothé, F. et al., 2011. Global microRNA expression profiling identifies MiR-210 associated with tumor proliferation, invasion and poor clinical outcome in breast cancer. *PLoS ONE*, 6(6).
- Satagopan, J.M. et al., 2001. The lifetime risks of breast cancer in Ashkenazi Jewish carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 10(5), pp.467–73.
- Savage, K.I. & Harkin, D.P., 2014. BRCA1, a “complex” protein involved in the maintenance of genomic stability. *FEBS Journal*, p.n/a–n/a.
- Shen, S. et al., 2014. A prognostic model of triple-negative breast cancer based on miR-27b-3p and node status. *PLoS ONE*, 9(6).
- Sørli, T. et al., 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), pp.10869–10874.
- Stefansson, O. a. et al., 2012. BRCA1 epigenetic inactivation predicts sensitivity to platinum-based chemotherapy in breast and ovarian cancer. *Epigenetics*, 7(November), pp.1225–1229.
- Szabo, C.I. & King, M.C., 1997. Population genetics of BRCA1 and BRCA2. *American journal of human genetics*, 60(5), pp.1013–20.
- Tavassoéli F.A, D.P.W., 2003. Tumors of the breast and femal genital organs. In *Pathology and Genetics*.
- Tutt, A. et al., 2010. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet (London, England)*, 376(9737), pp.235–44.
- Valencia-Sanchez, M.A. et al., 2006. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes & development*, 20(5), pp.515–24.
- Veeck, J. & Esteller, M., 2010. Breast cancer epigenetics: From DNA methylation to microRNAs. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 15, pp.5–17.
- Visovsky, C., 2014. Treatment Considerations for the Management of Patients With Hormone Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer. *Journal of the advanced practitioner in*

oncology, 5(5), pp.321–30.

Volinia, S. et al., 2012. Breast cancer signatures for invasiveness and prognosis defined by deep sequencing of microRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(8), pp.3024–9.

Vollebergh, M. a. et al., 2011. An aCGH classifier derived from BRCA1-mutated breast cancer and benefit of high-dose platinum-based chemotherapy in HER2-negative breast cancer patients. *Annals of Oncology*, 22(7), pp.1561–1570.

Wei, L. et al., 2008. Rapid recruitment of BRCA1 to DNA double-strand breaks is dependent on its association with Ku80. *Molecular and cellular biology*, 28(24), pp.7380–93.

Xu, Y. et al., 2013. Promoter methylation of BRCA1 in triple-negative breast cancer predicts sensitivity to adjuvant chemotherapy. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 24(6), pp.1498–1505.

BUT DU TRAVAIL

But du travail :

Les cancers du sein triples négatifs sont des tumeurs agressives et de mauvais pronostic. Ces cancers sont caractérisés par une importante hétérogénéité inter et intra tumorale. Cette hétérogénéité se traduit par de grandes variations de la réponse aux traitements. En effet, certaines tumeurs répondent favorablement aux agents chimiothérapeutiques d'autres répondent moins bien. Le défi pour les scientifiques vis-à-vis de ce groupe de tumeurs réside dans l'identification de nouveaux marqueurs prédictifs et/ou pronostiques d'une part et d'autre part, dans une nouvelle classification de ce groupe en identifiant les différents sous-groupes et en déterminant les cibles thérapeutiques propres à chaque sous-groupe.

Parmi ces tumeurs, certaines sont porteuses d'une mutation germinale BRCA1 et d'autres ont perdu son expression suite à des régulations par méthylation de son promoteur ou une régulation post-transcriptionnelle par des microARN.

Le but de ce projet est de caractériser les tumeurs TN et d'en définir leur hétérogénéité en fonction de deux groupes de marqueurs : le gène BRCA1 et les micro ARN. Les corrélations de ces biomarqueurs avec les paramètres cliniques et/ou la progression de la maladie permettent de tester le caractère pronostique et/ou prédictif de chaque biomarqueur et de la combinaison des biomarqueurs biologiques étudiés avec les caractères cliniques.

A long-terme, les résultats permettront d'orienter le projet vers l'identification des cibles thérapeutiques.

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

1. Cohorte

1.1 Comité d'éthique

Ce projet a été réalisé au sein du laboratoire de génétique humaine en collaboration avec le service d'oncologie médicale du CHU de Liège. L'accord du comité d'éthique hospitalo-universitaire de Liège a été obtenu pour la réalisation de cette étude, en accord avec la déclaration de Helsinki, sous le numéro 2010/229. Toutes les patientes ont signé un consentement écrit.

1.2 Tumeurs

La bio-banque de l'université de Liège a mis à notre disposition 69 tumeurs de sein triple négatives, 25 tissus mammaires sains, 10 tumeurs de sein exprimant les récepteurs aux estrogènes et 10 tumeurs de sein avec une amplification du récepteur tyrosine kinase Her2. Toutes les tumeurs sont fixées au formol et enchâssées en paraffine. Pour chaque tumeur, la zone tumorale est vérifiée et entourée par un pathologiste du CHU de Liège (Sart-Tilman, Liège) sur une coupe colorée à l'hématoxyline et l'éosine.

2. Lignées cellulaires

HCC1937, UACC3199 et MCF7 sont trois lignées de cancer mammaire obtenues de ATCC (American Type Culture Collection).

La lignée HCC1937 a été cultivée dans le milieu de culture RPMI_1640 contenant 5% de sérum de veau fœtal, 1% glutamine, 1% pénicilline-streptomycine.

La lignée UACC3199 a été cultivée dans du milieu de culture L-15 (Leibovitz) contenant 5% de sérum de veau fœtal, 0,1mg/ml transferrine, 0,1mg/ml insuline, 5ug/ml catalase, 3,6mg/ml hydrocortisone et 1% glutamine.

La lignée MCF7 a été cultivée dans du milieu de culture DMEM contenant 5% de sérum de veau fœtal, 1% glutamine et 1% pénicilline –streptomycine.

Les trois cultures cellulaires ont été conservées à 37°C sous atmosphère de CO₂ à 5% et 95% d'humidité.

Les caractéristiques des lignées sont reprises dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2 : Caractéristiques des lignées cellulaires utilisées.

Lignée cellulaire	Type de tumeur	BRCA1	Récepteurs
HCC1937	carcinome canalaire primitif	ins5382C	ER-, PR-, Her2 -
UACC3199	carcinome canalaire infiltrant	méthylation promoteur	ER-, PR-, Her2+
MCF7	adénocarcinome mammaire	Normal	ER+, PR+, Her2 -

3. Extraction et qualité des acides nucléiques

3.1 Extraction des acides nucléiques

L'extraction de l'ADN et l'ARN est réalisée simultanément à partir de 19 coupes fixées sur lames pour chaque tumeur. Les coupes FFPE fixées sur lame non colorées sont superposées avec la coupe colorée à l'hématoxyline-éosine qui a été vérifiée par un pathologiste, une macro-dissection de la zone tumorale est réalisée sur chaque coupe, puis collectée dans un tube eppendorf de 2mL avec une aiguille stérile. Ensuite, 640 ul de solution de déparaffination sont ajoutés dans le tube (Solution déparaffination – Qiagen) pour procéder à l'extraction suivant le protocole du kit *Allprep FFPE DNA/RNA kit* (Qiagen).

Après extraction, les acides nucléiques sont dosés au Nanodrop pour déterminer leur concentration. Les ADN sont ensuite dosés au pico-green avec le kit Quant-iT Picogreen ds DNA Reagents and kits (Fisher : P7589) dans le but de déterminer le pourcentage d'ADN double brin.

3.2 Qualité des acides nucléiques

Après extraction, la qualité des acides nucléiques obtenus est testée par une PCR multiplexe amplifiant un gène ubiquitaire, comme décrit précédemment. (Takano et al. 2010)(Van Beers et al. 2006).

Pour tester la qualité des ADN extraits, quatre couples d'amorces sont utilisés pour réaliser la PCR multiplexe. Cette PCR permet d'amplifier quatre fragments de taille croissante du gène

GAPDH (Glycéraldéhyde 3 Phosphate Déshydrogénase) : 100, 200, 300 et 400 pb. Les séquences des primers sont reprises dans le tableau ci-dessous.

Pour tester la qualité des ARN extraits, une reverse transcription est réalisée suivie d'une PCR-multiplexe amplifiant quatre fragments de taille croissante du gène TBP (TATA box Binding Protein): 92, 161, 252 et 300 pb.

Les produits PCR sont déposés sur gel d'agarose 2% TBE et une électrophorèse est réalisée.

Tableau 3 : Séquences des amorces utilisées pour le contrôle de qualité des acides nucléiques extraits à partir de tumeurs.

Amorce	Séquence
GAPDH-100F	GTTCCAATATGATTCCACCC
GAPDH-100R	CTCCTGGAAGATGGTGATGG
GAPDH-200F	AGGTGGAGCGAGGCTAGC
GAPDH-200R	TTTTGCGGTGGAAATGTCCT
GAPDH-300F	AGGTGAGACATTCTTGCTGG
GAPDH-300R	TCCACTAACCAGTCAGCGTC
GAPDH-400F	ACAGTCCATGCCATCACTGC
GAPDH-400R	GCTTGACAAAGTGGTCGTTG
TBP-92-F	GGATAAGAGAGCCACGAACC
TBP-92-R	TGCCAGTCTGGACTGTTCTT
TBP-161-F	GGGCACCACTCCACTGTAT
TBP-161-R	CACGAAGTGCAATGGTCTTT
TBP-252-F	GGGAGCTGTGATGTGAAGTTT
TBP-252-R	TGAGAGCCATTACGTCGTCT
TBP-300-F	GGCGGAAGTGACATTATCAA
TBP-300-R	CAGGCTGTTGTTCTGATCCA

4. Promoteur BRCA1 : Methylation Specific – Polymerase Chain Reaction (MS-PCR)

Le but de cette expérience est de vérifier le statut de méthylation du promoteur du gène BRCA1 dans les tumeurs. Le kit EZ DNA Methylation de Zymo search est utilisé pour réaliser cette expérience.

250 ng d'ADN tumoral sont traités au sodium bisulfite une nuit (environ 16h) à 55°C à l'abri de la lumière. Le bisulfite convertit les cytosines non méthylées en uracile et les cytosines méthylées restent inchangées. L'ADN converti est ensuite amplifié en utilisant deux couples d'amorces (un couple amplifiant les fragments méthylés et un couple amplifiant les fragments non méthylés). La séquence des amorces est reprise dans le tableau 4. L'amplification est réalisée avec la polymérase « HotStarTaq DNA polymerase » (Qiagen) dans un thermocycleur Applied Biosystem programmé comme suit : 1 cycle de dénaturation 15min à 95°C, 35 cycles au cours desquels l'échantillon subit 30 sec de dénaturation à 94°C, 30 sec d'hybridation à 58°C, et 45 sec d'élongation à 72°C. L'échantillon est maintenu 10 min à 72°C à pour terminer la synthèse des fragments courts.

Tableau 4 : Séquence des amorces BRCA1

Amorce	Séquence
BRCA1-METHYL R	5'-AAA TCT CAA CGA ACT CAC GCC G-3'
BRCA1-METHYL F	5'-TCG TGG TAA CGG AAA AGC GC-3'
BRCA1-Non METH R	5'-CAA AAA ATC TCA ACA AAC TCA CAC CA-3'
BRCA1-Non METH F	5'-TTG GTT TTT GTG GTA ATG GAA AAG TGT-3'

Les produits PCR sont déposés sur gel d'agarose ultra pure 3% TBE.

5. Expression de la protéine BRCA1 : Proximity ligation assay (PLA)

5.1. Principe de la proximity ligation assay

La PLA est une technique qui permet la détection et quantification d'une seule protéine ou l'interaction entre deux protéines. La particularité de cette technique est l'utilisation d'anticorps secondaires couplés à des sondes d'oligonucléotides complémentaires. La fixation des anticorps secondaires sur les anticorps primaires permet la liaison des deux sondes complémentaires par une ligase et la formation d'une molécule d'ADN circulaire. Cette

molécule d'ADN est ensuite amplifiée par une réaction d'amplification à l'aide d'une polymérase et d'oligonucléotides. La détection peut se faire en visible en utilisant le DAB comme chromogène ou en fluorescence en utilisant du DAPI. Cette technique peut être utilisée pour plusieurs applications :

- Détection et quantification de l'interaction entre deux protéines
- Détection et quantification d'une modification d'une protéine (exemple : phosphorylation)
- Détection et quantification d'une protéine avec une grande sensibilité
- Détection et quantification d'une protéine avec une grande spécificité

5.2. PLA protéine BRCA1

Contrairement à l'immunohistochimie, pour réaliser la PLA, 2 anticorps primaires produits dans deux espèces différentes sont utilisés contre deux épitopes de la même protéine, ce qui augmente la spécificité de cette technique. Dans notre cas, un anticorps spécifique de l'extrémité C terminale (Sigma : SAB4502848) et un anticorps spécifique de l'extrémité N-terminale (MS110, Abcam : ab16780) de la protéine BRCA1 ont été utilisés (dilution : 1/50), permettant ainsi de détecter uniquement la protéine entière.

6. Expression de l'ARNm BRCA1 : hybridation in situ (ISH)

6.1. Principe de l'hybridation in situ

L'hybridation in situ est une technique qui permet de détecter les acides nucléiques dans les tissus, sur coupe histologique. Dans les tissus enchâssés en paraffine, les ARN sont souvent très dégradés et les PCR quantitatives ne sont pas toujours réalisables. Cette technique est donc une bonne alternative. Elle permet de détecter et localiser l'ARN d'intérêt dans un tissu donné. De plus, il est possible de quantifier l'expression de l'ARN d'intérêt.

6.2. ISH ARNm BRCA1

Dans notre étude, l'expression de l'ARN messager de BRCA1 a été vérifiée par l'ISH en

utilisant une technologie spécifique dite « RNAscope » développée spécialement pour les tissus FFPE (ACD, Bioké, The Netherland). Cette technologie repose sur l'utilisation de sondes d'oligonucleotides de petites tailles en forme de double-Z comme décrit précédemment par Fay Wang et ses collaborateurs (Wang et al. 2012). Les sondes utilisées sont complémentaires à la région aa369- 1482, de l'exon 5 à exon 11 de BRCA1.

7. Profil des microARN par RT-qPCR

Le profil d'expression de 27 micro-ARN a été réalisé dans l'ARN total extrait à partir de 50 tumeurs de la cohorte par RT-qPCR en utilisant le kit miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR assays de Exiqon (Danemark). Après une réaction de transcription inverse, deux dilutions de l'ADN complémentaire (ADNc) de chaque patiente sont testées pour l'amplification avec des amorces de deux gènes contrôles endogènes dans le but de vérifier la qualité de l'ADNc et de choisir la dilution idéale pour la quantification. Ce test de qualité nous a permis d'éliminer 19/69 patientes à cause de la mauvaise qualité de l'ARN extrait.

Après amplification, nous réalisons la quantification en utilisant la méthode des courbes standard (courbe étalons) pour vérifier si les Ct obtenus sont compris dans l'intervalle de la linéarité de la qPCR. La normalisation a été réalisée en utilisant la moyenne géométrique de 5 gènes contrôles endogènes comme recommandé par Mestdagh et al (2009) (SNORD44, SNORD66, hsa-miR-190a-5p, hsa-miR-361-3p, hsa-miR-484). SNORD 44 et SNORD 66 sont deux contrôles endogènes utilisés dans la quantification des micro-ARN. Les micro-ARN hsa-miR-190a-5p, hsa-miR-361-3p, hsa-miR-484 sont choisis pour leur expression stable dans les cancers du sein selon Farazi et ses co-auteurs (Farazi et al. 2011) (Mestdagh et al. 2009)

L'expression relative de chaque micro-ARN est obtenue après comparaison à l'expression du pool d'ADNc des patientes. Ce pool a été utilisé pour obtenir les courbes étalons pour la quantification.

Certains microARN ont été choisis pour leur association à la survie, d'autres pour leur association à l'infiltration lymphocytaire et d'autres apparaissaient intéressants dans le plasma (Profil des micro-ARN circulants, (Frères et al. 2014)). Le tableau en annexe 1 représente les micro-ARN étudiés, leur séquence ainsi que la raison de leur choix.

8. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le programme SPSS (version 20.0 : IBM SPSS) et vérifiées dans le programme R avec comme seuil de signification $p < 0,05$. La survie sans récurrence ou PFS (Progression Free Survival) a été calculée et est la durée entre le diagnostic et la rechute ou la fin de l'étude pour les patientes n'ayant pas rechuté. La survie globale ou OS (Overall Survival) est la durée de vie entre le diagnostic et le décès ou la fin de l'étude pour les patientes encore vivantes à la fin de l'étude.

La distribution des micro-ARN n'étant pas normale, le test de Mann-Whitney U a été réalisé. Les courbes de survie Kaplan-Meier ainsi que les courbes ROC (Receiver Operating Characteristic) ont été réalisées sur le programme GraphPad Prism 5.

Dans le but de déterminer le meilleur modèle de prédiction, nous avons sélectionné les variables par régression logistique : méthode « ascending forward ».

Le test de vraisemblance a été réalisé pour estimer si l'ajout de chaque nouvelle variable dans la régression logistique améliore le modèle. La même procédure a été utilisée pour les analyses de Cox multivariées. Pour tester l'optimisme du modèle de prédiction, le test de Hosmer-Lemeshow a été réalisé.

La différence des durées de survie estimées par Kaplan-Meier a été calculée par le log-Rank test.

9. Références bibliographiques

- van Beers, E.H. et al., 2006. A multiplex PCR predictor for aCGH success of FFPE samples. *British journal of cancer*, 94, pp.333–337.
- Farazi, T. a. et al., 2011. MicroRNA sequence and expression analysis in breast tumors by deep sequencing. *Cancer Research*, 71, pp.4443–4453.
- Frères, P. et al., 2014. Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients induces miR-34a and miR-122 expression. *Journal of cellular physiology*, (April), pp.1–33.
- Mestdagh, P. et al., 2009. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome biology*, 10(6), p.R64.
- Takano, E. a et al., 2010. A multiplex endpoint RT-PCR assay for quality assessment of RNA extracted from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *BMC biotechnology*, 10(1), p.89.
- Wang, F. et al., 2012. RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 14(1), pp.22–9.

CHAPITRE III : RESULTATS

I. Evaluation des paramètres moléculaires BRCA1 et des micro-ARN comme facteurs pronostiques pour les cancers du sein triples négatifs

(BMC Cancer, 2015)

I.1 Résumé

Les cancers du sein triples négatifs (TN) représentent 10 à 15% de tous les cancers du sein et sont caractérisés par une absence d'expression des récepteurs aux estrogènes, des récepteurs à la progestérone et l'absence de surexpression du récepteur tyrosine kinase Her2. Ces cancers sont très hétérogènes et sont de mauvais pronostic avec un risque élevé de rechute précoce. BRCA1, premier gène suppresseur de tumeur identifié dans les cancers du sein héréditaires, est associé à ce groupe de cancers mammaires et joue un rôle important dans ces tumeurs. Les mutations germinales de BRCA1 favorisent particulièrement les cancers TN et son expression peut être perdue ou fortement réduite dans ces cancers, par méthylation de son promoteur, mutation germinale suivie d'une perte d'hétérozygotie, ou encore par une régulation par des microARN, de petites molécules d'ARN non codant.

Les facteurs pronostiques dans les cancers TN sont actuellement réduits aux facteurs cliniques classiques et les cliniciens manquent d'outils pronostiques et prédictifs. Le but de notre travail est d'évaluer la valeur pronostique des paramètres moléculaires BRCA1 et de certains microARN dans 69 cancers TN.

Les cancers TN étant très hétérogènes et souvent assimilés au type moléculaire basal-like, l'expression des cytokératines 5/6 a été réalisée par immunohistochimie pour identifier les tumeurs TN à caractère basal like des autres tumeurs TN. D'autre part, l'expression de BRCA1, aussi bien l'ARN messager que la protéine, a été quantifiée dans les tumeurs ainsi que l'association de BRCA1 à son partenaire BARD1, comme reflet de l'éventuelle fonctionnalité de la protéine BRCA1. Parallèlement, le profil d'expression d'un groupe de 27 microARNs a été réalisé dans ces mêmes tumeurs.

Nos résultats ont permis la mise en évidence d'un nouveau facteur pronostique dans les cancers TN : le miR-548c-5p. De plus, la combinaison de ce miR avec les facteurs pronostiques connus et utilisés en clinique permet d'améliorer la prédiction de la rechute. Par contre, les paramètres moléculaires BRCA1 ne permettent pas d'améliorer la prédiction de la rechute probablement à cause de l'hétérogénéité intra-tumorale.

En conclusion, ces paramètres BRCA1 ne peuvent pas être utilisés en clinique à l'heure actuelle, contrairement au microARN miR548c-5p.

Evaluation of *BRCA1*-related molecular features and microRNAs as prognostic factors for triple negative breast cancers.

Meriem Boukerroucha^{1*}, Claire Josse^{1*}, Sonia ElGuendi¹, Bouchra Boujemla¹, Pierre Frères^{1,2}, Raphaël Marée⁴, Stéphane Wenric^{1,2}, Karin Segers³, Joelle Collignon², Guy Jerusalem² and Vincent Bours^{1,3}

- : Authors contributed equally to this work.

Institutional addresses:

1 : University of Liège, GIGA-Cancer Research, Human Genetics Unit, Liège , Belgium

2 : Liège University and CHU Sart-Tilman, Medical Oncology department, Liège, Belgium

3 : CHU de Liège, Center of Genetics, Liège , Belgium

4 : University of Liège, GIGA-bioinformatics platform, Liège, Belgium

I.2. Abstract

Background

The *BRCA1* gene plays a key role in triple negative breast cancers (TNBCs), in which its expression can be lost by multiple mechanisms: germinal mutation followed by deletion of the second allele; negative regulation by promoter methylation; or miRNA-mediated silencing. This study aimed to establish a correlation among the *BRCA1*-related molecular parameters, tumor characteristics and clinical follow-up of patients to find new prognostic factors.

Methods

BRCA1 protein and mRNA expression was quantified *in situ* in the TNBCs of 69 patients. *BRCA1* promoter methylation status was checked, as well as cytokeratin 5/6 expression. Maintenance of expressed BRCA1 protein interaction with BARD1 was quantified, as a marker of BRCA1 functionality, and the tumor expression profiles of 27 microRNAs were determined.

Results

miR-548c-5p was emphasized as a new independent prognostic factor in TNBC. A combination of the tumoral expression of miR-548c and 3 other known prognostic parameters (tumor size, lymph node invasion and CK 5/6 expression status) allowed for relapse prediction by logistic regression with an area under the curve (AUC)=0.96.

BRCA1 mRNA and protein *in situ* expression, as well as the amount of BRCA1 ligated to BARD1 in the tumor, lacked any associations with patient outcomes, likely due to high intratumoral heterogeneity, and thus could not be used for clinical purposes.

Conclusions

In situ BRCA1-related expression parameters could be used for clinical purposes at the time of diagnosis. In contrast, miR-548c-5p showed a promising potential as a prognostic factor in TNBC.

Keywords:

BRCA1, TNBC, breast cancer, miRNA

1.3. Background

Breast cancer susceptibility gene 1 (*BRCA1*) was the first tumor suppressor gene identified in breast and ovarian cancer. Located on chromosome 17 (17q21), it encodes a multifunctional protein that is involved in several cellular processes such as DNA repair and cell cycle control. BRCA1 is involved in large protein complexes and its interaction with other proteins, as BARD1, is required for its function.

BRCA1 seems to be associated with the triple negative breast cancer (TNBC) subtype because the histological features and clinical outcomes of TNBC sporadic tumors can be very similar to those found in the tumors of *BRCA1* germline mutated patients. The traits that some sporadic cancers share with those occurring in *BRCA1* mutation carriers were described and called ‘BRCAness’ by Turner *et al.* [1]. In particular, these cancers present a high rate of chromosomal alterations reflecting the absence of the BRCA1 DNA repair function.

TNBC has a poor prognosis and no targeted therapy is currently available. Because these cancers are heterogeneous in terms of therapeutic response, new therapeutic solutions are being sought. In this context, recent clinical data have shown that *BRCA1*-associated breast cancers appeared to be more sensitive to platinum agents in neoadjuvant chemotherapy than non-hereditary tumors [2–4]. In contrast, a phase II clinical trial found that poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors also showed promising activity in *BRCA1*-mutated breast cancer although there were no response in patients with TNBC regardless of *BRCA1/2* mutation status [5], and phase III trials are ongoing in *BRCA1/2*-mutated BC and TNBC [6].

However, it is also becoming clear that germline *BRCA1/2* mutations are neither necessary nor sufficient for patients to derive benefit from these agents [6]. This variability of response can be explained by different BRCA1 protein expression statuses inside the tumor, as several cases can be met : (i) germline *BRCA1* is mutated in one allele, and the second is lost; thus, BRCA1 tumoral expression is missing [7, 8] (ii) germline *BRCA1* is mutated in one allele, and the second is still active, so tumoral BRCA1 expression is normal; (iii) germline *BRCA1* is mutated, but reversal somatic mutation occurs, and BRCA1 tumoral expression is restored, leading to PARP inhibitor treatment resistance [9, 10]; (iv) germline *BRCA1* is normal, but tumoral expression is lost by promoter hypermethylation [11]; and (v) germline *BRCA1* is normal, but tumoral expression is lost by post-transcriptional regulation, such as by miRNAs [12]. One could expect a greater likelihood of response for patients treated with platinum compounds or PARP inhibitors only if BRCA1 protein tumoral expression were lost. As a consequence, better characterization of BRCA1 expression status in TNBC would provide important knowledge to improve chemotherapy choices.

MicroRNAs are small non-coding RNAs that bind to the 3' untranslated (3'UTR) region of target messenger RNAs (mRNAs), and they are known to regulate gene expression. They are deregulated in breast cancers: some of them are known to be oncogenic, and others are known as tumor suppressors. MiRNAs participate in a variety of biological processes, such as the immune response, as well as proliferation and metastasis, which are hallmarks of cancer [13, 14]. Many studies have implicated miRNAs in chemotherapy resistance, such as to cisplatin [15], and some of them have been used as prognostic biomarkers[16–18]. Moreover, some miRNAs could target BRCA1 mRNA expression, and, at the same time, their expression was affected by BRCA1 protein [12, 19–21].

Currently, the number of conventional breast cancer prognostic factors is limited (tumor size, histology and grade, hormone receptors status, lymph nodes invasion, proliferative index [Ki67], and tumor-infiltrating lymphocytes, as well as the age of the patient), and their use does not allow for accurate prediction of treatment resistance or relapse in TNBC. Defining new molecular prognostic factors to refine TNBC classification would be useful in facilitating a more adapted chemotherapy choice.

In this context, we quantified molecular parameters focusing on the *BRCA1* gene expression regulation and function (BRCA1 promoter methylation, BRCA1 *in situ* mRNA expression,

BRCA1 *in situ* protein expression and BRCA1 *in situ* interaction with BARD1) in 69 TNBC tumors from patients. The expression of 27 tumoral miRNAs was also measured. Those molecular parameters were associated with progression-free survival in uni- and multivariate statistical analyses to determine new prognostic factors.

I.4. Materials and methods

More detailed protocols are available in Additional Methods File 1.

I.4.1. Ethical statement

Ethical approval was obtained from the local institutional ethics board (Comité d'éthique hospitalo-facultaire universitaire de Liège) in compliance with the Helsinki declaration. All of the patients were recruited on the basis of an opt-out methodology.

I.4.2. Patient and sample collection and study design

This retrospective study was performed on 69 formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tumoral samples obtained from the Liege University Biobank. The tissues stored in this biobank are available on condition that the study has received the consent of a local or external ethical board. The tumors were collected from 1999 to 2010, with a median follow-up of 11 years. The essential elements of "Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK)" were followed [22].

The clinicopathological characteristics of the patients are summarized in Table 1. A summary of the experimental design and the number of samples included in each type of analysis are shown in Figure 1

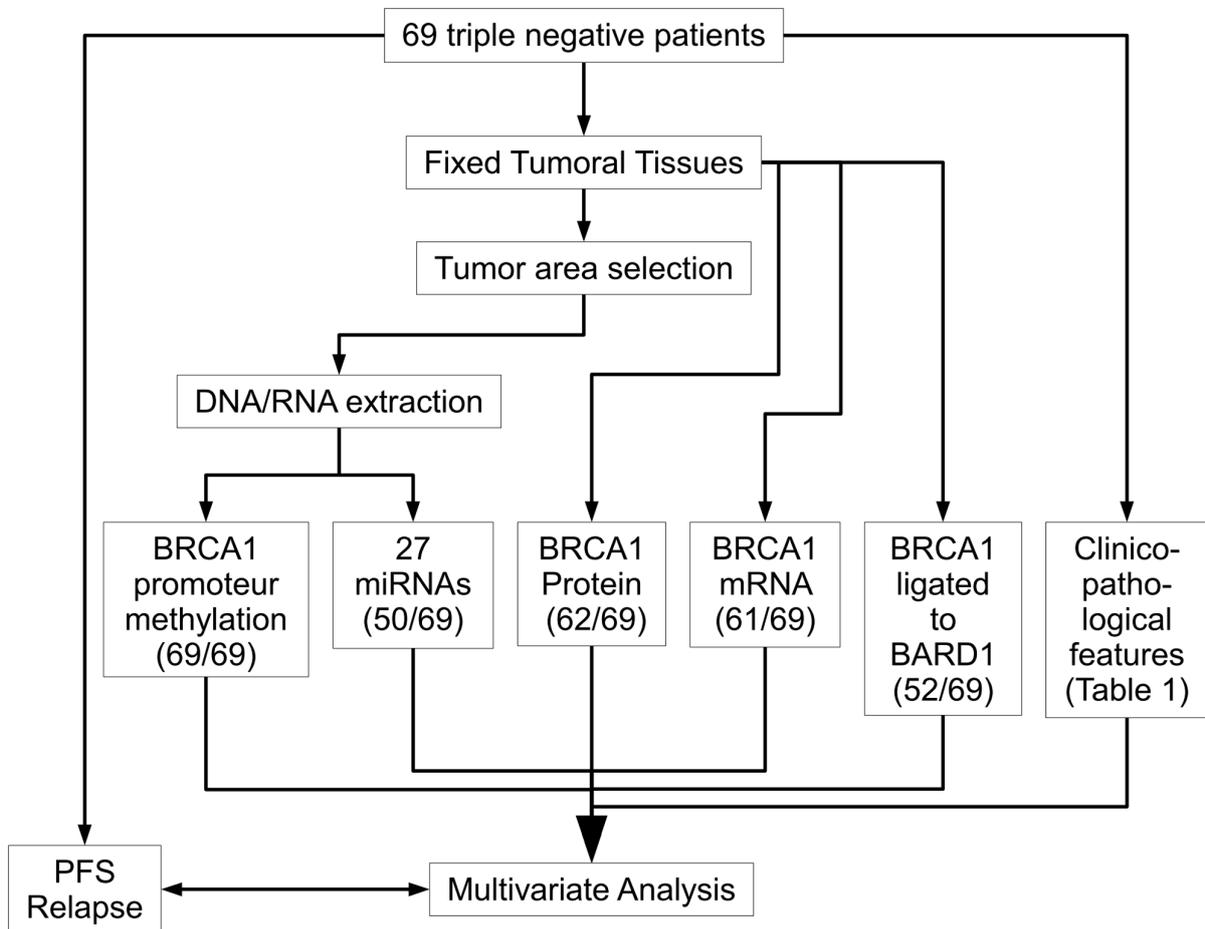


Figure 1 : Schematic representation of the study

<i>n</i> = 69	
<i>Age (year)</i>	
median	56
Range	28-88
<i>Tumour size (mm)</i>	
< 20	23
≥ 20	35
unknown	11
<i>lymph node invasion</i>	
yes	16
No	39
unknown	14
<i>Ki 67 (%)</i>	
< 20	11
≥ 20	52
unknown	6
<i>Histology</i>	
IDC	47
Other	19
unknown	3
<i>Bloom</i>	
I	6
II	7
III	53
unknown	3
<i>Molecular subtype</i>	
ck5/6 +, ER-, Her2-	30
ck5/6 -, ER-, Her2-	33
unknown	6
<i>Relapse</i>	
yes	24
No	45

Table 1: Patient clinicopathological characteristics.

I.4.3. DNA and RNA extraction

DNA and RNA extraction was performed using an all prep DNA/RNA FFPE extraction kit from Qiagen (Belgium) according to manufacturer protocol. Multiplex PCR for increasing the size amplicons of a house keeping gene was performed to assess the nucleic acid quality, as described by van Beers *et al.* [23].

I.4.4. BRCA1 promoter methylation

The methylation status of *BRCA1* promoter was assessed by methylation-specific PCR (MSP), as described by Esteller *et al.* [24].

I.4.5. BRCA1 mRNA expression

The mRNA expression was assessed by *in situ* hybridization using RNAscope technology (ACD) (Bioke, the Netherlands) for FFPE samples, as described in our previous work [25]. Signal quantification was performed using the Cytomine application (<http://www.cytomine.be/>, Marée *et al.* 2013) [26]. *BRCA1* mRNA expression was expressed as a percentage of the median expression value measured in the whole group.

I.4.6. BRCA1 protein expression and interaction with BARD1

BRCA1 expression level and interaction with BARD1 were assessed by proximity ligation assay (Duolink *in situ* detection reagents – Sigma, Belgium), as described in [25] and in Additional Methods File 1. Two antibodies raised against BRCA1 were used for the whole-length protein detection assays, and one antibody against BRCA1 and a second against BARD1 were used for interaction assays. The amount of BRCA1 protein and the amount of BRCA1-ligated to BARD1 were expressed as a percentage of their respective median expression values measured in the whole group.

I.4.7. Tumoral miRNA expression assessment

A total of 27 miRNAs were quantified by RT-qPCR in tumors using miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR assays from Exiqon (Denmark), according to the manufacturer's instructions. Those miRNAs were chosen because: (i) their expression was reported in the literature to be related to the survival of breast cancer patients; (ii) they are known to be expressed in lymphoid cells and to reflect the lymphoid invasion of the tumor; or (iii) they were emphasized in our previous work (unpublished results). The miRNAs

quantified, their sequences and the reasons for choosing them are listed in Additional Table File 2.

Quantification was realized using standard curve method. Normalization was performed using the geometric mean of 5 endogenous control genes. The miRNA amounts were expressed in percentages relative to the median expression value of the whole group.

I.4.8. Statistical analysis

Statistical analysis were performed with SPSS software (version 20.0: IBM SPSS), and checked with R software (version 3.1.0). Some of the graphs were drawn with GraphPad Prism software, version 5.

I.5. Results

I.5.1. Quantification of *in situ* BRCA1 mRNA and protein expression

To assess the BRCA1 expression status inside the tumors, the amount of BRCA1 protein was first measured by proximity ligation assays (PLAs) in fixed TNBC tissues. Representative *in situ* BRCA1 protein expression is shown in Figure 2A. As a second step, the *BRCA1* mRNA expression level was visualized and quantified in the same tissues, by *in situ* hybridization (Fig. 2B).

The most striking observation was that the staining for both mRNA and protein is heterogeneous across the tumor: some areas strongly expressed BRCA1 and others only faintly, as illustrated in the two magnified subzones. The staining was restricted to epithelial cells.

Univariate analyses showed that neither BRCA1 protein nor mRNA expression was associated with progression-free survival (PFS) (Fig 2C). The entire dataset and all of the univariate analyses performed in this study are available in Additional Table Files 3 and 4.

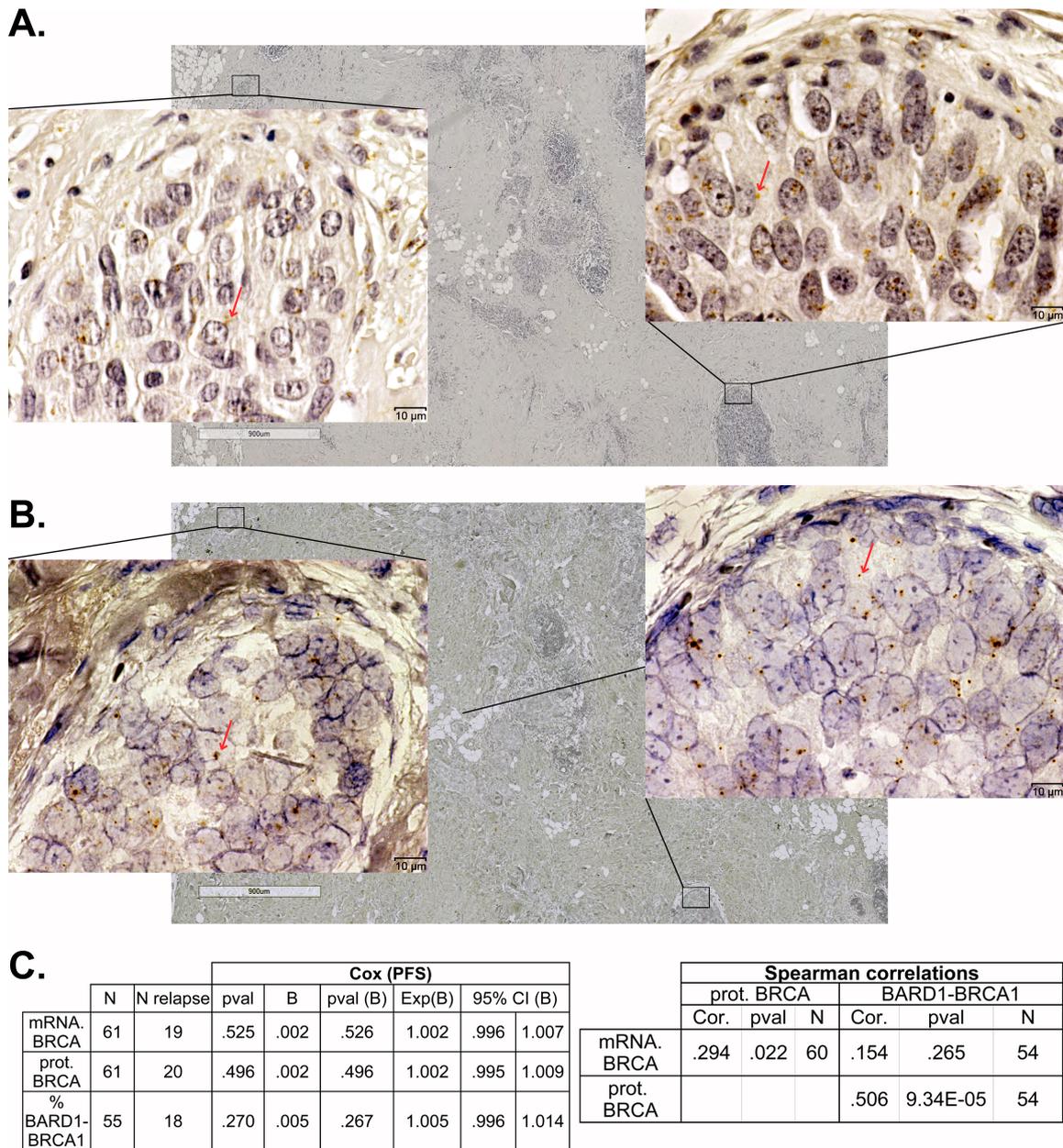


Figure 2 : *In situ* BRCA1 expression in TNBC tumors. **A.** Proximity ligation assay showing a representative BRCA1 protein expression across the tumor. Two different subzones were magnified to illustrate high and faint expression. **B.** In situ hybridization assay showing *BRCA1* mRNA expression across the same tumor and subzones used for protein detection. In both cases, high heterogeneity of the localization of expression is observed. **C.** Cox univariate regression and correlation analyses of BRCA1 expression relative to patient clinicopathological features. No relationship of BRCA1 expression with patient outcome was observed.

I.5.2. Quantification of *in situ* BRCA1-BARD1 interaction

Proximity ligation assays were performed to quantify the *in situ* interaction of BRCA1 with its interacting protein, BARD1. Statistical analyses revealed that the percentage of BARD1-ligated BRCA1 was correlated with BRCA1 protein and mRNA expression. However, no association was observed with PFS in univariate analysis (Fig. 2C).

I.5.3. *BRCA1* promoter methylation and survival

The methylation status of *BRCA1* promoter was checked by methylation-specific PCR in tumoral DNA extracted from fixed TNBC tissues. Twenty-seven of the 69 patients (39%) carried a methylated *BRCA1* promoter, but we did not observe any associations of *BRCA1* promoter methylation with patient outcomes or with *BRCA1* mRNA expression (Additional Figure File 5). However, an expected negative correlation was observed between methylation and protein expression in the infiltrating ductal carcinoma sub-group.

I.5.4. Micro-RNA profiling in tumors

The tumoral expression of 27 miRNAs was quantified by RT-qPCR in RNA extracted from fixed TNBC tissues.

Spearman's correlations were calculated of the studied miRNAs and *BRCA1* mRNA with protein expression, BARD1-BRCA1 interaction, and promoter methylation status. The entire dataset is presented in Additional Table File 3. BRCA1 protein expression was positively correlated with miR-143-3p ($p=0.033$), miR-205-5p ($p=0.030$), miR-21-5p ($p=0.017$), and miR-142-5p ($p=0.011$). In contrast, no correlation was noted with *BRCA1* mRNA. Promoter methylation was negatively correlated with miR-21-5p ($p=0.024$) and positively correlated with miR-197-3p ($p=0.019$).

Univariate Cox regression analyses were also conducted to emphasize the associations of miRNA expression with patient outcomes (Table 2 and Additional Table File 4). High expression of miR-210, miR-205-5p, miR-484, and miR-93-5p were significantly associated with an increased risk of relapse, and miR-342-3p, reflecting lymphoid cell infiltration [27], was associated with a good prognosis (Table 2).

Table 2 : Univariate Cox analysis								
<i>Variable</i>	<i>N total</i>	<i>N relapse</i>	<i>Global pval</i>	<i>B</i>	<i>Sign</i>	<i>Exp(B)</i>	<i>95% CI</i>	
miR-210	49	20	0.00	.004	.000	1.004	1.002	1.007
miR-205-5p	49	20	0.00	.003	.002	1.003	1.001	1.005
Node	53	21	0.00	-1.344	.003	.261	.108	.630
miR-484	49	20	0.01	.004	.015	1.004	1.001	1.008
CK	61	20	0.02	1.106	.024	3.023	1.159	7.881
miR-93-5p	49	20	0.02	.003	.019	1.003	1.001	1.006
Bloom=3	65	23	0.03	1.963	.055	7.117	.957	52.955
miR-342-3p	49	20	0.04	-.005	.049	.995	.990	1.000
Size	57	18	0.05	.016	.055	1.016	1.000	1.032
Age	68	24	0.07	.025	.070	1.025	.998	1.053
Bloom=1	65	23	0.08	-3.195	.262	.041	.000	10.892
miR-146a	49	20	0.09	-.004	.093	.996	.992	1.001
miR-143-3p	49	20	0.11	.003	.116	1.003	.999	1.007
miR-155-5p	49	20	0.11	-.003	.123	.997	.993	1.001
miR-150-5p	49	20	0.12	-.004	.151	.996	.991	1.001
miR-142-3p	49	20	0.18	-.003	.195	.997	.993	1.002
miR-548c-5p	49	20	0.19	-.001	.196	.999	.997	1.001
miR-374a-5p	49	20	0.20	-.005	.200	.995	.988	1.003

I .5.5. Prediction of relapse using multivariate analysis

Univariate Cox proportional hazards regression analyses were first conducted to evaluate the association of clinicopathological factors with patient PFS (Additional Table File 4). Node invasion, cytokeratin 5 and 6 expression, bloom=3 and the size of the tumor are associated with relapse.

In multivariate Cox analysis, 3 parameters remained as independent prognostic factors: node invasion status, tumor size, and the expression of miR-548c-5p (node invasion: Exp(B):

16.576; CI: 2.876-95.538; p-val: 0.002 – tumor size: Exp(B): 1.065; CI: 1.027-1.105; p-val: 0.001 – miR-548c: Exp(B): 0.993; CI: 0.987-0.999; p-val: 0.023).

An outcome prediction model was built by binomial logistic regression. The best prediction model used node invasion, the size of the tumor, cytokeratin 5/6 expression status and miR-548c. Because the first 3 variables were already known to be prognostic factors, we compared the performances of two models, containing or not containing the miR-548c expression variable, to evaluate the improvement of the prediction of relapse by this miRNA (Fig 3). The addition of miR-548c-5p statistically improved the model (Chi-square p-val=0.00144). A ROC curve corresponding to the probability of relapse for each patient, calculated by these two models, is shown in Fig 3A.

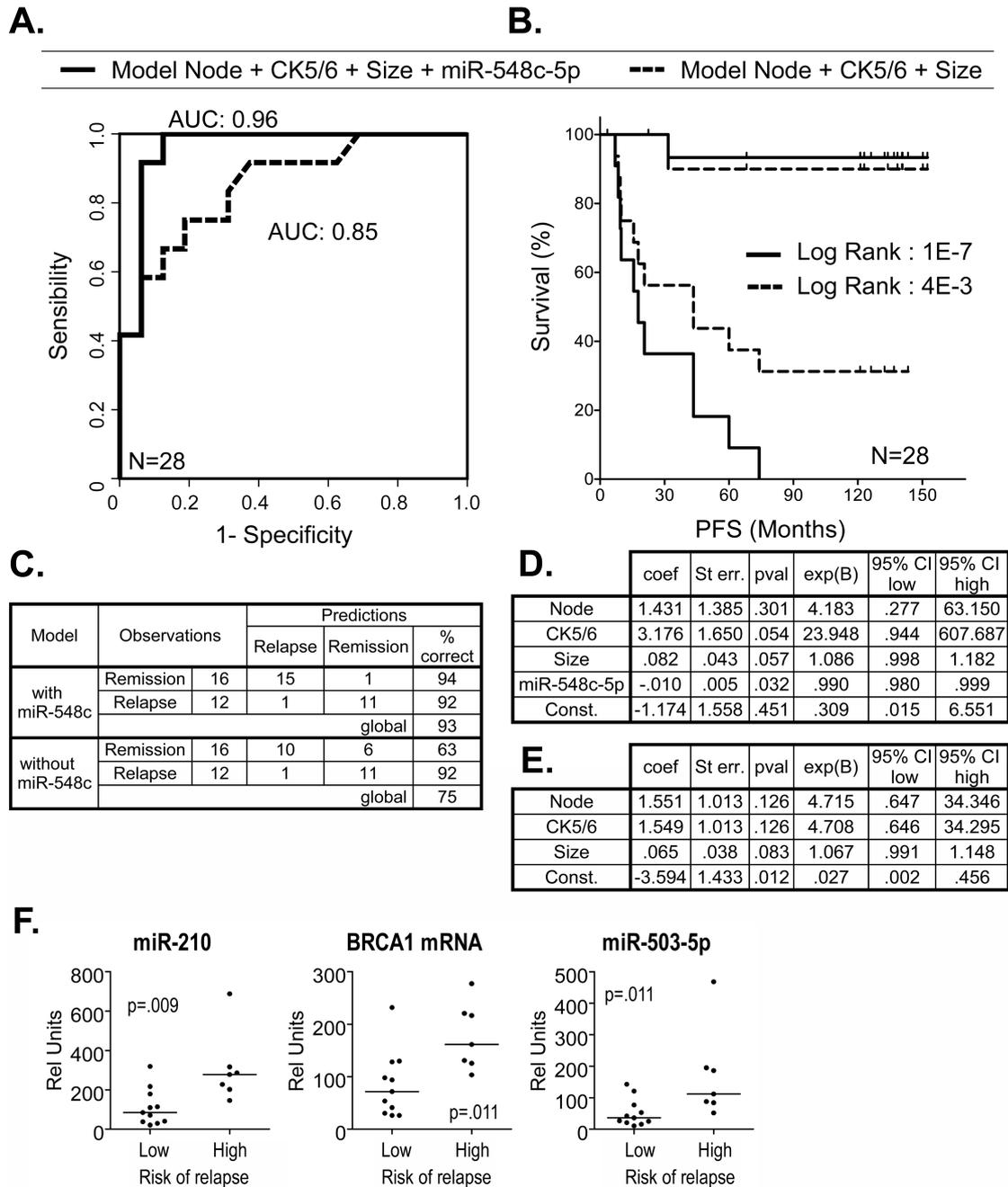


Figure 3 : miR-548c-5p as factor in relapse prediction model. Performances of two models are compared to measure the improvement of relapse prediction by the inclusion of the miR-548c-5p as a 4th variable, with the first 3 variables being node invasion, CK5/6 expression, and tumor size. **A.** Comparison of ROC curves computed with the relapse probability calculated by the model including miR-548c-p (solid line) and without miR-548c-5p (dash line). **B.** Patients were classified in 2 groups: high and low risk of relapse, according to the threshold needed to obtain 90% sensitivity in relapse prediction. Comparison of Kaplan-Meier curves computed with the patient group affectation calculated by the model including miR-548c-5p (solid line) and without miR-548c-5p (dash line). **C.** Classification performances of the two models at thresholds fixed to obtain 90%

sensitivity in relapse detection. **D.** Coefficient and odds ratio of the model including miR-548c-5p and **E.** without miR-548c-5p. **F.** Comparative expression levels of miR-210, miR-503-5p and *BRCA1* mRNA in the patients with <10% probability of relapse (remission) and >90% probability of relapse (relapse). These probabilities were calculated by the prediction model including miR-548c-5p.

The use of miR-548c-5p expression allowed for the improvement of the AUC from 0.854 (CI:0.713 to 0.996) to 0.958 (CI:0.883-1.000)(Table 3). Thresholds for both models were chosen to fix relapse detection sensitivity at 90%. Using these thresholds, the patients were assigned by each model into 2 risk groups: low or high risk of relapse. Kaplan-Meier PFS curves were generated using these effect groups for both models, and they are shown in Fig.3 B. Classification performances of the compared models are presented in Fig. 3C, and metrics are shown in Fig. 3D (with miR-548c) and E (without miR-548c) and in Table 3.

Interestingly, a comparison of 2 groups of patients presenting with extreme relapse probabilities (<10% and >90%), calculated by the predicting model including miR-548c, showed that patients with poor prognoses present higher expression of miR-503-5p, miR-210 and *BRCA1* mRNA.

In contrast, the addition of *BRCA1*-related parameters (mRNA, protein and BARD1 ligated to BRCA1) to the same 3 conventional prognostic factors (node invasion, tumor size and CK5/6 expression) did not improve the model performances (Fig. 4 and Table 3).

variables	Global model performances			ROC				Hosmer-Lemeshow		
	pval	-2LL	R2 Nagelkerk e	AUC	SE	CI: Min	CI: Max	Chi2	ddl	pval
Node, Tumor Size, CK5/6, miR-548c-5p	1.5E-4	15.570	.745	.96	.038	.883	1.000	5.08	7	.65
Node, Tumor Size, CK5/6, prot BRCA1, mRNA BRCA1, BARD1 ligated BRCA1	.009	21.979	.590	.90	.065	.773	1.000	11.45	8	.18
Node, Tumor Size, CK5/6	.006	25.722	.484	.85	.072	.713	.996	2.96	7	.89

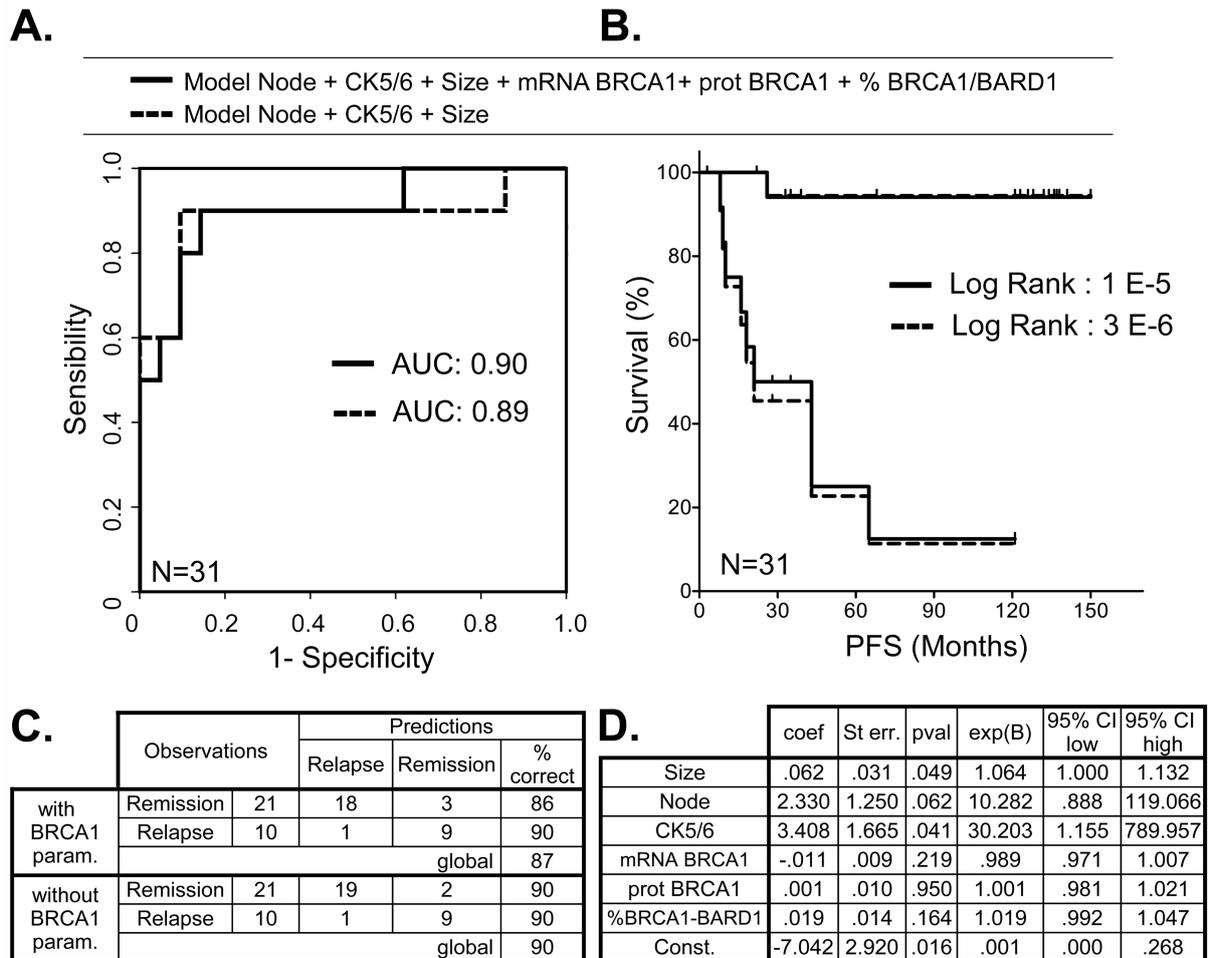


Figure 4 : BRCA1 expression as factor in relapse prediction models. Performances of two models are compared: the first model (solid line) includes BRCA1 expression parameters mRNA, protein expression and BARD1-ligated BRCA1, in addition to the 3 previously used conventional prognostic factors for breast cancer: tumor size, node invasion, CK5/6 expression. The second model (dash line) is composed of the 3 conventional prognostic factors only. **A.** Comparison of ROC curves computed with the relapse probability calculated by the BRCA1-related model (solid line) and the 3 conventional prognostic factor model (dash line). **B.** Patients were classified in 2 groups: good or bad prognosis, according to the threshold needed to obtain 90% sensitivity in relapse detection. Comparison of Kaplan-Meier curves computed with the patient group affectation calculated by the 2 models is represented. **C.** Classification performances of the two models at threshold fixed to obtain 90% sensitivity in relapse detection. **D.** Coefficient and odds ratio of the model including BRCA1 expression parameters.

I.6. Discussion

An accurate technique to determine BRCA1 tumoral expression status in TNBC would allow for informed decision and choosing platinum derivatives or PARP inhibitor treatments, because hypersensitivity to these agents has been described in cases of loss of BRCA1 expression [3, 5]. Thus, we developed alternative techniques to evaluate, in tumors, the expression status of BRCA1 at three different levels: mRNA, protein, and maintenance of BRCA1 interaction with BARD1. This multiple approach presented the advantage of incorporating different types of information, allowing for cross-control, and offering the possibility of combining the data. Several *BRCA1* studies have described mRNA expression using RT-qPCR or protein expression by immunohistochemistry, but studies describing both mRNA and protein expressions has been very rare [28], despite BRCA1 expression being known to be subjected to multiple regulations [19]. The commercially available antibodies directed against BRCA1 lack the specificity required to identify the BRCA1 protein for clinical purpose because no immunohistochemical (IHC) differences in BRCA1 protein expression were found between cases with and without *BRCA1* germline mutations by Pérez-Vallés and colleagues [29]. To improve the sensitivity and specificity of the BRCA1 detection compared with IHC, we used proximity ligation assays with two primary antibodies against the N- and C-terminus domains of BRCA1. The second advantage of this technique was that it only allowed for the measurement of the full-length proteins. BRCA1 must be ligated to its interacting protein BARD1 to repair DNA. Some *BRCA1* variants, such as splicing variants [29], can be expressed in the tumor but can lose their interaction with their partners. To obtain a reflection of BRCA1 function maintenance in tumors, proximity ligation assay were performed to visualize the portion of BRCA1 ligated to BARD1.

Although the three levels of BRCA1 tumoral expression were correlated inside the same tumor, highly heterogenous intra-tumoral expression was observed, hampering accurate quantification. The lack of correlation between PFS and BRCA1 expression was probably a consequence of this high variability. We concluded that none of these three facets of the BRCA1 tumoral expression could be used for clinical decision purposes.

The TNBC cohort that we explored included 6 patients with a known germline *BRCA1* mutation. However, no significant differences in BRCA1 expression at the levels of mRNA, protein, or ligation to BARD1 were observed in these cases, probably due to the small number of patients. Interestingly, two of these 6 *BRCA1* mutated patients also presented a methylated form of the *BRCA1* promoter, although Lips *et al.* described these events as mutually

exclusive [30]. This combination of events could increase the risk of breast cancer because these patients are also the 2 youngest who developed breast cancer in our cohort of 69 patients, but this possibility will need to be confirmed on a larger cohort. The work of Ertuk and Cecener also stated that miRNAs expression can be different in *BRCAl* mutated or normal TNBC tumors [31]. However, we could not observe similar effect, probably due to the small number of patients.

Statistical multivariate analysis demonstrated that miR-548c-5p was an independent prognostic factor for breast cancer. Patients with a good prognosis presented higher intratumoral expression of this microRNA. Although implicated in multiple biological processes including cancer, no role for miR-548c-5p has ever been reported in the breast cancer field. Mir-548 is a large, poorly conserved primate-specific miRNA gene family. Sixty-nine human mir-548 genes are located on almost all human chromosomes and its widespread distribution pattern and specific sequence indicate its evolutionary origin from the MADE1 transposable element [32, 33]. There are more than 3,500 putative mir-548 target genes, but none have been experimentally demonstrated for miR-548c-5p.

The measurement of tumoral miR-548c-5p expression levels in combination with 3 conventional breast cancer prognostic factors (node invasion, tumor size and cytokeratin 5/6 expression), allowed for the relapse prediction of patients with an AUC=0.96. A study in a larger cohort would be needed to confirm this observation, and to determine whether quantification of this microRNA expression in the tumor could be used to steer patients with poor predicted prognosis toward alternative chemotherapies.

We also showed that patients with poor predicted prognoses calculated by this model presented higher expression of miR-210, miR-503-5p and *BRCAl* mRNA. Indeed, high miR-210 expression has already been reported by other teams to be correlated with relapse and short survival [19, 34]. miR-503-5p was already emphasized in our previous work: this microRNA is highly expressed in endothelial cells and, can be secreted in exosomes and transferred into breast cancer cell lines to inhibit tumor growth by targeting CCND2 and CCND3 [35]. Moreover, neoadjuvant chemotherapy for breast cancer leads to increased plasma levels of miR-503, as also observed for miR-34a, which could be implicated in the anti-tumor effects of chemotherapy in breast cancer patients [35, 36]. Concerning the higher expression of *BRCAl* mRNA observed in the poor-prognosis tumors, we could hypothesize that patients expressing high levels of *BRCAl* would present a lower response to

chemotherapy because TNBC *BRCA1* mutated patients are known to respond better to chemotherapy [37].

MiR-484 was reported by Dvinge *et al.* as a good potential housekeeping microRNA in breast cancer because its expression was homogenous among samples in all breast cancers subtypes [27]. However, Cox univariate analysis showed that high miR-484 expression was associated with a bad prognosis in our TNBC cohort. Volinia *et al.* also reported such an association [18]. In a high-throughput study aiming at better defining miRNA-mRNA interaction, *BRCA1* was identified as interacting with miR-484. However, we did not observed any inverse correlation between those two parameters. Although, miR-484 expression was strongly associated with two other poor-prognosis miRNAs: miR-205 (Rho Spearman : 0.4, p-val :0.003) and miR-93 (Rho Spearman : 0.52, p-val=0.0001), the Diana MiRPath database did not present any experimentally demonstrated common target gene of the 3 miRNAs [38].

I.7. Conclusions

BRCA1 was expressed in a spatially heterogeneous manner in TNBC, making very difficult any study correlating its expression or activity with prognosis. However, this study emphasized miR-548c-5p tumoral expression as a new independent prognostic factor that could improve the performance of relapse prediction models based on node invasion, tumor size and cytokeratin 5 and 6 expression status.

Competing interests

The authors declare that they have no competing of interests.

Authors' contributions

Conception and design: MB, CJ, GJ, and VB ; Development and methodology: MB, CJ, GJ, and VB; Acquisition of data: MB, CJ, SE, BB, PF, RM, KS, and JC; Analysis and interpretation of data: MB, CJ, SE, KS, and SW ; Writing, review and revision of the manuscript: MB, CJ, GJ, and VB ; Study Supervision: MB, CJ, GJ, and VB. All authors read and approved the final manuscript

Acknowledgments

We first thank the patients. We also thank the Biobanque of Liège University Hospital, the GIGA-Immunohistology platform, the GIGA-Bioinformatics platform, and the GIGA-Imaging platform. We thank also Hélène Schroeder, Corinne Fasquelle, Fabienne Perin,

Ingrid Struman, Philippe Delvenne, Christophe Poulet, Amaury Bynens, Gustavo Moraes, Laurent Schoysman, Jérôme Kroonen, Jérôme Thiry and Tiberio Sticca. We thanks American Journal Expert for language revision.

Funding was obtained from the following institutions: Fonds de la Recherche Scientifique : Télévie (MB), Projet de recherche fundings (SW) and Candidat Spécialiste Doctorant (PF) ; Centre-Anti-Cancéreux (MB); Fond d'Investissement à la recherche Scientifique du Centre Universitaire Hospitalier de Liège (manuscript preparation); Région Wallonne (CJ); Belgian Foundation against Cancer (CJ; BB and manuscript preparation); and the Fonds européen de développement économique et régional (RM).

References.

1. Turner N, Tutt A, Ashworth A: **Hallmarks of “BRCAness” in sporadic cancers.** *Nat Rev Cancer* 2004, **4**(October):814–819.
2. von Minckwitz G, Schneeweiss A, Loibl S, Salat C, Denkert C, Rezai M, Blohmer JU, Jackisch C, Paepke S, Gerber B, Zahm DM, Kümmel S, Eidtmann H, Klare P, Huober J, Costa S, Tesch H, Hanusch C, Hilfrich J, Khandan F, Fasching PA, Sinn B V, Engels K, Mehta K, Nekljudova V, Untch M: **Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial.** *Lancet Oncol* 2014, **15**:747–56.
3. Byrski T, Huzarski T, Dent R, Marczyk E, Jasiowka M, Gronwald J, Jakubowicz J, Cybulski C, Wisniowski R, Godlewski D, Lubinski J, Narod S a.: **Pathologic complete response to neoadjuvant cisplatin in BRCA1-positive breast cancer patients.** *Breast Cancer Res Treat* 2014, **147**:401–405.
4. Sikov WM, Berry DA, Perou CM, Singh B, Cirrincione CT, Tolaney SM, Kuzma CS, Pluard TJ, Somlo G, Port ER, Golshan M, Bellon JR, Collyar D, Hahn OM, Carey LA, Hudis CA, Winer EP: **Impact of the Addition of Carboplatin and/or Bevacizumab to Neoadjuvant Once-per-Week Paclitaxel Followed by Dose-Dense Doxorubicin and Cyclophosphamide on Pathologic Complete Response Rates in Stage II to III Triple-Negative Breast Cancer: CALGB 40603 (A.** *J Clin Oncol* 2015, **33**:13–21.
5. Tutt A, Robson M, Garber JE, Domchek SM, Audeh MW, Weitzel JN, Friedlander M, Arun B, Loman N, Schmutzler RK, Wardley A, Mitchell G, Earl H, Wickens M, Carmichael J: **Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial.** *Lancet* 2010, **376**:235–44.
6. Scott CL, Swisher EM, Kaufmann SH: **Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors: recent advances and future development.** *J Clin Oncol* 2015, **33**:1397–406.
7. Osorio A, de la Hoya M, Rodríguez-López R, Martínez-Ramírez A, Cazorla A, Granizo JJ, Esteller M, Rivas C, Caldés T, Benítez J: **Loss of heterozygosity analysis at the BRCA loci in tumor samples from patients with familial breast cancer.** *Int J Cancer* 2002, **99**:305–9.
8. Cornelis RS, Neuhausen SL, Johansson O, Arason A, Kelsell D, Ponder BA, Tonin P, Hamann U, Lindblom A, Lalle P: **High allele loss rates at 17q12-q21 in breast and ovarian**

tumors from BRCA1-linked families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Genes Chromosomes Cancer* 1995, 13:203–210.

9. Norquist B, Wurz KA, Pennil CC, Garcia R, Gross J, Sakai W, Karlan BY, Taniguchi T, Swisher EM: **Secondary somatic mutations restoring BRCA1/2 predict chemotherapy resistance in hereditary ovarian carcinomas. *J Clin Oncol* 2011, 29:3008–15.**

10. Barber LJ, Sandhu S, Chen L, Campbell J, Kozarewa I, Fenwick K, Assiotis I, Rodrigues DN, Reis Filho JS, Moreno V, Mateo J, Molife LR, De Bono J, Kaye S, Lord CJ, Ashworth A: **Secondary mutations in BRCA2 associated with clinical resistance to a PARP inhibitor. *J Pathol* 2013, 229:422–9.**

11. Veeck J, Ropero S, Setien F, Gonzalez-Suarez E, Osorio A, Benitez J, Herman JG, Esteller M: **BRCA1 CpG island hypermethylation predicts sensitivity to poly(adenosine diphosphate)-ribose polymerase inhibitors. *J Clin Oncol* 2010, 28:e563–4; author reply e565–6.**

12. Tan X, Peng J, Fu Y, An S, Rezaei K, Tabbara S, Teal CB, Man Y, Brem RF, Fu SW: **miR-638 mediated regulation of BRCA1 affects DNA repair and sensitivity to UV and cisplatin in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res* 2014, 16:435.**

13. Jasinski-Bergner S, Mandelboim O, Seliger B: **The Role of MicroRNAs in the Control of Innate Immune Response in Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst* 2014, 106:dju257–dju257.**

14. Shah NR, Chen H: **MicroRNAs in pathogenesis of breast cancer: Implications in diagnosis and treatment. *World J Clin Oncol* 2014, 5:48–60.**

15. Pogribny IP, Filkowski JN, Tryndyak VP, Golubov A, Shpyleva SI, Kovalchuk O: **Alterations of microRNAs and their targets are associated with acquired resistance of MCF-7 breast cancer cells to cisplatin. *Int J Cancer* 2010, 127:1785–94.**

16. Cascione L, Gasparini P, Lovat F, Carasi S, Pulvirenti A, Ferro A, Alder H, He G, Vecchione A, Croce CM, Shapiro CL, Huebner K: **Integrated microRNA and mRNA signatures associated with survival in triple negative breast cancer. *PLoS One* 2013, 8:e55910.**

17. Buffa FM, Camps C, Winchester L, Snell CE, Gee HE, Sheldon H, Taylor M, Harris AL, Ragoussis J: **microRNA-associated progression pathways and potential therapeutic targets identified by integrated mRNA and microRNA expression profiling in breast**

cancer. *Cancer Res* 2011, **71**:5635–45.

18. Volinia S, Croce CM: **Prognostic microRNA/mRNA signature from the integrated analysis of patients with invasive breast cancer.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**:7413–7.

19. Garcia AI, Buisson M, Bertrand P, Rimokh R, Rouleau E, Lopez BS, Lidereau R, Mikaélian I, Mazoyer S: **Down-regulation of BRCA1 expression by miR-146a and miR-146b-5p in triple negative sporadic breast cancers.** *EMBO Mol Med* 2011, **3**:279–90.

20. Kumaraswamy E, Wendt KL, Augustine L a, Stecklein SR, Sibala EC, Li D, Gunewardena S, Jensen R a: **BRCA1 regulation of epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in human breast cancer cells involves microRNA-146a and is critical for its tumor suppressor function.** *Oncogene* 2014(May 2013):1–14.

21. Kawai S, Amano A: **BRCA1 regulates microRNA biogenesis via the DROSHA microprocessor complex.** *J Cell Biol* 2012, **197**:201–8.

22. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM: **REporting recommendations for tumor MARKer prognostic studies (REMARK).** *Breast Cancer Res Treat* 2006, **100**:229–235.

23. van Beers EH, Joosse S a, Ligtenberg MJ, Fles R, Hogervorst FBL, Verhoef S, Nederlof PM: **A multiplex PCR predictor for aCGH success of FFPE samples.** *Br J Cancer* 2006, **94**:333–7.

24. Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, Bussaglia E, Prat J, Harkes IC, Repasky E a, Gabrielson E, Schutte M, Baylin SB, Herman JG: **Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors.** *J Natl Cancer Inst* 2000, **92**:564–9.

25. Boukerroucha M, Josse C, Segers K, El-Guendi S, Frères P, Jerusalem G, Bours V: **BRCA1 germline mutation and glioblastoma development: report of cases.** *BMC Cancer* 2015, **15**:181.

26. Marée R, Stévens B, Rollus L, Rocks N, Lopez X, Salmon I, Cataldo D, Wehenkel L: **A rich internet application for remote visualization and collaborative annotation of digital slides in histology and cytology.** *Diagn Pathol* 2013, **8**(Suppl 1):S26.

27. Dvinge H, Git A, Gräf S, Salmon-Divon M, Curtis C, Sottoriva A, Zhao Y, Hirst M,

Armisen J, Miska E a, Chin S-F, Provenzano E, Turashvili G, Green A, Ellis I, Aparicio S, Caldas C: **The shaping and functional consequences of the microRNA landscape in breast cancer.** *Nature* 2013, **497**:378–82.

28. Al-Mulla F, Abdulrahman M, Varadharaj G, Akhter N, Anim JT: **BRCA1 gene expression in breast cancer: a correlative study between real-time RT-PCR and immunohistochemistry.** *J Histochem Cytochem* 2005, **53**:621–9.

29. Pérez-Vallés a, Martorell-Cebollada M, Nogueira-Vázquez E, García-García J a, Fuster-Diana E: **The usefulness of antibodies to the BRCA1 protein in detecting the mutated BRCA1 gene. An immunohistochemical study.** *J Clin Pathol* 2001, **54**:476–480.

30. Lips EH, Laddach N, Savola SP, Vollebergh M a, Oonk AMM, Imholz ALT, Wessels LF a, Wesseling J, Nederlof PM, Rodenhuis S: **Quantitative copy number analysis by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) of BRCA1-associated breast cancer regions identifies BRCAness.** *Breast Cancer Res* 2011, **13**:R107.

31. Erturk E, Cecener G, Tezcan G, Egeli U, Tunca B, Gokgoz S, Tolunay S, Tasdelen I: **BRCA mutations cause reduction in miR-200c expression in triple negative breast cancer.** *Gene* 2015, **556**:163–9.

32. Liang T, Guo L, Liu C: **Genome-wide analysis of mir-548 gene family reveals evolutionary and functional implications.** *J Biomed Biotechnol* 2012, **2012**:679563.

33. Piriyaongsa J, Jordan IK: **A family of human microRNA genes from miniature inverted-repeat transposable elements.** *PLoS One* 2007, **2**:e203.

34. Li Y, Ma X, Zhao J, Zhang B, Jing Z, Liu L: **microRNA-210 as a prognostic factor in patients with breast cancer: meta-analysis.** *Cancer Biomark* 2013, **13**:471–81.

35. Bovy N, Blomme B, Frères P, Dederen S, Nivelles O, Lion M, Carnet O, Martial JA, Noël A, Thiry M, Jérusalem G, Josse C, Bours V, Tabruyn SP, Struman I: **Endothelial exosomes contribute to the antitumor response during breast cancer neoadjuvant chemotherapy via microRNA transfer.** *Oncotarget* 2015, **6**:10253–66.

36. Frères P, Josse C, Bovy N, Boukerroucha M, Struman I, Bours V, Jerusalem G: **Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients Induces miR-34a and miR-122 Expression.** *J Cell Physiol* 2015, **230**:473–481.

37. Lips EH, Mulder L, Oonk A, van der Kolk LE, Hogervorst FBL, Imholz a LT, Wesseling

J, Rodenhuis S, Nederlof PM: **Triple-negative breast cancer: BRCAness and concordance of clinical features with BRCA1-mutation carriers.** *Br J Cancer* 2013, **108**:2172–2177.

38. Vlachos IS, Kostoulas N, Vergoulis T, Georgakilas G, Reczko M, Maragkakis M, Paraskevopoulou MD, Prionidis K, Dalamagas T, Hatzigeorgiou AG: **DIANA miRPath v.2.0: investigating the combinatorial effect of microRNAs in pathways.** *Nucleic Acids Res* 2012, **40**(Web Server issue):W498–504.

39. Li JH, Liu S, Zhou H, Qu LH, Yang JH: **StarBase v2.0: Decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data.** *Nucleic Acids Res* 2014, **42**:92–97.

**II. Les mutations germinales BRCA1 et le
développement du glioblastome : rapport de deux
cas.**

(BMC Cancer, 2015)

II.1. Résumé

BRCA1 est le premier gène identifié dans les cancers du sein et de l'ovaire. Les mutations germinales dans ce gène sont associées à un risque cumulé de 50 à 70% de développer des cancers du sein. De par sa fonction dans la réparation de l'ADN et le contrôle du cycle cellulaire, l'absence ou la réduction de l'expression de la protéine résulte en une instabilité génique cellulaire importante et de nombreux réarrangements chromosomiques. Cette réduction ou absence d'expression peut être due à des mutations germinales ou somatiques ou encore à des régulations épigénétiques telle que la méthylation.

BRCA1 est étroitement associée aux cancers du sein et de l'ovaire mais aucune association avec les glioblastomes n'a été démontrée. Quelques cas ont été rapportés dans la littérature sans analyse moléculaire de la protéine et de l'ARNm BRCA1 *in situ*.

Nous avons rapporté deux cas de patientes présentant une mutation germinale dans le gène BRCA1 et plus précisément dans l'exon 11 (le plus grand exon). Les deux patientes ont développé un cancer du sein de type triple négatif (TN). Quelques années plus tard, elles ont développé un glioblastome (GBM) et un deuxième cancer du sein.

Dans le but de vérifier l'éventuelle association de BRCA1 au glioblastome, nous avons réalisé des expériences *in situ* pour vérifier l'expression de l'ARNm et de la protéine BRCA1 dans les deux types de tumeurs (cancer du sein TN et GBM) pour les deux patientes. De plus, le statut de méthylation du promoteur BRCA1 a été vérifié par PCR méthylation spécifique.

Nos deux patientes présentent une expression BRCA1 (protéine et ARNm) maintenue dans la tumeur gliale mais fortement réduite dans la tumeur TN. Ceci est en accord avec le statut de méthylation du promoteur BRCA1 qui présente un promoteur non méthylé dans la tumeur gliale et méthylé dans la tumeur TN.

Nos résultats suggèrent une absence d'association entre les mutations BRCA1 et le développement du glioblastome.

BRCA1 germline mutation and glioblastoma development: report of cases.

Meriem Boukerroucha¹, Claire Josse^{1,2}, Karin Segers³, Sonia El-Guendi¹, Pierre Frères², Guy Jerusalem² and Vincent Bours^{1,3}.

Institutional addresses:

¹ University of Liège, GIGA-Cancer Research, Human Genetics Unit, Liège, Belgium

² Liège University and CHU Sart Tilman Liège, Division of Medical Oncology, Liège, Belgium

³ Liège University Hospital, Human Genetics Department, Liège, Belgium

Keywords:

BRCA1, glioblastoma, breast cancer.

II.2. Abstract

Background:

Germline mutations in breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) increase the risk of breast and ovarian cancers. However, no association between BRCA1 germline mutation and glioblastoma malignancy has ever been highlighted.

Here we report two cases of BRCA1 mutated patients who developed a glioblastoma (GBM).

Clinical cases:

Two patients diagnosed with triple negative breast cancer (TNBC) were screened for BRCA1 germline mutation. They both carried a pathogenic mutation introducing a premature STOP codon in the exon 11 of the BRCA1 gene. Few years later, both patients developed a glioblastoma and a second breast cancer. In an attempt to clarify the role played by a mutated BRCA1 allele in the GBM development, we investigated the BRCA1 mRNA and protein expression in breast and glioblastoma tumours for both patients. The promoter methylation status of this gene was also tested by methylation specific PCR as BRCA1 expression is also known to be lost by this mechanism in some sporadic breast cancers.

Conclusion:

Our data show that BRCA1 expression is maintained in glioblastoma at the protein and the mRNA levels, suggesting that loss of heterozygosity (LOH) did not occur in these cases. The protein expression is tenfold higher in the glioblastoma of patient 1 than in her first breast

carcinoma, and twice higher in patient 2. In agreement with the high protein expression level in the GBM, BRCA1 promoter methylation was not observed in these tumours.

In these two cases, despite of a BRCA1 pathogenic germline mutation, the tumour-suppressor protein expression is maintained in GBM, suggesting that the BRCA1 mutation is not instrumental for the GBM development.

II.3. Introduction

Breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) is the first tumour suppressor gene identified in familial breast cancer. Located on chromosome 17 (17q21), this gene encodes a multifunctional protein involved in several cellular processes such as DNA repair, chromatin remodelling and cell cycle regulation [1]. Several studies reported that germline mutations in BRCA1 gene increase the risk to develop breast and ovarian cancers [1, 2]. Indeed, women bearing pathogenic germline BRCA1 mutations have a 45% to 80% risk to develop breast cancer by age 70, and 36% to 66% for ovarian cancer [3]. BRCA1 somatic mutations are very rare but its promoter methylation is reported to occur in about 7% to 30% of breast and ovarian sporadic cancers [4, 5]. However, there is no association between BRCA1 gene and glioblastoma multiforme (GBM). Indeed, Elmariah *et al.* reported the case of a patient mutated for BRCA1 who developed glioblastoma but they did not investigate BRCA1 mRNA and protein expression in the GBM [6]. Piccirilli *et al.* have also studied 11 cases of GBM occurring after mammary carcinoma, but their genomic status concerning BRCA1 was unknown [7].

Here, we report two cases of patients with BRCA1 germline mutation treated for breast cancer who developed glioblastoma few years after breast cancer diagnosis. The first patient had a triple negative breast cancer (TNBC) and six years later, a glioblastoma multiforme. In a very similar pattern, the second patient developed also a triple negative breast cancer and five years later a glioblastoma. In an attempt to clarify the role played by a mutated BRCA1 allele in the GBM development, we assessed BRCA1 mRNA and protein expression in the two tumour types for each patient. We also checked the BRCA1 promoter methylation status.

II.4. Ethic statement

Ethical approval was obtained from the local institutional ethical board (Comité d'éthique hospitalo-facultaire universitaire de Liège) in compliance with the Helsinki declaration, with the approval file number n°2010/229. Both patients had signed informed consent to participate to the study and patients's parent had signed consent for data publication.

II.5. Cases description

Patient 1 :

A 28-years-old woman was diagnosed in 2000 with a ductal carcinoma of the left breast.

After radical mastectomy, histologic analysis revealed a 20 mm tumour with an infiltrating ductal carcinoma. Immunologic analysis demonstrated no expression of oestrogen and progesterone receptors (ER- and PR-) and no overexpression of HER2.

The patient was staged as T1N0M0 stage IA and received FEC adjuvant chemotherapy (FEC: Fluorouracil, Epirubicin, Cyclophosphamide). The proliferation marker Ki67 was expressed by 50% of the tumour cells.

Six years later, the patient developed a glioblastoma. After complete surgical resection, the tumour was characterized as stage IV according to the WHO classification. The proliferative marker Ki67 was expressed by 40% of the tumour cells. The patient received temozolomide chemotherapy and radiotherapy followed by chemotherapy alone (6 cycles).

Two years after her diagnosis of GBM, she developed a carcinoma in the right breast. After mastectomy, the histologic and immunologic analysis of the 26 mm tumour revealed an infiltrating ductal carcinoma, negative for oestrogen and progesterone receptors but with HER2 gene amplification. The patient was staged as T2N0M0 stage IIA and received adjuvant chemotherapy targeted therapy (docetaxel and trastuzumab) for one year.

She died in 2012 after two relapses of the GBM.

BRCA1 genetic testing was performed after the first breast cancer. The family tree is represented in figure 1.A.

Patient 2 :

A 56-years-old woman was diagnosed in 2005 with a ductal carcinoma in the left breast. After mastectomy, histological analysis revealed a 20 mm tumour with an infiltrating ductal carcinoma. Immunologic analysis demonstrated absence of hormone receptors expression (ER-, PR-) as well as absence of HER2 overexpression. Lymph nodes were not infiltrated. The tumour was classified as T2N0Mx stage IIA. The patient was treated with 6 cures of FEC chemotherapy. She developed metastases at the level of cervical and dorsal vertebra and received palliative chemotherapy (paclitaxel) and zoledronic acid.

Considering the family history of the patient (Fig.1B) and after molecular analysis of BRCA1 gene, the patient was subjected to oophorectomy and hysterectomy.

Five years later, the patient developed a second breast carcinoma in the right breast. After mastectomy, histologic analysis revealed an 40 mm *in situ* ductal carcinoma associated with a 2 mm infiltrating ductal carcinoma and the absence of sentinel lymph node infiltration. Immunologic analysis of the invasive carcinoma demonstrated the absence of hormone receptors expression and an absence of HER2 protein overexpression. The invasive tumour was classified as pT1aN0Mx with a proliferative index based on Ki67 expression of 35%.

Few days after tumour resection, the patient presented mental confusion and a brain scan showed a mass at the fronto-insular level. After surgical excision, the histologic analysis revealed a glioblastoma characterized as stage IV according to the WHO classification. The patient received temozolomide chemotherapy and radiotherapy. One year later, the patient had surgical resection of progressive glioblastoma.

She died in 2011.

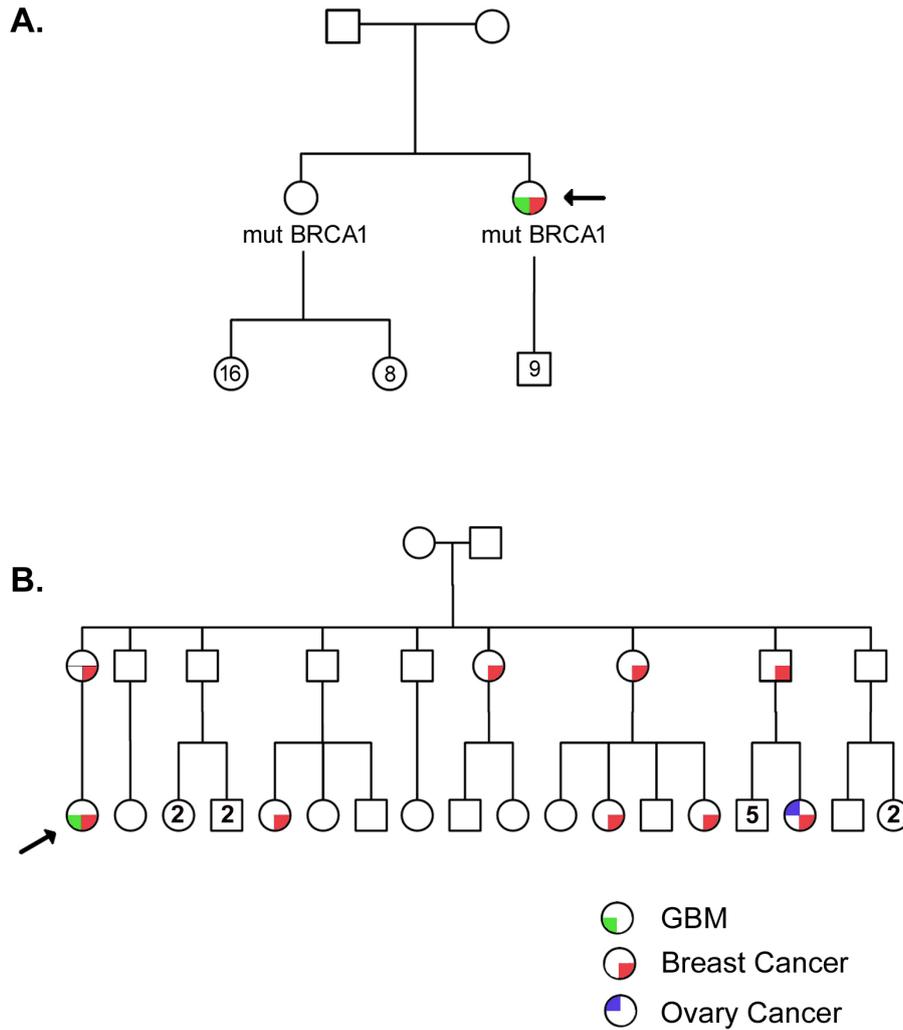


Figure 1: Family trees of the patients. A. Patient 1 (arrow) B. Patient 2 (arrow). Cancer affected individuals are indicated.

II.6. Molecular analysis

II.6.1. DNA isolation

Tumour determined by a pathologist was manually micro-dissected from FFPE tissues. DNA was isolated from the first triple negative breast carcinoma and from the GBM in the two patients.

Blood samples were also collected in both patients to establish the BRCA1 genomic status, after genetic counselling. Genomic DNA from leucocytes was extracted by standard phenol procedure.

II.6.2. BRCA1 gene analysis

All coding exons of BRCA 1 gene were subjected to PCR amplification. Amplicons were denatured, heteroduplexed and evaluated for the presence of mutations by Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) using product-specific melting and solvent conditions. All amplicons showing abnormal DHPLC pattern were sequenced by Sanger sequencing using ABI 3130 and following manufacturer recommendations. The reference sequence BRCA1 (NM_007294.3) has been used for HGVS-approved amino acid numbering. The following pathogenic mutations were founded by this method:

Patient 1: c.3481_3491del (p.Glu1161Phefs*3). This deletion of 11 bp leads to a frame-shift and premature Stop codon. This mutation has been previously identified in our population.

Patient 2: c.2722G>T (p.Glu908*). This mutation induces a premature Stop codon and is frequently identified in our Belgian population (11% of our BRCA1 mutations).

These mutations were confirmed on independent samples by direct Sanger sequencing.

Moreover, the screening for large genomic rearrangement was performed using Multiplex ligation dependent probe amplification MLPA kits P002-C2 (MRC Holland) on the BRCA1 gene region. This experiment did not highlight any abnormal genomic copy number change.

In attempt to identify LOH, screening for the BRCA1 mutation has been performed by Sanger sequencing on DNA extracted from cerebral tumours of the two patients. However, the DNA quality obtained from GBM of patient 1 did not allow the amplification of the target region and the subsequent BRCA1 sequencing. Regarding patient 2, the BRCA1 mutation was identified in heterozygous status, suggesting that no loss of heterozygosity occurred.

II.6.3. BRCA1 and O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) methylation status

The methylation status of BRCA1 and MGMT promoter was assessed by methylation specific polymerase chain reaction (MSP-PCR) as previously described [8, 9].

DNA extracted from tumours was first treated by sodium bisulfite using the EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research) following manufacturer recommendations. MSP-PCR was done following the protocol of Esteller *et al.* [10].

We assessed the methylation status of BRCA1 promoter in the TN and GBM tumours for the two patients. A methylation was observed in TN tumour but not in GBM tumour for patient 1

as shown in Figure 2A. Regarding patient 2, the BRCA1 promoter was unmethylated in both tumours (Fig. 2B).

On the other hand, the MGMT promoter was methylated in GBM of both patients (Data not shown).

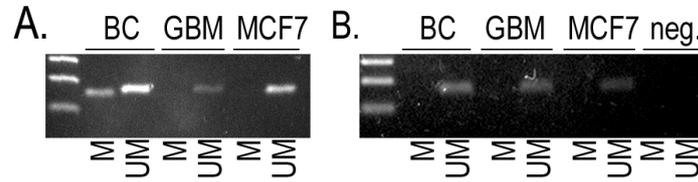


Figure 2: Methylation status of BRCA1 promoter in tumours. A Patient 1. B Patient 2. M = methylated, UM = unmethylated, BC = breast cancer tissue, GBM = glioblastoma tissue, MCF7 = MCF-7 breast cancer cell line known to have unmethylated BRCA1 promoter.

II.6.4. *BRCA1* mRNA expression

The mRNA expression was assessed by *in situ* hybridization using RNA scope technology (ACD) for FFPE samples. In this experiment, the target probes are designed as double-Z as described by Fay Wang *et al.* [11]. The BRCA1 probe is complementary to region aa369-1482, spanning exon 5 to exon 11. To quantify the expression, spots and cells were independently and blindly counted twice, in subzones of the tumour. The ratio between the number of spots and the number of cells was compared to those of a positive control (MCF-7 cell line).

The mRNA expression level was 8% in GBM and 17,7% in breast carcinoma of patient 1.

Regarding patient 2, the mRNA expression level was 10,24% in breast tumour and 12,67% in GBM tumour. Representative images of the BRCA1 mRNA expression in breast tumour and in GBM of both patients are represented in Figure 3.

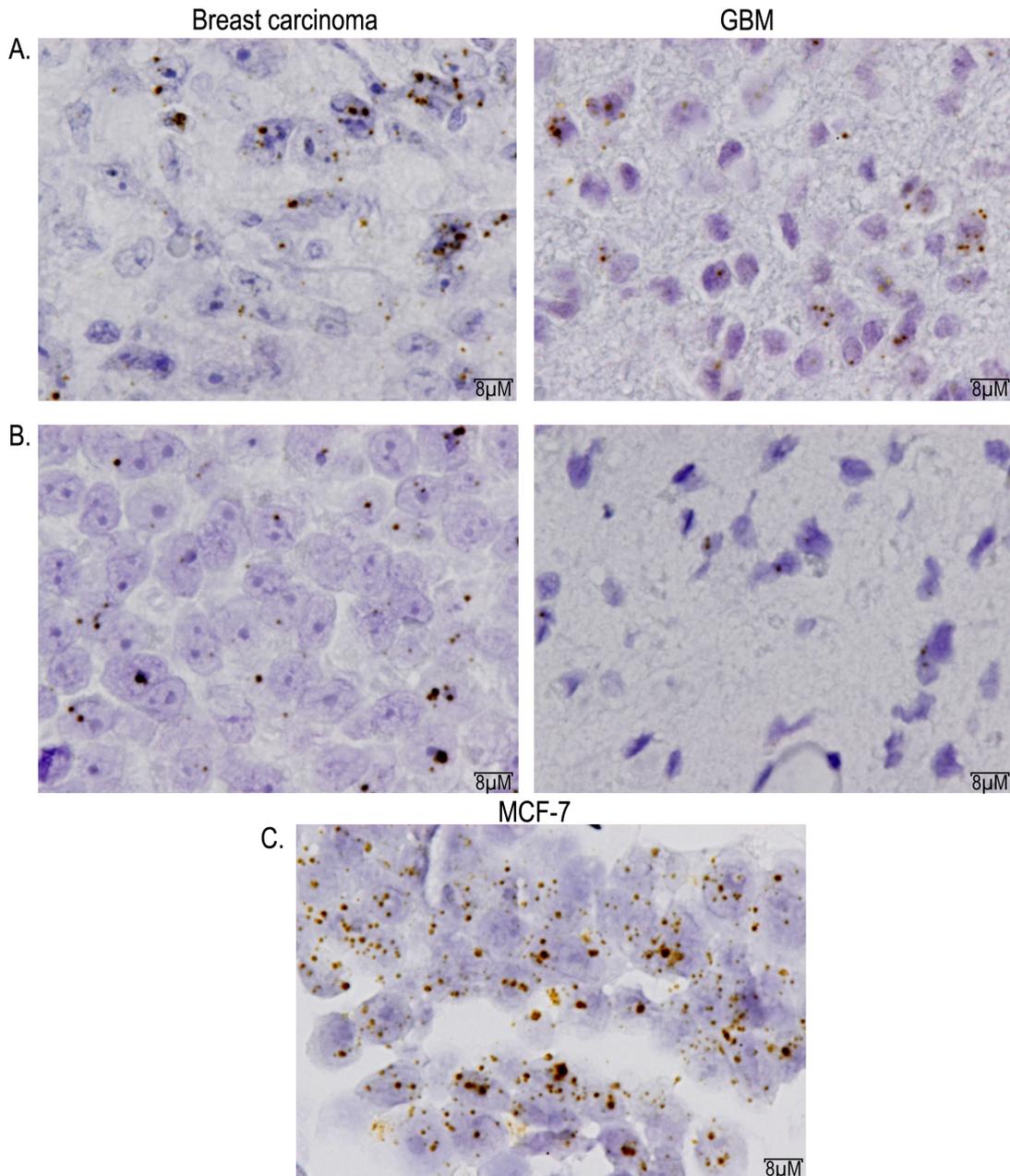


Figure 3: BRCA1 mRNA expression by *in situ* hybridization. A. Patient 1. Left : breast tumour; Right : GBM. B. Patient 2. Left : breast tumour; Right : GBM. C. Positive control : MCF7 cells.

II.6.5. BRCA1 protein expression

The protein level expression was assessed by proximity ligation assay (Duolink in situ detection reagents – Sigma). This assay is more specific than the conventional immunohistochemistry thanks to the use of two primary antibodies directed against two epitopes of the same protein. The primary antibodies are raised in different species and are

recognized by two secondary antibodies coupled with oligonucleotide probes. After ligation of the two probes, the circular DNA is amplified by polymerase reaction. The detection is performed using horse radish peroxidase (HRP) labelled probes and a chromogenic reaction using 3,3'Diaminobenzidine (DAB). In order to generate a signal only with the full length BRCA1 protein, the two primary antibodies were chosen to be specific to the N-term ([MS110] ab16780, Abcam) and C-term domain (Sigma, SAB4502848) of the BRCA1 protein, respectively.

The protein expression level was estimated using the same quantification method as for mRNA expression level, as compared to MCF7 cells.

The protein expression level was 45,86 % in GBM and 4,08% in breast tumour of patient 1 and 36,37% in GBM and 19,04 % in breast tumour of patient 2. Representative images of the BRCA1 protein expression in GBM of both patients are represented in figure 4.

Promoter methylation, mRNA expression and protein expression levels of BRCA1 are summarized in Table 1.

	Breast carcinoma			Glioblastoma		
	BRCA1 promoteur methylation	BRCA1 mRNA (%MCF7)	BRCA1 protein (%MCF7)	BRCA1 promoteur methylation	BRCA1 mRNA (%MCF7)	BRCA1 protein (%MCF7)
Patient 1	Yes	18	4	No	8	46
Patient 2	No	10	19	No	13	36

Table 1: Summary of BRCA1 molecular analysis

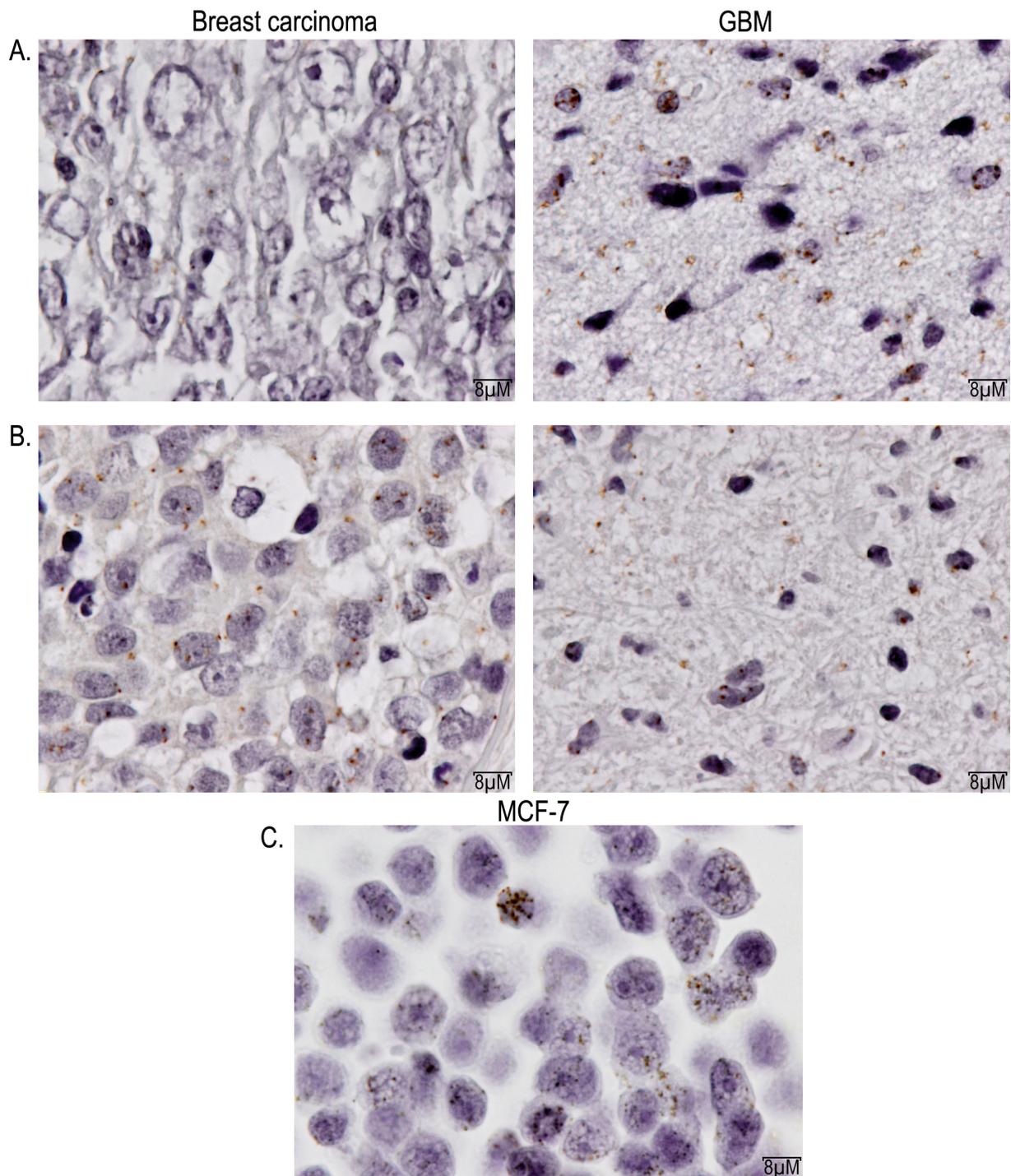


Figure 4: BRCA1 protein expression by proximity ligation assay. A. Patient 1. Left : breast tumour; Right : GBM. B. Patient 2. Left : breast tumour; Right: GBM. C. Positive control : MCF7 cells.

II.7. Discussion

Here, we report the cases of two patients, with a germline BRCA1 mutation, who developed two primary breast cancers and a GBM. Both women present a germline pathogenic heterozygote mutation in the exon 11 of the BRCA1 gene, leading to a truncated transcript.

In 80% of BRCA1 breast carcinoma the protein expression is lost because of the deletion of the second allele [12, 13]. Few cases of glioblastoma in BRCA1 mutation carriers were reported but the BRCA1 expression status has never been studied.

In an attempt to clarify the role played by a BRCA1 mutation in GBM development, we performed diverse molecular experiments to characterize the expression status of BRCA1 in glioblastoma, and in the first TN breast cancer of the two patients.

Our data show that the BRCA1 protein expression is maintained in glioblastoma suggesting that no loss of heterozygosity occurred in these tumours. The sequencing data of the tumoural BRCA1 gene in the GBM of patient 2 support this hypothesis. The protein expression is tenfold higher in the glioblastoma of patient 1 than in her breast carcinoma, and twice higher in patient 2. However, the BRCA1 expression level was never completely lost, even in the TNBC. This observation is in concordance with what is observed in breast cancer cell lines where BRCA1 is mutated (HCC1937) or its promoter methylated (UACC3199) [14, 15].

BRCA1 expression is also known to be lost in some sporadic breast cancers after methylation of the gene promoter (13% of cases) [9, 16], but promoter methylation is rarely observed in tumours of BRCA1 mutation carriers [17]. However, we observed BRCA1 promoter methylation in the triple negative breast carcinoma of patient 1, but not in glioblastoma. In agreement with the high protein expression level in the GBM, patient 2 did not present any BRCA1 promoter methylation in this tumour. Therefore, in these two cases, despite of a BRCA1 pathogenic germline mutation, the tumour-suppressor protein expression is maintained in GBM, suggesting that the BRCA1 mutation is not instrumental for GBM development. This observation is consistent with cancer statistics that have not highlighted any increased risk for brain tumour development in BRCA1 carriers [18, 19]. However, the work of Konishi *et al.* has demonstrated that a heterozygous mutation of BRCA1 without loss of the wild type allele can still induce genome instability [20]. Thus, conserved BRCA1 protein expression in glioblastoma does not completely rule out its role in GBM development. Another way to establish a relation between the BRCA1 mutation and the GBM development would be to estimate the difference between the observed incidence of cases and the theoretical occurrence risk of both events. In our European population and during the last 10

years of BRCA1 mutation screening, approximately between 2 and 8 cases associating BRCA1 mutation and GBM for 100 million women are expected [21–23], but only three cases have been reported in the literature (two in Europe in the same centre and one in United States). Moreover, we are not aware of any case of GBM in males with BRCA1 mutation.

II.8. Conclusion

Our study failed to establish any biological link between GBM and BRCA1 mutation but further genotype/phenotype studies might be needed to finally demonstrate or exclude any relation. Finally, it is possible to imagine that phenotype specificities could be linked with an increased risk of unusual cancers in BRCA1 mutated patients. Indeed our two patients had mutations generating truncated proteins. Moreover, they both developed bilateral breast cancers. Large studies are required to verify whether complete loss of function BRCA1 mutations or interactions with other genes could be specifically associated with increased risk of rare cancers.

Competing interests:

The authors declare that they have no competing interests.

Author's contributions:

MB carried out the molecular analysis, participated in the design of the study and drafted the manuscript. CJ participated in the design of the study and the writing of the manuscript. KS performed some molecular analysis and participated in the writing of the manuscript. SE performed some molecular analysis. PF collected clinical data. VB and GJ conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript.

Author's information and funding:

MB is funded by Télévie-FRS-FNRS. SE is funded by FRIA-FNRS. PF is funded by FRS-FNRS. This work was supported by the F.I.R.S.-CHU; Belgian Funds for Scientific Research (F.R.S.-FNRS) ; Centre anti-Cancéreux ; PPP grant from Région Wallonne and F.R.S.-FNRS-Télévie.

Acknowledgments:

We first thank the patients and their family. We also thank the Biobanque of Liège University Hospital, the GIGA-immunohistology platform, the GIGA-Bioinformatic platform, and the GIGA-Imaging platform. We thank Dr Joelle Collignon, Dr Hélène Schroeder, Bouchra Boujemla, Jerome Thiry, Corinne Fasquelle, Fabienne Perin, Tiberio Sticca and Stéphane Wenric

References:

1. Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC: **Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21.** *Science* 1990, **250**:1684–9.
2. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W: **A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1.** *Science* 1994, **266**:66–71.
3. Satagopan JM, Offit K, Foulkes W, Robson ME, Wacholder S, Eng CM, Karp SE, Begg CB: **The lifetime risks of breast cancer in Ashkenazi Jewish carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001, **10**:467–73.
4. Catteau A, Morris JR: **BRCA1 methylation: a significant role in tumour development?** *Semin Cancer Biol* 2002, **12**:359–371.
5. Wei M, Grushko TA, Dignam J, Hagos F, Nanda R, Sveen L, Xu J, Fackenthal J, Tretiakova M, Das S, Olopade OI: **BRCA1 promoter methylation in sporadic breast cancer is associated with reduced BRCA1 copy number and chromosome 17 aneusomy.** *Cancer Res* 2005, **65**:10692–9.
6. Elmariah SB, Huse J, Mason B, Leroux P, Lustig R a: **Multicentric glioblastoma multiforme in a patient with BRCA-1 invasive breast cancer.** *Breast J* 2006, **12**:470–4.
7. Piccirilli M, Salvati M, Bistazzoni S, Frati A, Brogna C, Giangaspero F, Frati R, Santoro A: **Glioblastoma multiforme and breast cancer: report on 11 cases and clinico-pathological remarks.** *Tumori* 2005, **91**:256–60.
8. Rice JC, Massey-Brown KS, Futscher BW: **Aberrant methylation of the BRCA1 CpG island promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA in sporadic breast cancer cells.** *Oncogene* 1998, **17**:1807–12.
9. Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, Bussaglia E, Prat J, Harkes IC, Repasky E a, Gabrielson E, Schutte M, Baylin SB, Herman JG: **Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors.** *J Natl Cancer Inst* 2000, **92**:564–9.

10. Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG: **Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia.** *Cancer Res* 1999, **59**:793–7.
11. Wang F, Flanagan J, Su N, Wang L-C, Bui S, Nielson A, Wu X, Vo H-T, Ma X-J, Luo Y: **RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues.** *J Mol Diagn* 2012, **14**:22–9.
12. Cornelis RS, Neuhausen SL, Johansson O, Arason A, Kelsell D, Ponder BA, Tonin P, Hamann U, Lindblom A, Lalle P: **High allele loss rates at 17q12-q21 in breast and ovarian tumors from BRCA1-linked families. The Breast Cancer Linkage Consortium.** *Genes Chromosomes Cancer* 1995, **13**:203–10.
13. Osorio A, de la Hoya M, Rodríguez-López R, Martínez-Ramírez A, Cazorla A, Granizo JJ, Esteller M, Rivas C, Caldés T, Benítez J: **Loss of heterozygosity analysis at the BRCA loci in tumor samples from patients with familial breast cancer.** *Int J Cancer* 2002, **99**:305–9.
14. Xu J, Huo D, Chen Y, Nwachukwu C, Collins C, Rowell J, Slamon DJ, Olopade OI: **CpG island methylation affects accessibility of the proximal BRCA1 promoter to transcription factors.** *Breast Cancer Res Treat* 2010, **120**:593–601.
15. Tassone P, Tagliaferri P, Perricelli a, Blotta S, Quaresima B, Martelli ML, Goel a, Barbieri V, Costanzo F, Boland CR, Venuta S: **BRCA1 expression modulates chemosensitivity of BRCA1-defective HCC1937 human breast cancer cells.** *Br J Cancer* 2003, **88**:1285–91.
16. Alvarez S, Diaz-Uriarte R, Osorio A, Barroso A, Melchor L, Paz MF, Honrado E, Rodríguez R, Urioste M, Valle L, Díez O, Cigudosa JC, Dopazo J, Esteller M, Benitez J: **A predictor based on the somatic genomic changes of the BRCA1/BRCA2 breast cancer tumors identifies the non-BRCA1/BRCA2 tumors with BRCA1 promoter hypermethylation.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**:1146–53.
17. Lips EH, Mulder L, Oonk A, van der Kolk LE, Hogervorst FBL, Imholz a LT, Wesseling J, Rodenhuis S, Nederlof PM: **Triple-negative breast cancer: BRCAness and concordance of clinical features with BRCA1-mutation carriers.** *Br J Cancer* 2013, **108**:2172–2177.

18. Ford D, Easton DF, Bishop DT, Narod SA, Goldgar DE: **Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium.** *Lancet* 1994, **343**:692–5.
19. Thompson D, Easton DF: **Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers.** *J Natl Cancer Inst* 2002, **94**:1358–65.
20. Konishi H, Mohseni M, Tamaki A, Garay JP, Croessmann S, Karnan S, Ota A, Wong HY, Konishi Y, Karakas B, Tahir K, Abukhdeir AM, Gustin JP, Cidado J, Wang GM, Cosgrove D, Cochran R, Jelovac D, Higgins MJ, Arena S, Hawkins L, Lauring J, Gross AL, Heaphy CM, Hosokawa Y, Gabrielson E, Meeker AK, Visvanathan K, Argani P, Bachman KE, et al.: **Mutation of a single allele of the cancer susceptibility gene BRCA1 leads to genomic instability in human breast epithelial cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**:17773–8.
21. **World Cancer Statistics - Breast Cancer** [http://www.wcrf-uk.org/research/cancer_statistics/world_cancer_statistics_breast_cancer]
22. Fackenthal JD, Olopade OI: **Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations.** *Nat Rev Cancer* 2007, **7**:937–48.
23. Stupp R, Roila F: **Malignant glioma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up.** *Ann Oncol* 2009, **20 Suppl 4**:126–8.

CHAPITRE IV : CONCLUSIONS ET
PERSPECTIVES

1. Conclusions et perspectives

Les cancers du sein triples-négatifs sont très hétérogènes et une classification plus précise est nécessaire pour ces tumeurs. L'expression du gène BRCA1 semble être fortement réduite chez certaines patientes malgré l'absence de mutation germinale (Lips et al. 2013). Cette réduction peut être due à des réarrangements chromosomiques, une méthylation de son promoteur ou des régulations post-traductionnelles telles que des interactions avec des microARN. Cette perte de fonction BRCA (statut BRCA-ness des tumeurs) est associée à une meilleure réponse à certains agents thérapeutiques et peut-être à une meilleure survie (Vollebergh et al. 2011)(Stefansson et al. 2012). Jusqu'à présent, en clinique, le dépistage BRCA1 est réalisé par séquençage, sur de l'ADN génomique des cellules sanguines, donc non tumoral, dans le but d'identifier un risque personnel et familial de cancer mammaire et ovarien. Cette technique n'est pas réalisée sur l'ADN tumoral à l'heure actuelle, probablement car la qualité du matériel obtenu à partir de tissus FFPE est mauvaise, ce qui alourdit encore le processus d'analyse bioinformatique, mais aussi parce que ces mutations somatiques sont réputées peu fréquentes dans les cancers du sein. Cette situation pourrait cependant évoluer à court terme, puisque la recherche des mutations somatiques de BRCA1/2 est réalisée en Belgique dans les cancers ovariens, sur base d'études cliniques indiquant une réponse favorable aux inhibiteurs de la PARP en cas de mutation BRCA (Hennessy et al. 2010). De telles études sont en cours dans les cancers du sein TN (O'Shaughnessy et al. 2014)(Telli et al. 2015) (Etudes cliniques en phase III à l'UCL: Veliparib, OLYMPIA , BRAVO)

La fonction exacte de la protéine BRCA1 n'est que partiellement connue. Elle intervient certainement dans le processus de réparation de l'ADN par recombinaison homologue (HR) mais d'autres fonctions ont été suggérées. En effet, la protéine est colocalisée avec certaines protéines, à titre d'exemple, dans le processus NHEJ mais son rôle exact reste incertain.

Les études cliniques portant sur les inhibiteurs de la PARP se basent sur le principe de la mortalité synthétique : si les processus HR et la PARP sont altérés ou ciblés simultanément, la cellule meurt tandis que l'atteinte d'un seul mécanisme n'affecte pas la viabilité cellulaire. Dans les cancers ovariens et les cancers TN, les mutations germinales de BRCA1/2 sont

associées à une réponse aux inhibiteurs de la PARP mais l'association entre un statut BRCA-ness induit par d'autres mécanismes et la réponse à ces drogues n'est pas clairement établi. Diverses études indiquent également que les cancers ovariens et mammaires secondaires à une mutation germinale de BRCA1 répondent favorablement aux dérivés de platine et diverses études cliniques évaluent ces drogues pour la prise en charge des cancers du sein TN (Etude BSMO 2014_01). Cependant, dans la plupart de ces études, le niveau protéique de BRCA1 dans les tumeurs n'est pas exploré et donc reste inconnu, et le statut BRCA-ness, quelle qu'en soit l'origine, n'est pas clairement défini. A titre indicatif, dans les cancers ovariens, différentes études indiquent une réponse clinique aux inhibiteurs de la PARP, en cas de mutation germinale ou somatique de BRCA1/2 ou de perte de fonction HR (Drew et al. 2011)(Hennessy et al. 2010) (ARIEL-2 : étude qui n'est pas encore publiée). Cette perte de fonction HR peut être due à des mutations d'autres gènes codant pour des protéines intervenant dans ce processus. Par contre, dans les cancers ovariens, le lien entre d'une part la perte de fonction HR ou la réponse aux inhibiteurs de la PARP et d'autre part la méthylation des gènes BRCA n'est pas établi.

Dans le cadre de ce projet, sur une cohorte de 69 tumeurs de sein FFPE de type triple négatif, nous avons étudié l'expression de l'ARN messager et de la protéine BRCA1, ainsi que sa capacité à s'associer à la protéine BARD1, partenaire de BRCA1 dans le processus HR. D'autre part, nous avons établi le profil d'expression de 27 micro-ARN. Ensuite, nous avons corrélé nos résultats aux données cliniques associées aux tumeurs dans le but d'évaluer la valeur pronostique de chaque paramètre étudié et/ ou la combinaison de ces paramètres.

Les paramètres moléculaires BRCA1 :

Nous nous sommes intéressés à la valeur pronostique des produits du gène BRCA1. En clinique, l'immunohistochimie BRCA1 n'est pas utilisée. Nous avons développé une technique permettant de détecter uniquement la protéine entière et non la protéine tronquée ainsi que la liaison de la protéine avec un partenaire protéique. De plus, cette technique permet de quantifier ces signaux. Nous avons réalisé des analyses biostatistiques afin de trouver l'éventuelle relation entre l'expression BRCA1 et la rechute chez les patientes. Malheureusement, cette relation n'est pas mise en évidence dans notre cohorte. Quatre hypothèses sont possibles et envisageables pour expliquer ce manque de corrélation : (i) l'hétérogénéité intra-tumorale est importante au point de biaiser la quantification de BRCA1

au sein des tumeurs, et par conséquent, la méthode de quantification manuelle n'est pas adaptée aux tumeurs très hétérogènes, (ii) la taille de la cohorte est trop petite vu l'hétérogénéité inter-tumorale des TNBC (iii) la perte d'expression de BRCA1 n'est qu'un des mécanismes altérant le processus HR et une étude fonctionnelle plus globale devrait être réalisée afin de distinguer les tumeurs avec ou sans perte de fonction HR, (iv) l'expression protéique de BRCA1 n'est simplement pas liée au pronostic des patientes.

Les TNBC sont particulièrement caractérisés par une hétérogénéité intra tumorale très importante : ils sont particulièrement riches en réarrangements chromosomiques, et en mutations somatiques. Ces mutations sont certes rares pour certains gènes comme le gène BRCA1 mais détectables dans certains cas. En raison de l'instabilité génétique caractéristique de ces tumeurs, des mutations apparaissent au cours du développement tumoral et n'intéressent donc qu'une partie des cellules cancéreuses.

Peter Campbell explique l'origine probable des cancers par le « Common ancestor » ou ancêtre cellulaire commun et s'appuie sur le fait que certaines mutations sont retrouvées dans la tumeur primaire ainsi que dans les métastases distantes chez le même patient.

En séquençant le matériel génétique ou génome de multiples cellules d'une seule tumeur, et en le comparant avec la cellule normale non cancéreuse du même patient, il serait donc possible de définir le génome du « common ancestor » et de détecter les néo-mutations à l'origine de l'évolution intra tumorale dans la tumeur primaire et les métastases.

Le séquençage single-cell au lieu de séquencer tout le génome tumoral apporterait donc une réponse plus précise sur l'origine du cancer primaire que le séquençage de toutes les cellules tumorales de la même tumeur. Le plus intéressant, serait de séquencer de nombreuses cellules de la même tumeur et les comparer entre elles dans le but de rendre compte de l'hétérogénéité intra tumorale. Dans notre étude, les marquages immuno-histochimiques ou par PLA ont montré une importante hétérogénéité du marquage pour l'expression de BRCA1 : certaines cellules sont fortement marquées alors que d'autres ne le sont pas du tout. Cependant, nous ne connaissons pas la cause de cette hétérogénéité et nous ne pouvons pas définir l'existence d'éventuelles mutations somatiques de BRCA1 ou de certains de ses partenaires du système HR, présentes dans une proportion des cellules tumorales. Le séquençage d'ADN single-cell permettrait d'identifier les différentes mutations ou réarrangements chromosomiques selon les zones dans la même tumeur et permettrait donc une meilleure estimation, bien plus précise, de l'hétérogénéité génétique et biologique intra-tumorale et de son lien avec le caractère BRCA-ness. (Campbell 2012)

Dans notre étude, nous avons voulu quantifier l'expression de BRCA1 dans la tumeur pour définir le caractère BRCA-ness. Il serait très intéressant de développer un algorithme qui permette d'automatiser et d'optimiser les comptages afin d'améliorer la méthode de quantification. En effet, en collaboration avec la plateforme bioinformatique du centre GIGA, nous avons essayé différentes méthodes de comptage. Pour ce faire, la plateforme a développé un algorithme pour notre projet. Pour commencer, nous avons essayé de révéler les PLA en fluorescence pour faciliter le comptage des spots par l'algorithme. La lame est scannée entièrement et est mise sur l'application cytomine. Cependant, cet algorithme n'a pas pu différencier les vrais spots des artéfacts, ni permis le comptage du nombre de noyaux (donc de cellules). Nous avons donc décidé de changer de méthode de détection et de tester un double-comptage par deux expérimentateurs en comparaison du comptage réalisé par l'algorithme. Plusieurs zones tumorales sont comptées (spots et noyaux) par deux expérimentateurs indépendants. Le comptage de chaque expérimentateur est comparé à celui généré par l'algorithme. Malheureusement, les comptages générés par l'algorithme ne se rapprochaient pas de ceux générés par les expérimentateurs, ni de la moyenne des deux comptages. Il nous était donc impossible à cette étape de compter l'entièreté de la coupe par l'algorithme. Il serait très intéressant de se donner les moyens de développer l'algorithme testé pour optimiser cette méthode de comptage et surtout d'avoir le comptage de toute la tumeur pour avoir une estimation plus précise du niveau d'expression globale et de l'hétérogénéité intra-tumorale.

Une étude rétrospective sur une plus grande cohorte apporterait une réponse statistique plus précise sur le lien entre la perte de fonction BRCA1 et le pronostic des patientes. Il faudrait déterminer dès le départ la taille de la cohorte en fonction des variables et paramètres à étudier et des hypothèses statistiques.

Une étude fonctionnelle de BRCA1 serait très intéressante. En effet, le reflet de la fonction de la protéine BRCA1 peut être estimé par l'estimation et la quantification des différents complexes BRCA1, reflets des différentes fonctions de la protéine. Ensuite, il serait intéressant de tester la valeur pronostique de chaque complexe ou de l'ensemble des complexes via l'intégration de ces informations dans un modèle de prédiction de la rechute.

Par ailleurs, une estimation du processus HR via l'évaluation de l'expression des différents partenaires de BRCA1 ou l'estimation des LOH au niveau du génome serait utile pour différencier les patientes avec un profil BRCA-like. En effet, la perte de la réparation d'ADN

par recombinaison homologue pourrait résulter de l'absence de l'expression d'autres protéines que BRCA1 (PALB2, BARD1, BRCA2, RAD51).

Une nouvelle piste d'évaluation de la fonction HR dans les TNBC est le gène *HORMAD1*. Ce gène joue un rôle dans la déficience de la recombinaison homologue et est surexprimé dans les tumeurs TN. L'estimation de l'expression de ce gène dans les TNBC pourrait être corrélée aux paramètres cliniques afin d'évaluer le caractère pronostique de ce gène. Effectivement, l'implication de *HORMAD1* dans un défaut de recombinaison homologue et sa surexpression dans les TNBC indiquerait un mauvais pronostic pour ces tumeurs.(Watkins et al. 2015)

Les micro-ARN :

Les micro-ARN sont de petites molécules régulatrices de l'expression des gènes via l'interaction avec les extrémités 3' UTR des ARN messagers. Ces molécules ont une expression dérégulée dans le cancer du sein mais aussi dans d'autres pathologies. Ils constituent de véritables marqueurs potentiels grâce à leur accessibilité via le sang périphérique.

Dans le cadre de ce projet, nous avons sélectionné 27 micros ARN. La sélection était basée sur leur association avec la survie des patientes comme décrit dans la littérature, sur des études préalables dans notre laboratoire sur les miARN circulants (Frères et al. 2014)(Frères et al. 2015) et/ou sur leur association à l'infiltration lymphocytaire, marqueur d'hétérogénéité et de meilleur pronostic chez les TNBC. Nous avons réalisé le profilage d'expression des 27 microARN sur l'ARN tumoral de 50 patientes de la cohorte. Nos résultats permettent de mettre en évidence un nouveau marqueur potentiel, le miR-548c-5p, qui permet une meilleure prédiction du risque de rechute. Ce miR n'est pas connu dans les cancers du sein et est très peu étudié. Cependant, des miR de la même famille, miR-548-3p et miR-548d-3p, ont des fonctions connues dans les cancers du sein. En effet, ils sont impliqués dans la prolifération cellulaire et l'apoptose via la régulation de l'expression des gènes *ECHS1* et *TP53BP1* respectivement. Il serait donc très intéressant de mettre au point des études fonctionnelles dans le but de définir les cibles potentielles du miR548c-5p(Shi et al. 2015)(Song et al. 2015).

Du point de vue économique, le profilage des microARN n'est pas une technique coûteuse et ne nécessite pas beaucoup de temps d'analyse des résultats contrairement à une technique de séquençage.

En pratique, nous pensons qu'une étude de confirmation sur une plus large cohorte indépendante du caractère pronostique du niveau d'expression tumorale du miR548c-5p serait nécessaire afin de confirmer sa validité clinique. Si c'est le cas, un dosage quantitatif de ce miR pourrait être associé aux paramètres pronostiques conventionnels afin de définir la probabilité de rechute et d'ensuite adapter l'approche thérapeutique de manière personnalisée. Un autre potentiel des microARN comme biomarqueur réside dans le fait qu'ils sont excrétés dans sang périphérique où ils sont très stables car protégés par des vésicules lipidiques, les exosomes. Les niveaux plasmatiques de ces micro ARN circulants sont perturbés dans plusieurs types de cancers dont les cancers du sein, et ils constituent donc une source d'information importante pour le diagnostic, le pronostic et le suivi des tumeurs malignes.

Plusieurs miR interagissent avec BRCA1 et inversement BRCA1 induit l'expression de plusieurs miRs (miR-146a, miR-210)(Volinia et al. 2012)(Shen et al. 2008). La perte d'expression de BRCA1 pourrait être donc soit être induite par des miRs tumoraux soit entraîner une perte d'expression de miRNAs. La mesure de l'expression de certains microARN circulants pourrait donc constituer un marqueur indirect de la perte de fonction de BRCA1 dans les cancers du sein triple négatifs (caractère BRCA-ness). En effet, l'expression de certains miR permet de différencier les tumeurs BRCA mutées des tumeurs BRCA non mutées. (Bastos et al. 2014).

Pour conclure, nos résultats ont permis de mettre en évidence un nouveau marqueur qui améliore la prédiction de la rechute chez les patientes atteintes de cancer du sein triples-négatifs. Cependant, l'utilisation de l'expression de BRCA1 dans les tumeurs TN comme marqueur pronostic reste à ce jour peu probable.

2. Références bibliographiques

- Bastos, E.P. et al., 2014. MicroRNAs discriminate familial from sporadic non-BRCA1/2 breast carcinoma arising in patients ≤ 35 years. *PloS one*, 9(7), p.e101656.
- Campbell, 2012. Evolution of the cancer genome. *Trends in Genetics*, 28(11), pp.155–163.
- Drew, Y. et al., 2011. Therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor AG014699 in human cancers with mutated or methylated BRCA1 or BRCA2. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(4), pp.334–346.
- Frères, P. et al., 2015. Circulating microRNA-based screening tool for breast cancer. *Oncotarget*.
- Frères, P. et al., 2014. Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients induces miR-34a and miR-122 expression. *Journal of cellular physiology*, (April), pp.1–33.
- Hennessy, B.T.J. et al., 2010. Somatic mutations in BRCA1 and BRCA2 could expand the number of patients that benefit from poly (ADP ribose) polymerase inhibitors in ovarian cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(22), pp.3570–6.
- Lips, E.H. et al., 2013. Triple-negative breast cancer: BRCAness and concordance of clinical features with BRCA1-mutation carriers. *British journal of cancer*, 108(April), pp.2172–7.
- O’Shaughnessy, J. et al., 2014. Phase III study of iniparib plus gemcitabine and carboplatin versus gemcitabine and carboplatin in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 32(34), pp.3840–7.
- Shen, J. et al., 2008. A functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis. *Carcinogenesis*, 29(10), pp.1963–1966.
- Shi, Y. et al., 2015. MiR-548-3p functions as an anti-oncogenic regulator in breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 75, pp.111–116.
- Song, Q. et al., 2015. miR-548d-3p/TP53BP2 axis regulates the proliferation and apoptosis of breast cancer cells. *Cancer medicine*.
- Stefansson, O. a. et al., 2012. BRCA1 epigenetic inactivation predicts sensitivity to platinum-based chemotherapy in breast and ovarian cancer. *Epigenetics*, 7(November), pp.1225–1229.
- Telli, M.L. et al., 2015. Phase II Study of Gemcitabine, Carboplatin, and Iniparib As

Neoadjuvant Therapy for Triple-Negative and BRCA1/2 Mutation-Associated Breast Cancer With Assessment of a Tumor-Based Measure of Genomic Instability: PrECOG 0105. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33(17), pp.1895–901.

Volinia, S. et al., 2012. Breast cancer signatures for invasiveness and prognosis defined by deep sequencing of microRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(8), pp.3024–9.

Vollebergh, M. a. et al., 2011. An aCGH classifier derived from BRCA1-mutated breast cancer and benefit of high-dose platinum-based chemotherapy in HER2-negative breast cancer patients. *Annals of Oncology*, 22(7), pp.1561–1570.

Watkins, J. et al., 2015. Genomic complexity profiling reveals that HORMAD1 overexpression contributes to homologous recombination deficiency in triple-negative breast cancers. *Cancer Discovery*.

LISTE DES PUBLICATIONS

1. BRCA1 germline mutation and glioblastoma development : report of cases (2015, BMC Cancer)
M Boukerroucha, C Josse, K Segers, S El Guendi, P Frères, G Jerusalem , V Bours
2. Evaluation of BRCA1-related molecular features and microRNA as prognostic factors for triple negative breast cancers (2015, BMC Cancer)
M Boukerroucha*, C Josse*, S ElGuendi, B Boujemla, P Freres^{1,2}, R Marée, S Wenric, K Segers, J Collignon, G Jerusalem , V Bours
3. Circulating microRNAs based diagnostic tool for breast cancer
Frères P*, Wenric S*, **Boukerroucha M**, Fasquelle C, Thiry J, Bovy N, Struman I, Geurts P, Collignon J, Shroeder H, Kridelka F, Lifrange E, Josa V, Bours V*, Josse C*, Jerusalem G*.
(2015, Oncotarget)
4. Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients induces miR-34a and miR-122 expression. (2014, Journal of cellular physiology)
Frères P, Josse C, Bovy N, **Boukerroucha M**, Struman I, Bours V, Jerusalem G
5. Molecular and genetic aspects of triple negative breast cancer and therapeutic implications (2011, Revue Médicale de Liège)
Collignon J, Struman I, Tabruyn S, Josse C, **Boukerroucha M**, Jerusalem G, Bours V.

ANNEXE 1