RÉPUBLIQUE DU BÉNIN

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ D'ABOMEY-CALAVI

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA SANTÉ

UNITÉ DE FORMATION ET DE RECHERCHE EN MÉDECINE

Année : **2023** N° : **2555**

RECHERCHE DE MUTATIONS GENETIQUES DELETERES CHEZ LES FEMMES ATTEINTES D'UN CANCER DU SEIN AU BENIN : ETUDE PILOTE

THESE

Présentée et soutenue publiquement pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN MÉDECINE (DIPLÔME D'ÉTAT)

Par :

Don de Dieu Rosa Mariane Fifamè FASSINOU

Née le 01/10/1993 à Cotonou (République du Bénin)

Directeur de thèse

MCA Freddy H.R. GNANGNON

Co-directeur de thèse

Dr Alexis PARENTE

Président de jury

Pr Yao Victor GNANGOURA

Membres de jury

Pr Dansou Gaspard GBESSI

MCA Freddy H.R. GNANGNON

MCA Simon A. AZONBAKIN

Année académique : 2021-2022

REPUBLIQUE DU BENIN
*****
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE D'ABOMEY-CALAVI

FACULTE DES SCIENCES DE LA SANTE
****

N°1200 /2022/UAC/FSS/VD-Ecoles/VD-UFR Pharma/VD UFR Méd/SGE/CSRH/SA

UNIVERSITE D'ABOMEY-CALAVI **FACULTE DES SCIENCES DE LA SANTE**

NOVEMBRE 2022

Université d'Abomey - Calavi
LE DOYEN
FACULTE DES SCIENCES DE LA SANTE

LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT

DOYEN : Professeur AVAKOUDJO Josué Dejinnin Georges

VICE-DOYEN U.F.R Médecine : Maître de Conférences Agrégé VODOUHE Ulrich Bidossèssi

VICE-DOYEN U.F.R Pharmacie : Maître de Conférences Agrégé GANFON Medessou Yowel Habib

VICE-DOYENNE /ECOLES : Professeur AZON KOUANOU Angèle

Année : 2022-2023 (version novembre 2022)

PROFESSEURS TITULAIRES

1.	Dr HOUINATO Dismand Stéphan.....	Neurologie
2.	Dr ADJIBABI Wassi.....	ORL-Chirurgie Cervico Faciale
3.	Dr MEHINTO Delphin Kuassi.....	Chirurgie Viscérale
4.	Dr GANGBO Flore	Histologie- Embryologie-Cytogénétique
5.	Dr LALEYE Anatole O. A	Histologie-Embryologie-Cytogénétique
6.	Dr AMOUSSOU-GUENOU Marcellin Kuassi.	Biophysique, Médecine Nucléaire
7.	Dr FIOGBE Michel Armand.....	Chirurgie Pédiatrique
8.	Dr HANS-MOEVI Aristote	Orthopédie -Traumatologie
9.	Dr KPADONOU Toussaint Godonou.....	Médecine Physique – Réadaptation
10.	Dr SOUNOUVOU Ignace.....	Ophtalmologie
11.	Dr BIAOU Olivier	Imagerie Médicale
12.	Dr ODOULAMI-YEHOUESSI Lisette.....	Ophtalmologie
13.	Dr ZOUMENOU Eugène.....	Anesthésie-Réanimation
14.	Dr DENAKPO Justin Lewis	Gynécologie Obstétrique
15.	Dr DOSSOU Francis Moïse	Chirurgie Générale
16.	Dr ADEGBIDI Hugues Daniel Gbadébo	Dermatologie Vénérologie
17.	Dr AFFOLABI Dissou.....	Bactériologie-Virologie
18.	Dr ALAO Modjere Ola Maroufou Jules.....	Pédiatrie et Génétique Médicale
19.	Dr ATADOKPEDE Agbomènou Félix.....	Dermatologie- Vénérologie
20.	Dr AWEDE Bonaventure Lucien Sévérin.....	Physiologie
21.	Dr FIOSSI KPADONOU Emilie.....	Pédopsychiatrie
22.	Dr TONATO BAGNAN Josiane Angéline A.	Gynécologie-Obstétrique
23.	Dr ADJIEN Kodjo Constant	Neurologie
24.	Dr OGOUYEMI HOUNTO Aurore Bertille.	Parasitologie
25.	Dr SAGBO Gratien.....	Pédiatrie
26.	Dr SEHONOU Jean	Hépato-Gastro-Entérologie
27.	Dr AGODOKPESSI Gildas	Pneumo-Phtisiologie
28.	ALAMOU Soulé.....	Ophtalmologie
29.	Dr ALLABI Aurel Constant Eustache.....	Pharmacologie Clinique
30.	Dr AVAKOUDJO Josué D. Georges	Urologie-Andrologie
31.	Dr AYELO Ahounmènou Paul	Médecine du Travail
32.	Dr GNONLONFOUN Dieu donné	Neurologie
33.	Dr HOUNKPATIN Benjamin I. Bodounrin.....	Gynécologie Obstétrique
34.	Dr TSHABU AGUEMON Christiane	Gynécologie Obstétrique

Université d'Abomey - Calavi
LE DOYEN
FACULTE DES SCIENCES DE LA SANTE

35. Dr ZOMALHETO Zavier Cossi	Rhumatologie
36. Dr YEKPE AHOUANSOU Hermione Patricia Frida..	Imagerie Médicale
37. Dr AGUEMON Badirou Din.....	Santé Publique
38. Dr ALAGNIDE Hountondji Etienne	Médecine Physique et de Réadaptation
39. Dr AZON KOUANOU Angèle	Médecine Interne
40. Dr GBESSI Dansou Gaspard	Chirurgie Générale
41. Dr HINSON Vikkey Antoine	Médecine du Travail
42. Dr HOUNKPE Pierre Claver	Anesthésie-Réanimation
43. Dr LALYA Francis Honorat.....	Pédiatrie et Génétique Médicale
44. Dr VIGAN Jacques	Néphrologie

MAÎTRES DE CONFERENCES AGREGES

1. Dr ASSOUTO A. Pamphile.	Anesthésie –Réanimation
2. Dr AVAKOUDJO François	ORL-Chirurgie Cervico Faciale
3. Dr LAWSON AFOUDA Sonia.....	ORL-Chirurgie Cervico Faciale
4. Dr SISSINTO SAVI DE TOVE Yolande.....	Parasitologie-Mycologie
5. Dr YEMOA Loconon Y. Achille.	Chimie Analytique-Bromatologie
6. Dr AGBODANDE Kouessi Anthelme	Médecine Interne
7. Dr ALIHONOU Thierry	Neurochirurgie
8. Dr BAGNAN TOSSA Léhila.....	Pédiatrie et Génétique Médicale
9. Dr GANFON M. Yowel Habib.....	Pharmacognosie
10. Dr KEREKOU Annelie Célestine:.....	Endocrinologie
11. Dr VODOUHE Ulrich B.	ORL-Chirurgie Cervico Faciale
12. Dr WANVOEGBE Armand.....	Médecine Interne
13. Dr CODJO Houétondji Léopold.....	Cardiologie
14. Dr ABOUBACAR Moufalilou	Gynécologie-Obstétrique
15. Dr ABOUKI Chakiratou Olaïdé Adoukê.....	Ophtalmologie
16. Dr ADJADOHOUN Sonia B.M. Gwladys....	Radiologie, Radiodiagnostic et Imagerie médicale
17. Dr AKODJENOU Joseph	Anesthésie Réanimation
18. Dr AKPADJAN Gbèmawonmédè Fabrice.....	Dermatologie-Vénérologie
19. Dr ALIHONOU Florence Nathalie Yacoba.....	Pédiatrie et Génétique Médicale
20. Dr ANAGONOU Lary Lucrèce.....	Pédopsychiatrie
21. Dr ATTOLOU Sètondji Roger Gilles.....	Chirurgie Générale
22. Dr AZONBAKIN Azandégbé Simon	Histologie-Embryologie-Cytogénétique
23. Dr BIGOT Cédric Egnonwa Parfait	Médecine Légale

Université d'Abomey - Calavi
LE DOYEN
FACULTE DES SCIENCES DE LA SANTE

24. Dr BOGNON Gilles Modeste Alain.....	Pédiatrie et Génétique Médicale
25. Dr CHIGBLO Sègla Pascal Eric.....	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
26. Dr DEGBOE Kaï Bérénice Esthelle	Dermatologie-Vénérologie
27. Dr GNANGNON Freddy Houehanou R.....	Cancérologie Chirurgicale
28. Dr HODONOU Dètondji Fred Jean-Martin...	Urologie-Andrologie
29. Dr IMOROU SOUAÏBOU Yacoubou.....	Chirurgie Générale
30. Dr KLIKPO Elvire	Psychiatrie Adulte
31. Dr KPOSSOU Aboudou Raïmi	Gastroentérologie et Hépathologie
32. Dr LAWANI Ismaïl.....	Chirurgie Viscérale
33. Dr MIKPONHOUE OLOU Rose Christelle	Médecine du Travail
34. Dr OGOUDJOBI Ogourindé Mathieu.....	Gynécologie-Obstétrique
35. Dr PADONOU Abiodun Adébola Djossè.....	Traumatologie-Orthopédie
36. Dr PADONOU Caroline Sourou Clémence.....	Pédiatrie et Génétique Médicale
37. Dr PADONOU Sètondji Géraud Roméo.....	Santé Publique
38. Dr SEIDOU Falilatou	Anatomie et Cytologie Pathologique
39. Dr SONOU Djidjoho Joël Arnaud.....	Cardiologie
40. Dr TOGNIFODE Medesse Véronique.....	Gynécologie-Obstétrique
41. Dr WACHINOU Ablo Prudence.....	Pneumo-Phtisiologie
42. Dr YEVI Dodji Magloire Inès.....	Urologie Andrologie
43. Dr ZOHOUN GUIDIGBI Lutécia Myria A.....	Pédiatrie et Génétique Médicale

Université d'Abomey - Calavi
LE DOYEN
FACULTE DES SCIENCES DE LA SANTE

MAITRES ASSISTANTS

1. Dr GANDAHO Hugues Jean-Thierry	Neurochirurgie
2. Dr AGBOTON Bruno Léopold	Néphrologie
3. Dr DJOSSOU Médesse David.....	Odontologie Pédiatrique
4. Dr ADJAGBA Mahouna Philippe Dotou	Cardiologie
5. Dr AMOSSOU Labissi François.....	Traumatologie-Orthopédie
6. Dr BADOU Agnès Oladoun	Sociologie et Anthropologie sociale
7. Dr GNINKOUN Comlan Jules.....	Endocrinologie Métabolisme et Nutrition
8. Dr LOKOSSOU Mègnissè S. Houévi Symphorose...	Gynécologie-Obstétrique
9. Dr TOKOUDAGBA Kossi Jean-Marie Dénis.....	Chimie Organique et Chimie des Substances Naturelles
10. Dr ADJOBIMEY Mênonli.....	Santé au Travail
11. Dr BANCOLE POGNON Sylvie Arlette A.....	Chirurgie Buccale
12. Dr ZOHOUN Comlan Gildas Alban	Hématologie
13. Dr AHOUNOU Ernest Stéphane.....	Anesthésie-Réanimation

ENTRE 2022

14. Dr AÏGBE Nestor.....	Ophtalmologie
15. Dr DANGBEMEY Djima Patrice.....	Gynécologie-Odstrétique
16. Dr DO SANTOS ZOUNON Alexis.....	OTO-Rhino Laryngologie et Chirurgie Cervico-Faciale
17. Dr HOUNKPONOU AMOUSSOU-GUENOU Eliane Kayivi Murielle	Cardiologie
18. Dr LALEYE Christel Marie Fortunat Olatumbossum B.I.	Anatomie
19. Dr MIZEHOUN Gbèdécon Carmelle.....	Nutrition
20. AGBOKPONTO Janvier Engelbert.....	Chimie Analytique
21. Dr ASSANHOU Assogba Gabin.....	Pharmacie Galénique
22. Dr AZA-GNANDJI Guy-Gérard.....	Psychiatrie
23. Dr BAGLO Dédé Priscillia Tatiana.....	Hématologie Biologie
24. Dr GOUKODADJA Oswald.....	Traumatologie Orthopédie
25. Dr SOSSA Jean	Urologie

Université d'Abomey - Calavi
LE DOYEN
FACULTE DES SCIENCES DE LA SANTE

ASSISTANTS

1. Dr VIGNON Cyprien Kossi.....	Chirurgie Générale
2. Dr LANKPEKO AFFOLABI Clémence M.	Pédiatrie et Génétique Médicale
3. Dr YAKOUBOU YOBO Annatou	Pédiatrie et Génétique Médicale
4. Dr VIGNON Koffi Rodolphe	Hépato-Gastroentérologie
5. Dr AMONLES Yves D.	Psychiatrie
6. Dr HOUESSOU ENIANLOKO TCHIAKPE Nicole Zinhoué	Pédiatrie
7. Dr HOUNDETOUNGAN David Gilles.....	Biophysique
8. Dr DADJO Kinski Aumar.....	Traumatologie Orthopédie
9. Dr HOUEZE Richard Ghislain Constantin.....	Neurologie

Le Doyen,

Université d'Abomey - Calavi
LE DOYEN
FACULTE DES SCIENCES DE LA SANTE

Professeur Josué Dejinnin Georges AVAKOUDJO

NON PAYÉ 2022

ACTION DE GRÂCE

« Que tes œuvres sont belles, que tes œuvres sont grandes. Seigneur tu nous combles de joie…. Tu fais germer le grain semé. Au temps voulu, les fruits murissent. Tout homme est une histoire sacrée, l'homme est à l'image de Dieu. »

DEDICACES

- **A Dieu, Tout Puissant**

  Tu es la source de tout ce qui existe et existera. Que ta miséricorde m'accompagne à chaque instant de ma vie.

  J'ai confiance en Toi !

- **A ma mère Nicole KPINDJO**

  Patiente, infatigable, tu es simplement un amour. A la fois père et mère tu as été pour moi. Pour toutes ces nuits blanches passées à veiller sur moi et avec moi. Pour tout ce que tu as enduré, afin que je sois là aujourd'hui, merci maman. Ce travail est le tien, le fruit de tes innombrables sacrifices. Reçois-le comme signe de mon amour et de ma reconnaissance. Je te souhaite de passer des jours encore plus heureux à mes côtés et que maman Marie vielle sur toi.

  Gratitude infinie !

- **A mon père Edmond FASSINOU**

  Je te dédie cet ouvrage en témoignage de mon amour. Trouve en ce modeste travail, l'expression de ma gratitude et de mon affection. Puisse Dieu te préserver et te procurer santé, longévité et bonheur.

  Gratitude infinie !

- **A Mgr Martin ADJOU**

  Plus qu'un père vous avez été pour nous. Infiniment merci pour tout ce que vous avez été pour nous. Merci pour l'amour inconditionnel que vous nous portez. Vous avez témoigné à notre égard affection et soutiens.

  Gratitude infinie !

- **A mes frères et à ma sœur**

  Au milieu de qui j'ai grandi, et qui êtes toujours présents pour moi, merci. Que l'amour et la fraternité nous unissent davantage. Je nous souhaite la réussite et le bonheur. Et que partout où nous serons, nous ne négligions jamais les liens familiaux.

  Amour fraternel !

- **A ma grand-mère Louise AHOUANDJINOU**

  Infiniment merci pour l'amour et le soutien spirituel inépuisable que tu nous portes.

  Dieu te bénisse !

- **Aux familles FASSINOU et KPINDJO**

  Merci pour votre soutien, mention spéciale à ma tante la Sœur Aubiège

  Gratitude infinie !

- **A Houédjigbé ALIHONOU**

  L'une des meilleures rencontres de ma vie maintenant et à jamais. Tu es entré dans ma vie et tu as apporté la lumière. Merci pour ta présence, ton soutien, puissions-nous continuer dans la bonne direction. Tout mon amour et ma profonde reconnaissance. Puisse Dieu nous unir davantage et nous accorder des jours encore plus heureux dans l'amour et le respect mutuel.

  Amour inconditionnel !

REMERCIEMENTS

- **A toutes les femmes ayant participé à cette étude et toutes celles qui se battent chaque jour contre ce fléau qu'est le cancer du sein.**

  Que le Seigneur vous assiste dans ce moment difficile et vous accompagne sur le chemin de la guérison et de l'apaisement. Je vous souhaite de la force et du courage afin de surmonter cette épreuve. A toutes celles qui ont perdu la vie

  Repos éternel !

- **Au Dr Lionel OYEDOKOU**

  Un ami de longue date, bienveillant, à chaque fois que je me sentais perdue, tu trouvais toujours les mots justes pour me réconforter. Merci du fond du cœur pour ton soutien et ta participation à l'élaboration de ce travail.

  Gratitude et profonde reconnaissance !

- **A tout mon groupe de stage interné**

  Joachim, Parfait, Marcel, Espérencia, Melkior, Ulrich, Farida, Irmine, Christelle, Amael, Rody, Gilbéric, Tobada, Marius, Samiath, Atinsè, Gloria. Sans vous l'internat n'aurait pas été une si belle expérience. Merci pour la fraternité et la collaboration durant ces onze mois passés ensemble.

  Brillante carrière !

- **A la 44ème promotion de Médecine** de la Faculté des Sciences de la Santé de Cotonou

  Brillante carrière !

- **Au Dr Freeman de SOUZA**

  En témoignage de l'amitié qui nous unit, des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble.

- **Au Dr ADJALLA Bertrand** pour ta participation à l'élaboration de ce travail

- **A l'équipe du laboratoire d'histologie, biologie de la reproduction, cytogénétique et génétique médicale de la Faculté des Sciences de la Santé de Cotonou** :
  Merci pour l'accueil et la disponibilité. Mention spéciale **à Arnaud AGBANLINSOU**

- Au personnel du Laboratoire d'épidémiologie des maladies chroniques et neurologiques (LEMACEN).

- Au personnel des centres hospitalo-universitaires, le CNHU-HKM et le CHU-MEL de Cotonou.

- **Aux pères Samba AHOUANTO, André HOUNTONDJI** pour le soutien que vous nous avez accordé dans le cadre de ce travail de recherche.

- A tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette œuvre.

- A tous ceux qui ont lu et qui liront ce travail,
  Ma reconnaissance pour leur esprit critique vis-à-vis de ma modeste contribution au savoir universel.

HOMMAGES

- **A tous nos Maîtres de la Faculté des Sciences de la Santé,**

  Pour avoir guidé nos pas avec patience et abnégation pendant toute la durée de nos études, nous vous promettons d'honorer l'espoir que vous avez placé en nous.

  Profondes gratitudes **!**

- **A notre Président du Jury,**

  C'est un immense honneur que vous nous faites, en acceptant de présider ce jury. Veuillez agréer nos hommages et notre profond respect.

  Hommages respectueux **!**

- **Aux Honorables Membres du Jury,**

  Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail. Vos remarques et vos critiques contribueront à en améliorer la qualité.

  Hommages respectueux **!**

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

ASS : Afrique Sub Saharienne

ADN : Acide désoxyribo nucléique

°C : Degré celsius

A : Adénine

ACR : American College of Radiology

AE : Elution buffer

AL : Lyse buffer

ALB : Albumin

ATE : Elution buffer

ATL : Tissu lysis buffer

ATM : Ataxie telangiectasia mutated

AW1 : Wash buffer 1

AW2 : Wash buffer 2

BARD1 : Protéine du domaine ring associée à BRCA1

BI-RADS : Breast imaging-reporting and data system

BRCA1 : Breast cancer 1

BRCA2 : Breast cancer 2

BRIP1 : BRCA1 interacting protein 1

C : Cytosine

CDK12 : Cyclin-dependent kinase 12

CHEK1 : Checkpoint kinase 1

CHEK2 : Checkpoint kinase 2

CHU : Centre hospitalier universitaire

CHU-MEL	:	Centre hospitalier universitaire de la mère et de l'enfant lagune
CNHU-HKM	:	Centre national hospitalier et universitaire Hubert Koutoukou MAGA
Ct	:	Cycle threshold
CUCV	:	Clinique universitaire de chirurgie viscérale
ECB	:	Examen cyto-bactériologique
EpiMaCT	:	Laboratoire d'épidémiologie des maladies chroniques en zone tropicale
FANCA	:	Fanconi anemia complementation group A
FANCD2	:	Fanconi anemia complementation group D2
FANCL	:	Fanconi anemia complementation group L
FFPE	:	Formalin fixed paraffin embedded
FSS	:	Faculté des Sciences de la Santé
FTB	:	Lysis buffer
G	:	Guanine
HBOC	:	Hereditary breast and ovarian cancer
HER 2	:	Human epidermal growth factor receptor 2
HES	:	Hématoxyline eosine safran
HPRT	:	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase
IGF	:	Insuline-like growth factor
Inserm	:	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
IRD	:	Institut de recherche en développement
IRM	:	Imagerie par résonance magnétique
ISBA	:	Institut des Sciences Biomédicales Appliquées

Ki67	:	Index de prolifération
AJCC	:	American Joint Commission on Cancer
UICC	:	Union Internationale Contre le Cancer
LEMACEN	:	Laboratoire d'épidémiologie des maladies chroniques et neurologiques
LHBRCGM	:	Laboratoire d'histologie, de biologie de la reproduction, cytogénétique et génétique médicale
MCA	:	Maître de Conférence Agrégé
min	:	Minute
ml	:	Millilitre
MRE11	:	Double-strand break repair protein
NBN	:	Nibrin
NGS	:	Séquençage nouvelle génération
nm	:	Nanomètre
OMS	:	Organisation Mondiale de la Santé
PALB2	:	Partner and localizer of BRCA2
pb	:	Paire de base
PGMC	:	Plateforme de génétique moléculaire des cancers
PPP2R2A	:	Protein phosphatase 2 regulatory subunit balpha
PTEN	:	Phosphatase and TENSin homolog
qPCR	:	Réaction de polymérisation en chaine quantitative
RAD51B	:	Recombinase RAD51B
RAD51C	:	Recombinase RAD51C
RAD51D	:	Recombinase RAD51D
RAD54L	:	Recombinase RAD54L

RE	:	Récepteur à l'œstrogène
RH	:	Récepteur hormonal
RP	:	Récepteur à la progestérone
rpm	:	Nombre de rotation par minute
S	:	Seconde
SBR	:	Scarff Bloom et Richardson
STK 11	:	Serine threonine kinase 11
T	:	Température
TBP	:	Tata -box binding protein
THM	:	Traitement hormonal de la ménopause
Tm	:	Température de fusion
TNM	:	Tumor nodes metastasis
TP 53	:	Tumor protein 53
UNG	:	Uracil N-glycosylase

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	:	grade histopronostique de SBR……	20
Tableau II	:	types histologiques des tumeurs……..	50
Tableau III	:	analyse de la quantité des vingt-cinq ADN extraits des blocs	51
Tableau IV	:	analyse de la qualité des deux ADN extraits de blocs FFPE	53
Tableau V	:	analyse de la qualité des vingt-trois ADN extraits des blocs	54
Tableau VI	:	liste des couples d'amorces utilisés pour la réaction de la PCR	55
Tableau VII	:	répartition des patientes de la phase prospective, atteintes de cancer du sein au CNHU-HKM et au CHU-MEL de Cotonou, en fonction du motif de consultation.....	59
Tableau VIII	:	répartition des patientes de la phase prospective, atteintes de cancer du sein au CNHU-HKM et au CHU-MEL de Cotonou, en fonction du siège de la tumeur.....	60
Tableau IX	:	types histologiques des tumeurs des patientes atteintes de cancer du sein au CNHU-KHM et au CHU-MEL de Cotonou	61
Tableau X	:	analyse de la quantité et de la qualité des seize ADN extraits	62

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Répartition des pays d'Afrique au Sud du Sahara en fonction du premier cancer chez la femme en termes d'incidence 5

Figure 2 : risque cumulé (entre 0 et 74 ans) des dix cancers les plus fréquents en termes d'incidence ou de mortalité en Afrique sub-saharienne 6

Figure 3 : coupe sagittale du sein féminin selon Franck Netter 13

Figure 4 : technique d'identification de la région riche en cellules tumorales..... 42

Figure 5 : extraction de l'ADN à partir de biopsie..... 44

Figure 6 : dosage de la quantité de l'ADN au spectrophotomètre..... 45

Figure 7 : comparaison des courbes d'amplification en qPCR de trois échantillons d'ADN..... 53

Figure 8 : résultat d'amplification des deux régions présentant une mutation lors du séquençage NGS..... 56

Figure 9 : résultat du séquençage Sanger au niveau de l'exon 4 du gène BRCA2..... 57

Figure 10 : résultat du séquençage Sanger au niveau de l'exon 4 du gène TP53..... 57

Par délibération, la Faculté des Sciences de la Santé de Cotonou a arrêté que les opinions émises dans cette thèse n'engagent que son auteur.

SOMMAIRE

INTRODUCTION 1

1. GENERALITES 3

2. CADRE ET METHODE D'ETUDE 35

3. RESULTATS 49

4. DISCUSSION 63

CONCLUSION 72

SUGGESTIONS 74

REFERENCES 77

ANNEXES ..... A

TABLE DES MATIERES ..... a

INTRODUCTION

Le cancer du sein est la principale cause de morbidité par cancer et la deuxième cause de mortalité par cancer en Afrique subsaharienne (ASS) et au Bénin en particulier. Bien que l'incidence des cancers du sein en ASS soit parmi les plus faibles au monde, les taux de mortalité y sont les plus élevés, reflétant un pronostic médiocre [1]. Même si la plupart des auteurs évoquent le stade tardif au diagnostic et l'accès au traitement comme les principaux facteurs pouvant expliquer cette surmortalité, d'autres facteurs notamment génétiques devraient être explorés.

De plus, la plupart des études africaines insistent sur l'âge jeune des patientes. Dans une étude nationale réalisée au Bénin de 2014 à 2018, l'âge moyen des patientes atteintes du cancer du sein était de 47,45 ans et plus de 60% des patientes atteintes avaient moins de 50 ans. Le même résultat a été rapporté dans d'autres séries africaines [2]. Ce constat renforce l'hypothèse de l'existence des mutations génétiques délétères chez la femme africaine. La prise en charge et la prévention des cancers du sein liés à des mutations génétiques sont très spécifique. A notre connaissance, en ASS et au Bénin, peu d'études ont été consacrées à la recherche des facteurs génétiques de cancer du sein notamment celles utilisant le séquençage de nouvelle génération (NGS).

- **Objectif général**

  Identifier les mutations génétiques délétères chez les femmes atteintes d'un cancer du sein au Bénin.

- **Objectifs spécifiques**

  1. Evaluer la quantité d'ADN pouvant être extrait des blocs de paraffine et de prélèvements biopsiques de cancer du sein.
  2. Evaluer la qualité de l'ADN extrait des blocs de paraffine et des prélèvements biopsiques de cancer du sein,
  3. Identifier les caractéristiques des mutations génétiques délétères chez les femmes atteintes d'un cancer du sein.

1. GENERALITES

1.1. Epidémiologie descriptive

1.1.1. Incidence

Le cancer du sein est un problème mondial de santé publique aussi bien dans les pays développés que dans les pays en développement. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), plus de 2,2 millions nouveaux cas de cancer du sein ont été diagnostiqués dans le monde en 2020, ce qui en fait le cancer le plus fréquent [1]. Les taux d'incidence standardisés pour l'âge étaient de 92,6 pour 100.000 femmes en Europe de l'Est et 84,8 pour 100.000 en Amérique du Nord [3]. Cette incidence plus marquée dans les pays développés tend à augmenter dans les pays d'Afrique au Sud du Sahara en raison de l'urbanisation importante et l'adoption du mode de vie occidental. Une étude réalisée au Cameroun retrouvait une fréquence annuelle de 304,4 nouveaux cas [4]. Des études ont montré des disparités raciales et ethniques entre les femmes noires et caucasiennes dans l'épidémiologie du cancer du sein. Les femmes noires ont un taux d'incidence plus faible, mais un taux de mortalité plus élevé que les femmes blanches [5]. De plus, les taux d'incidence du cancer du sein en Afrique subsaharienne sont en hause. La complexité et l'hétérogénéité de cette tumeur varient en fonction de la race et de l'ethnie [4]. Au Bénin, le cancer du sein est le premier cancer de la femme [3]. En effet, 1066 nouveaux cas de cancer du sein ont été enregistrés en 2020 soit environ 15,8% de l'ensemble des cancers enregistrés sur la même période. Dans une étude réalisée en 2013 par Tonato-Bagnan et al. le cancer du sein était le cancer le plus diagnostiqué de la femme et représentait 44,3% de l'ensemble des cancers gynécologiques [6]. La figure 1 montre la répartition des pays d'Afrique au Sud du Sahara en fonction du premier cancer chez la femme en termes d'incidence.

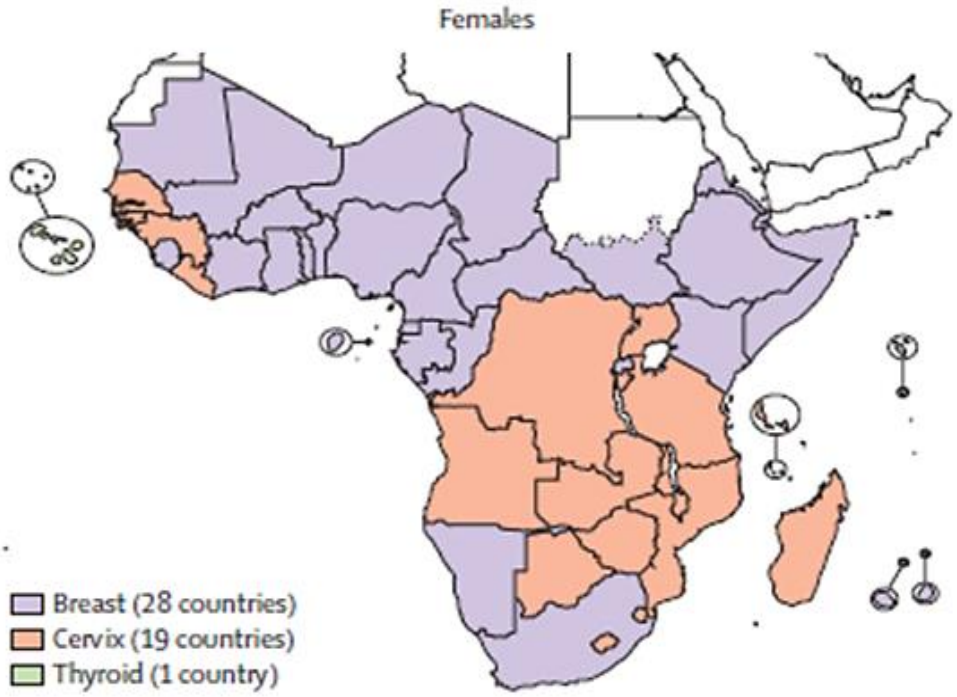


Figure 1: Répartition des pays d'Afrique au Sud du Sahara en fonction du premier cancer chez la femme en termes d'incidence [7].

1.1.2. Mortalité

Le cancer du sein est la première cause de mortalité par cancer chez les femmes dans presque tous les pays, sauf dans les pays les plus économiquement développés où il est passée au 2ème rang, après le cancer des poumons. La mortalité par cancer du sein décroît depuis une trentaine d'années dans les pays les plus industrialisés comme en France. Le fardeau de la mortalité du cancer augmente rapidement dans le monde entier [3]. Le taux de survie à cinq ans en Afrique subsaharienne est inférieur à 40%, contre 86% aux Etats-Unis [8]. Bien que les taux d'incidence en Afrique soient les plus bas au monde, les taux de mortalité y sont les plus élevés, reflétant une survie faible. En 2020, l'Afrique a enregistré 186 598 nouveaux cas de cancer du sein dont 85 787 décès. Les taux de mortalité par cancer du sein ont diminué de 34 % de 1990 à 2014. La baisse a été plus importante chez les femmes de moins de 50 ans que chez celles de plus de 50 ans et plus. La baisse de la mortalité par cancer du sein a été attribuée à la fois aux

améliorations du traitement et à la détection précoce [7]. La figure 2 montre le risque cumulé (entre 0 et 74 ans) des dix cancers les plus fréquents en termes d'incidence ou de mortalité en Afrique sub-saharienne.

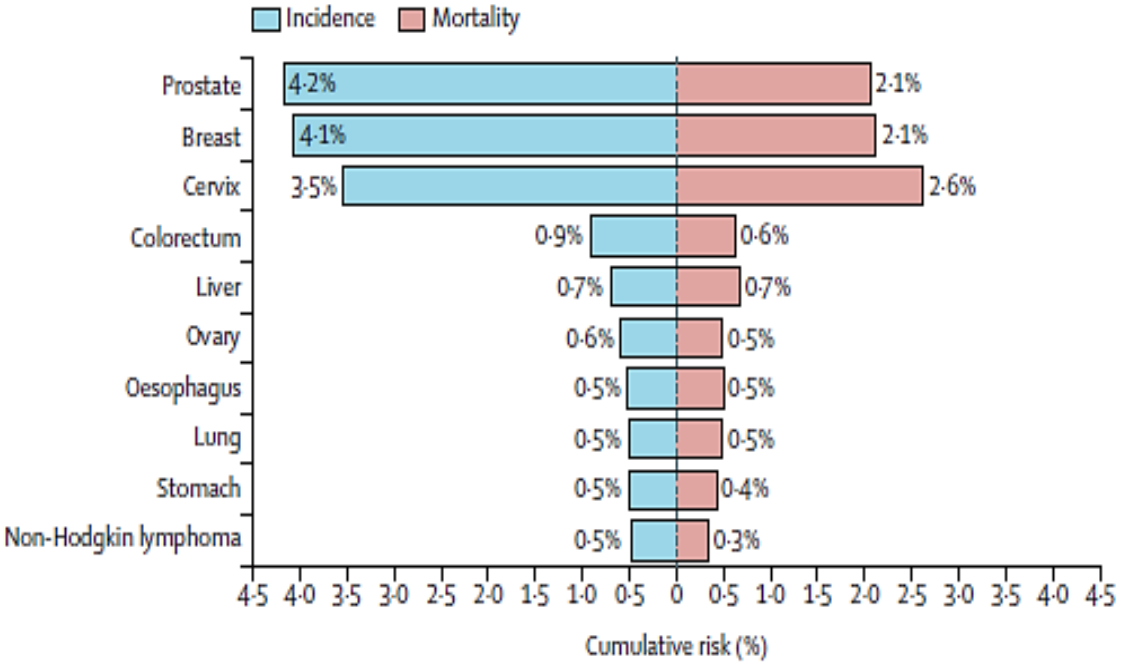


Figure 2: risque cumulé (entre 0 et 74 ans) des dix cancers les plus fréquents en termes d'incidence ou de mortalité en Afrique sub-saharienne [7].

1.2. Epidémiologie analytique

Plusieurs facteurs de risque ont été identifiés comme pouvant influencer la survenue et le développement du cancer du sein.

1.2.1. Facteurs hormonaux

- **Âge précoce des premières menstruations** : de nombreuses études montrent que le risque de cancer du sein augmente de 50 % si les premières règles sont survenues avant l'âge de 12 ans [9,10]. Le fondement biologique de cette assertion correspond à l'exposition précoce et prolongée à l'imprégnation hormonale qui existe durant la période d'activité des ovaires. Cette exposition est considérable lorsque les cycles menstruels sont réguliers. Une telle hypothèse concorde avec les taux

d'œstrogène élevés après les règles que l'on observe chez les femmes qui ont eu leurs menstruations précocement [9].

- **Ménopause tardive** : les femmes qui ont leur ménopause après 50 ans présentent un risque plus élevé de cancer du sein en comparaison avec celles dont les menstruations cessent précocement. Ce risque augmente d'environ 3 % pour chaque année supplémentaire à partir de l'âge présumé de la ménopause. Ce mécanisme est expliqué par la production prolongée des hormones ovariennes [11].
- **Contraception orale oestroprogestative** : le risque de cancer du sein est augmenté d'environ 25 % chez les femmes utilisant couramment les contraceptifs oraux [9]. Ce risque décroît après l'arrêt de la contraception, et rejoint celui des femmes jamais traitées environ dix ans après l'arrêt [12]. Le risque de cancer du sein ne change pas de manière significative avec la durée d'utilisation et est indépendant du type d'œstrogène ou de la combinaison des préparations utilisées. Le cancer du sein est rare chez les jeunes femmes en âge de procréer qui utilisent
- les contraceptifs oraux [13]. Plus les contraceptifs oraux seront utilisés tardivement, plus le nombre de cas de cancer du sein qui en résultera sera important. La durée totale d'utilisation, la dose et le type de contraceptif oral ne semblent pas avoir d'effet. Seul un petit nombre de cas de cancer du sein sont attribuables à la prise de contraceptifs oraux du fait de la faible augmentation du risque et des taux de cancer du sein peu élevés dans les tranches d'âge concernées par la contraception [12].
- **Les traitements hormonaux de la ménopause (THM)** : les traitements hormonaux de la ménopause sont associés à un risque accru de cancer du sein. L'augmentation du risque de cancer du sein s'est avérée pour les THM combinant un œstrogène et un progestatif [14]. Ce risque est plus faible voire controversé pour les THM à base d'œstrogène seul. Dans certaines études effectuées en France, le risque de cancer du sein associé aux THM

combinant un œstrogène et de la progestérone naturelle n'était pas augmenté, à l'inverse des traitements utilisant des progestatifs de synthèse. Ce risque augmente avec la durée totale d'utilisation [10].

1.2.2. Facteurs liés à la reproduction

- **La nulliparité et l'âge à la première grossesse** : le rôle délétère de la nulliparité dans le cancer du sein est reconnu depuis longtemps. Chez les femmes non nullipares, le risque de cancer du sein est d'autant plus faible que la parité est élevée [15]. Les femmes qui ont mené au moins une grossesse à terme avant l'âge de 30 ans présentent, en moyenne, un risque de cancer du sein diminué de 25 % par rapport aux femmes nullipares. L'effet protecteur de la multiparité semble augmenter proportionnellement au nombre d'accouchements [16]. Enfin, il est reconnu que le risque de cancer du sein augmente avec l'âge à la première grossesse. Cette augmentation serait en rapport avec une différenciation plus tardive des cellules mammaires survenant après la première grossesse à terme. [12].
- **L'allaitement** : constitue un facteur protecteur de cancer du sein, d'autant plus marqué que la durée d'allaitement est plus longue[9]. La différenciation de l'épithélium mammaire à son stade final d'évolution et le rallongement de la période anovulatoire chez les femmes en période d'allaitement constituent des explications plausibles de cette association [12].

1.2.3. Facteurs liés aux habitudes de vie

- **L'obésité et le surpoids** : les femmes qui maintiennent une activité physique tout au long de la vie ont un risque de cancer du sein diminué par rapport aux femmes inactives [17]. Cette conclusion s'applique aussi bien en pré qu'en post ménopause [12]. En période post ménopausique, l'excès d'adiposité et le gain de poids tendent à augmenter le risque de cancer du sein. La production d'œstrogènes par le tissu adipeux qui devient le

principal site de production après la ménopause et les mécanismes d'insulinorésistance liés à l'adiposité sont les principales causes évoquées pour expliquer cette association [18].

- **L'alcoolisme** : l'alcool est le seul facteur nutritionnel établi de risque de cancer du sein. Ce risque augmente d'environ 7 % pour une consommation moyenne d'une boisson alcoolique par jour [19]. L'alcool provoque une augmentation du niveau des hormones dans le sérum et une production accrue de facteurs de croissance IGF (Insulin-like Growth Factor). Les IGF agissent comme des mitogènes, inhibent l'apoptose et interagissent avec les œstrogènes. Une production accrue d'IGF augmente le risque de cancer du sein surtout avant la ménopause [20].
- **Le tabagisme** : constitue une importante source de substances carcinogènes. Cependant la cigarette n'est pas considérée comme un facteur de risque de cancer du sein. Certaines recherches ont trouvé que les fumeuses présentent un risque réduit, d'autres aucun risque. L'effet protecteur de la cigarette dans le cancer du sein serait dû à l'action anti-œstrogénique du tabac et à la diminution des œstrogènes circulantes. Il a été rapporté que les fumeuses ont une ménopause précoce et une concentration urinaire réduite d'œstrogènes pendant la phase lutéale du cycle menstruel [11]. Le tabagisme passif pourrait aussi être associé à une augmentation du risque, bien que les études ne convergent pas toutes, certaines études associent un risque de 60 pourcents. Ce risque est multiplié par trois chez les femmes après la ménopause [21].

1.2.4. Autres facteurs de risque

- **Radiations ionisantes** : l'exposition aux radiations ionisantes est le seul facteur de risque bien établi de cancer du sein d'origine environnementale. Les femmes exposées au moment de la puberté semblent être les plus vulnérables [22].

- **Densité mammaire :** le niveau de densité des tissus mammaires en mammographie augmente le risque de cancer du sein. Ce risque est multiplié de deux à six fois pour les femmes ayant des seins denses en mammographie. Cette augmentation du risque est indépendante de l'effet des autres facteurs de risque. Les études estiment que 30 % des cas de cancer du sein sont attribuables à une densité mammaire supérieure à 50 % à la mammographie par rapport à la densité moyenne[9].
- **Maladies bénignes du sein :** les maladies bénignes du sein constituent un facteur de risque de cancer du sein. En histologie, on distingue deux groupes :
  - **les lésions prolifératives** : les lésions prolifératives sans atypie multiplient le risque par deux, tandis que les lésions hyperplasiques avec atypie augmentent ce risque d'au moins quatre fois [23].
  - **les lésions non prolifératives avec ou sans atypie** : généralement ces lésions ne sont pas associées à un risque accru de cancer du sein ou, si elles le sont, le risque est très faible [23].

1.3. Rappels

1.3.1. Rappels anatomiques [24]

1.3.1.1. Situation des seins

Les seins occupent la partie antéro-supérieure du thorax, de part et d'autre du sternum en avant des muscles pectoraux, en regard de l'espace compris entre la 3ème et la 7ème côte, le mamelon se situant au niveau de la 9ème vertèbre dorsale. En position debout, sous l'influence de son propre poids, le sein tombe légèrement, ce qui crée le sillon infra-mammaire entre la moitié inférieure du sein et le thorax. Cliniquement, le sein est divisé en quatre quadrants : supéro- externe, supéro-interne, inféro- externe, inféro- interne et le prolongement axillaire.

1.3.1.2. Forme des seins

Les seins sont de forme semi-sphériques chez les femmes européennes et asiatiques, plutôt coniques chez les femmes africaines. La taille d'un sein est d'environ 12 cm en hauteur et largeur. Les deux mamelons sont distants d'environ 20 cm. Les seins sont fréquemment asymétriques.

1.3.1.3. Poids et consistance des seins

Le poids du sein varie selon la morphologie de la femme et l'état physiologique : la phase du cycle menstruel, la grossesse et la lactation. De 200 g chez la jeune fille, il peut atteindre 500 g chez la femme allaitante et 900 g dans certains cas.

Le sein est une glande sous-cutanée de consistance un peu grenue à la palpation à pleine main. La pression contre la paroi thoracique fait disparaître cette sensation. Elle apparaît alors ferme et élastique.

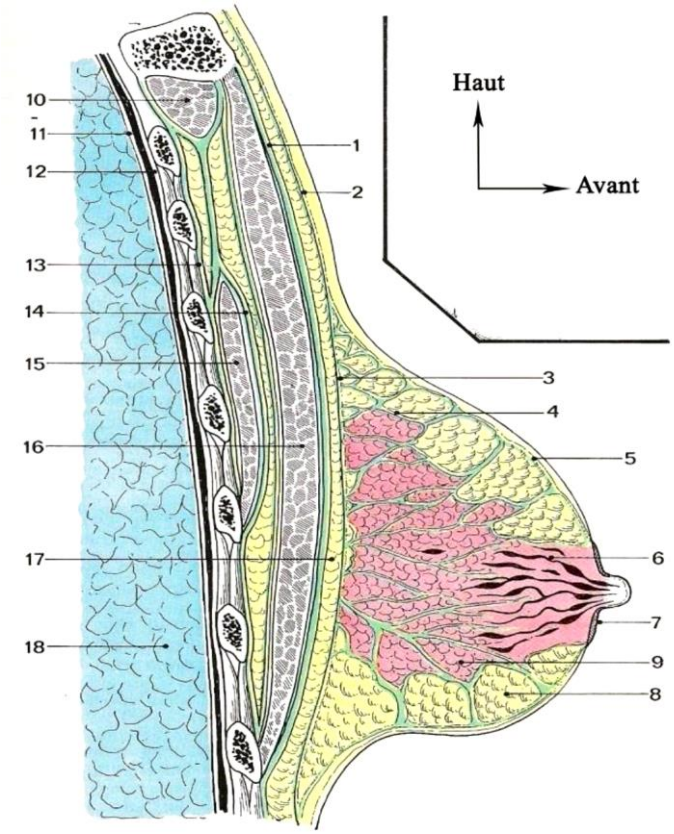
1.3.1.4. Plaque aréolo-mammaire et la glande mammaire

- **La peau péri-aréolaire** : elle est mince, lisse souple et d'une douceur unique au toucher.
- **L'aréole** : elle présente une coloration caractéristique rosée chez les rousses et les blondes, brunâtre chez les brunes et d'un noir mat chez les noires. La teinte est plus foncée pendant la grossesse. Elle est parsemée de tubercules des glandes aréolaires sous-jacentes. Sa peau est adhérente et immobile.
- **Le mamelon** : il est saillant au centre de l'aréole, cylindrique ou conique. Il est long de 10 mm environ et large à sa base de 15mm. Sur son sommet s'ouvrent les ostiums papillaires des conduits lactifères. Il est rugueux avec une pigmentation identique à celle de l'aréole, sauf *l'aréa cribrosa* qui est plus claire.
- **La glande mammaire** : dans chaque sein, la glande mammaire est une masse de densité variable, discoïde aplatie d'avant en arrière, de contour irrégulier. Elle est organisée en une vingtaine de lobes. Chaque lobe est

composé de 20 à 40 lobules et chaque lobule contient 10 à 100 alvéoles. L'unité de base est l'acinus ou alvéole. L'alvéole est une cavité arrondie en forme de cul de sac qui constitue la partie sécrétrice de la glande. Chaque acinus se draine par un canal intra lobulaire ou alvéolaire ou canal de troisième ordre. Les acini et les canaux interlobulaires forment un lobule qui se draine par un canal interlobulaire (canal galactophore de deuxième ordre). Plusieurs lobules se réunissent pour former un lobe glandulaire qui se draine par un canal galactophore de premier ordre. Les canaux galactophores convergent vers le mamelon, ils s'élargissent pour former les sinus lactifères, puis se rétrécissent et débouchent au niveau des pores du mamelon.

1.3.1.5. Moyens de fixation du sein

Ils sont représentés par la peau et les ligaments suspenseurs du sein. Les ligaments suspenseurs sont constitués par les nombreux septums qui unissent les fascias pré-mammaires et rétro-mammaires. La figure 3 montre la coupe sagittale du sein féminin selon Franck Netter.



1- Fascia pectoral
2- fascia superficialis thoracique (f.s.t)
3- Lame rétro mammaire du f.s.t.
4- Ligament suspenseur du sein
5- Lame pré mammaire du f.s.t.
6- Conduit lactifères
7- Aréole mammaire
8- Couche graisseuse pré mammaire
9- Lobe mammaire
10- muscle subclavier
11- Plèvre
12- Fascia endothoracique
13- Fascia thoracique profond
14- Fascia clavi-pectoral
15- Muscle petit pectoral
16- Muscle grand pectoral
17- Couche séreuse rétro mammaire
18- Poumon

Figure 3: coupe sagittale du sein féminin selon Franck Netter [25]

1.3.1.6. Vascularisation

1.3.1.6.1. Artères

Les vaisseaux assurant la vascularisation artérielle proviennent des artères thoraciques internes, axillaires et intercostales.

L'artère thoracique interne donne les rameaux mammaires médiaux.

L'artère axillaire donne au sein l'artère thoracique latérale, l'artère thoracique latérale accessoire et des rameaux thoraciques de l'artère thoraco-acromiale.

Les artères intercostales dorsales donnent par leurs rameaux perforants latéraux, des rameaux mammaires latéraux.

1.3.1.6.2. Veines

Les vaisseaux assurant la vascularisation veineuse proviennent de :

- **Les veines sous-cutanées**, plus apparentes pendant la grossesse, forment un cercle péri-mamelonnaire, quasi constant. Elles se drainent vers les veines jugulaires externes, céphaliques et sous cutanées de l'abdomen.
- **Le réseau veineux profond**, anastomosé au précédent, présente trois voies de drainage :
  - **le drainage latéral** s'effectue par les veines thoraciques latérales dans la veine axillaire,
  - **le drainage médial** aboutit aux veines thoraciques internes,
  - **le drainage postérieur** s'effectue par les veines intercostales dans les veines azygos et azygos accessoires.

1.3.1.6.3. Lymphatiques

- **Le réseau sous-aréolaire** forme le centre anastomotique principal entre le réseau de la glande mammaire et le réseau cutané.
- **Le réseau cutané** ou superficiel se draine essentiellement dans les lymphocentres axillaires.
- **Le réseau de la glande mammaire** ou profond est interlobulaire. Il se draine surtout dans le réseau sous-aréolaire et dans les collecteurs rétro-mammaires.
- **Les collecteurs efférents** : Le drainage lymphatique principal est centrifuge à partir de l'aréole vers les lymphocentres axillaires. Il n'existe aucun collecteur direct vers les nœuds lymphatiques supra-claviculaires.
- **Les collecteurs axillaires** se subdivisent en quatre pédicules : le pédicule thoracique latéral, le pédicule subscapulaire, le pédicule rétro-pectoral et le pédicule central.
- **Les collecteurs rétro-mammaires** comprennent un pédicule trans-pectoral et un pédicule inter-pectoral.

- **Les collecteurs para-sternaux** forment deux pédicules : Un pédicule trans-pectoral et un pédicule infra-pectoral.

1.3.1.7. Innervation

- **Les nerfs superficiels cutanés** issus des plexus cervical, brachial et des nerfs intercostaux.
- **Les nerfs profonds** qui suivent le trajet des vaisseaux dans la glande.

  Tous ces nerfs envoient de nombreuses ramifications vers l'aréole et le mamelon, zones extrêmement sensibles. L'excitation de ces nerfs entraîne l'érection du mamelon et la contraction des canaux galactophores à leur extrémité.

1.3.2. Rappel histologique

Chacune des deux glandes mammaires est une glande exocrine, tubulo-acineuse composée. On y trouve un système ramifié de canaux excréteurs terminés en cul-de-sac par des portions sécrétrices tubulo-acineuses. Chaque glande mammaire est constituée de 10 à 20 lobes drainés par des canaux galactophores collecteurs « lactifères » s'ouvrant individuellement à la peau au niveau du mamelon. Chaque lobe est lui-même constitué de lobules, chaque lobule étant constitué de tubulo-acini correspondant à la partie sécrétrice de la glande. Les lobes sont séparés par du tissu conjonctif dense et entourés par du tissu adipeux abondant, de même les lobules sont entourés par du tissu conjonctif dense alors que le tissu conjonctif intralobulaire (tissu conjonctif palléal) est lâche.

Les canaux excréteurs sont d'abord intralobulaires, puis interlobulaires et enfin interlobaires à épithélium pavimenteux stratifié.

Les tubulo-acini de la glande mammaire au repos sont constituées de cellules disposées sur deux couches : sécrétrices, au contact de la lumière et myoépithéliales, au pourtour.

1.3.3. Rappels physiologiques [24]

Les seins jouent un rôle important dans l'esthétique et la féminité de la femme. Mais le plus important reste leur rôle dans l'allaitement maternel.

Dès la puberté plusieurs hormones influencent les seins, tant dans sa forme que dans son volume notamment l'œstrogène et la progestérone. Ces hormones, fabriquées par les ovaires, ont une influence sur les seins tout au long de la vie.

Les œstrogènes agissent sur la croissance cellulaire des canaux, du tissu conjonctif, et du tissu adipeux. En outre, l'œstrogène stimule positivement la synthèse de leurs récepteurs et ceux de la progestérone. Ces hormones sont fabriquées au cours de la première partie du cycle menstruel de la femme.

La progestérone est principalement présente lors de la seconde partie du cycle menstruel. Elle a une action complémentaire à celle des œstrogènes. Elle agit sur la partie distale du canal galactophore en induisant la formation et la différenciation des acini.

La fonction biologique du sein en période d'allaitement est de produire du lait afin de nourrir un nouveau-né. La prolactine a son rôle dans l'induction de la sécrétion lactée, lequel rôle sera entretenu par la succion du bébé. L'ocytocine, elle provoque la contraction des cellules myoépithéliales.

1.4. Diagnostic et traitement du cancer du sein

1.4.1. Diagnostic

1.4.1.1. Signes cliniques [26,27]

La suspicion d'un cancer du sein chez une femme peut être faite dans les circonstances suivantes :

- lors d'un examen clinique anormal (nodule palpable, écoulement mamelonnaire séro-sanglant, maladie de Paget du mamelon),
- lors d'un examen systématique de dépistage,

Quel que soit le mode de découverte, la prise en charge diagnostique comprend toujours un examen clinique suivi d'un bilan radiologique et d'un diagnostic histologique qui confirment ou infirment le diagnostic.

L'examen clinique mammaire proprement dit doit rechercher des points capitaux pour caractériser la tumeur. Il s'agit de :

- sa taille,
- sa topographie, sa localisation par quadrant ou rétro-aréolaire,
- sa mobilité par rapport au plan thoracique par la manœuvre de Tillaux, qui consiste en une abduction contrariée du bras permettant d'apprécier la fixité par rapport au muscle grand pectoral,
- l'état cutané avec la recherche de signes d'atteinte comme un érythème, un aspect en ''peau d'orange'' ou une ulcération,
- l'examen du mamelon et de l'aréole à la recherche d'un écoulement (sanglant, jaunâtre ou verdâtre), d'une rétraction ou d'une déviation mamelonnaire,
- la palpation des aires ganglionnaires axillaires et sus-claviculaires,

Et enfin l'examen général.

L'examen clinique des seins doit toujours être bilatéral et symétrique.

1.4.1.2. Examens paracliniques

1.4.1.2.1. Examens d'imagerie

- **Mammographie [28]**

La mammographie est l'examen de référence dans le dépistage et le diagnostic du cancer du sein. Dans la plupart des pays développés les politiques de dépistage systématique reposent sur la réalisation de la mammographie. Elle doit être bilatérale et comparative avec des clichés de face, de profil et du prolongement axillaire.

La mise en évidence d'opacités (circonscrites ou stellaires), de désorganisations architecturales ou de microcalcifications est un signe évocateur d'un cancer du sein dans la plupart des cas. Cependant la mammographie présente des limites. Certaines lésions sont indétectables soit par leur topographie ou leur localisation dans un secteur dense. Le radiologue résume les lésions retrouvées en utilisant : **la classification BI-RADS (Breast Imaging Reporting and Data System) de l'American College of Radiology (ACR)** [29]**.**

Catégorie 0 : Investigations complémentaires nécessaires

Catégorie 1 : Mammographie normale

Catégorie 2 : Lésions typiquement bénignes

Catégorie 3 : Lésions probablement bénignes - surveillance mammographique

Catégorie 4 : Lésions suspectes de malignité - une biopsie doit être envisagée pour confirmation histologique

- **Catégorie 4A** : Faible suspicion de malignité
- **Catégorie 4B** : Suspicion modérée de malignité
- **Catégorie 4C** : Forte suspicion de malignité

Catégorie 5 : Lésions typiques de malignité – confirmation histologique

Catégorie 6 : Cancer histologiquement confirmé

- **Echographie mammaire** [30]

Le rôle le plus important de l'échographie est la caractérisation des masses restant ambigües à la mammographie, ainsi que l'exploration des aires ganglionnaires de drainage. Ses indications sont envisagées, en première intention (femme de moins de 30 ans, femme enceinte, syndrome inflammatoire) ou après une mammographie anormale (caractérisation d'une image) ou normale (détection d'un cancer dans les seins denses).

- **Imagerie par résonnance magnétique (IRM)** [31]

L'IRM du sein est principalement utilisée chez les femmes qui ont été déjà diagnostiquées pour un cancer du sein dans le but de mesurer la taille du cancer de rechercher d'autres tumeurs dans le sein ainsi que le sein opposé. Pour certaines

femmes à haut risque de cancer du sein, une IRM de dépistage est recommandée avec une mammographie annuelle.

Il faut noter que l'IRM est connue pour donner des résultats faussement positifs. Ainsi, bien que l'IRM du sein soit utile pour les femmes à haut risque, elle est rarement recommandée comme test de dépistage pour les femmes à risque moyen de cancer du sein. De plus, l'IRM du sein ne montre pas de dépôts de calcium, appelés microcalcifications qui peuvent être un signe de cancer du sein.

1.4.1.2.2. Histologie

Il existe plusieurs techniques de prélèvement biopsique dans les cancers du sein :

- la cytoponction,
- la microbiopsie pour les tumeurs palpables,
- la macrobiopsie pour les micros calcifications et les tumeurs infracliniques,
- la biopsie chirurgicale,
- la tumorectomie biopsique.

L'histologie confirme le diagnostic et précise

- **Le type histologique** [32]

Les plus fréquents sont :

- carcinome canalaire in situ ou carcinome intra canalaire
- carcinome canalaire infiltrant
- carcinome lobulaire in situ ou carcinome intra lobulaire
- carcinome lobulaire infiltrant

- **Le grade histopronostique** de Scarff Bloom et Richardson (SBR) [33]

SBR 1 : tumeur de bas grade

SBR 2 : tumeur de grade intermédiaire

SBR 3 : tumeur de haut grade

Tableau I: grade histopronostique de SBR

Paramètres	Score 1	Score 2	Score 3
Différenciation tubulo-glandulaire	Plus de 75% de la tumeur	Entre 10% et 75%	Moins de 10%
Pléomorphisme nucléaire	Petits noyaux réguliers, uniformes	Pléomorphisme Modéré	Augmentations marquées de taille, de forme avec atypies majeures
Nombre de Mitoses	0 à 6 mitoses	7 à 12 mitoses	Supérieur à 12 Mitoses

- **L'immunohistochimie confirme :**
  - la présence des récepteurs hormonaux (RH), les RE, RP,
  - la surexpression de l' HER 2,
  - l'index de prolifération Ki67,
  - les emboles vasculaires.
- **Profil moléculaire des cancers du sein** [34]
  - **Luminal A** : RE positif, RP ≥ 20%, HER2 négatif, et Ki67 <20%.
  - **Luminal B non HER2** : RE positif, HER2 négatif ; et RP<20% ou Ki67≥20%.
  - **Luminal B HER2** : RE positif et/ou RP positif, HER2 positif
  - **HER2 surexprimé** : RE négatif, RP négatif et HER2 positif.
  - **Triple négatif** : RE négatif, RP négatif et HER2 négatif
- **Classification TNM et Stadification des cancers du sein** [35]

  Au terme des investigations cliniques et paracliniques, la tumeur devra être classée :

  La classification TNM
- **Taille de la tumeur : T**
  - **Tx** : la tumeur primitive ne peut être évaluée

- **T0** : la tumeur primitive n'est pas palpable
- **Tis** : présence d'un carcinome in situ ou de maladie de Paget sans tumeur décelable (Tis Paget)
- **T1** : tumeur ≤ 20 mm dans sa plus grande dimension
- **T1mi** : tumeur ≤ 1 mm dans sa plus grande dimension
- **T1a** : tumeur > 1 mm et ≤ 5 mm dans sa plus grande dimension
- **T1b** : tumeur > 5 mm et ≤ 10 mm dans sa plus grande dimension
- **T1c** : tumeur > 10 mm et ≤ 20 mm dans sa plus grande dimension
- **T2** : tumeur > 20 mm et ≤ 50 mm dans sa plus grande dimension
- **T3** : tumeur > 5cm dans sa plus grande dimension
- **T4** : tumeur de toute taille avec extension directe à la paroi thoracique (a) ou à la peau (b)
- **T4a** : extension à la paroi thoracique
- **T4b** : ulcération et / ou nodules satellites macroscopiques homolatéraux et / ou œdème cutané (y compris la peau d'orange) ne répondant pas aux critères du carcinome inflammatoire
- **T4c** : T4a et T4b sont présents
- **T4d** : carcinome inflammatoire

- **Atteinte ganglionnaire : N**
  - **Nx** : l'atteinte ganglionnaire ne peut être évaluée
  - **N0** : absence de signe d'envahissement ganglionnaire régional
  - **N1** : ganglions axillaires homolatéraux suspects mobiles
  - **N1mi** : micro métastases (environ 200 cellules, supérieures à 0,2 mm, mais aucune supérieure à 2,0 mm)
  - **N2** : ganglions axillaires homolatéraux suspects fixés entre eux ou à d'autres structures, ou présence clinique d'adénopathies mammaires internes en l'absence d'adénopathies cliniques axillaires
  - **N2a** : ganglions axillaires homolatéraux fixés

- **N2b** : ganglions mammaires internes homolatéraux cliniquement apparents sans adénopathies axillaires cliniques
- **N3** : ganglions sous-claviculaires homolatéraux ou mammaires internes avec présence d'adénopathies axillaires ou ganglions sus-claviculaires présents
- **N3a** : ganglions suspects sous-claviculaires
- **N3b** : ganglions mammaires internes et ganglions axillaires homolatéraux
- **N3c** : ganglions sus-claviculaires homolatéraux

- **Atteinte métastatique : M**
  - **Mx** : détermination impossible de l'extension métastatique
  - **M0** : absence de métastases à distance
  - **M1** : présence de métastase(s) à distance
  - **Classification par stade de l'AJCC UICC**
  - **Stade 0** : Tis N0 M0
  - **Stade I** :
  - **IA** : T1 N0 M0
  - **IB** : T0 N1mi M0 ; T1 N1mi M0
  - **Stade II** :
  - **IIA** T0 N1 M0 ; T1 N1 M0 ; T2 N0 M0 ;
  - **IIB** T2 N1 M0 ; T3 N0 M0
  - **Stade III**
  - **IIIA** T0 N2 M0 ; T1 N2 M0 ; T2 N2 M0 ; T3 N1 M0 ; T3 N2 M0
  - **IIIB** T4 N0 M0 ; T4 N1 M0 ; T4 N2 M0
  - **IIIC** Tous T N3 M0
  - **Stade IV** Tous T, Tous N, M1

1.4.2. Traitement

1.4.2.1. But

Le traitement des cancers du sein vise à obtenir la plus grande probabilité de guérison ou la plus longue survie sans rechute, avec un préjudice fonctionnel, esthétique mineur et une bonne qualité de vie.

1.4.2.2. Moyens

Le traitement des cancers du sein repose sur la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie, l'hormonothérapie, la thérapie ciblée et la psychothérapie.

1.4.2.2.1. La chirurgie [36]

Elle se présente sous deux volets :

- **la chirurgie de la tumeur primitive** : elle est conservatrice ou non conservatrice
    - **La chirurgie conservatrice** : elle consiste à enlever la zone tumorale de façon à respecter le plus possible le sein. Il peut s'agir d'une tumorectomie, d'une quadrantectomie lorsque tout un quadrant du sein est affecté, d'une zonectomie lorsque la zone tumorale est microscopique ou d'une pamectomie lorsque la tumeur intéresse la plaque aréolomammaire.
    - **La chirurgie radicale ou mastectomie** : la mastectomie respectant les pectoraux de type Patey, elle est associée à un prélèvement du ganglion sentinelle et/ou un curage axillaire. Les mastectomies enlevant les pectoraux, type Halsted, ne sont plus guère pratiquées, sauf adhérences de la tumeur aux plans musculaires. Une reconstruction mammaire immédiate ou secondaire peut être proposée [37].
- **la chirurgie des ganglions** :

    le curage ganglionnaire : il consiste en une exérèse de tous les ganglions mais est aussi associé à un taux élevé de complications

notamment le lymphœdème du membre supérieur. Il laisse progressivement place à la technique du ganglion sentinelle.

1.4.2.2.2. La radiothérapie

Elle a pour but de diminuer le risque de récidive locale ou locorégionale :

- au niveau du lit tumoral,
- pour traiter des foyers cancéreux infracliniques,
- pour traiter les zones de drainage lymphatique non opérées. [37]

1.4.2.2.3. L'hormonothérapie [37]

Elle repose sur l'hormonosensibilité de 80 % des tumeurs du sein d'autant plus nettes que la femme est ménopausée et que la tumeur comporte des récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone. Elle est de plusieurs types :

- l'hormonothérapie suppressive définitive
- l'hormonothérapie compétitive par les androgènes, les progestatifs, les antiestrogènes.

1.4.2.2.4. La chimiothérapie [37]

Il en existe plusieurs types :

- **la chimiothérapie adjuvante**
- **la chimiothérapie néoadjuvante**

Chez une patiente qui a un cancer du sein volumineux (> 3 cm) non accessible à un traitement conservateur ou inopérable d'emblée, ou une patiente avec une tumeur HER 2 ou triple négatif, une chimiothérapie dite ≪ néoadjuvante ≫ peut-être proposée. Elle a pour but de stopper la prolifération tumorale et de faire diminuer le volume tumoral avec si possible l'obtention d'une réponse histologique complète reconnue.

1.4.2.2.5. Les thérapies ciblées [38]

Les cellules cancéreuses du sein peuvent surexprimer des récepteurs spécifiques qui, lorsqu'ils sont activés, peuvent aboutir à l'expression de gènes pour la prolifération, la croissance, la migration des cellules cancéreuses.

Les thérapies ciblées contre le cancer du sein impliquent des substances ou des médicaments qui bloquent la croissance du cancer en interférant avec la fonction de molécules spécifiques, responsables de la prolifération et de la survie des cellules tumorales.

L'anticorps recombinant trastuzumab (Herceptin) cible l'HER2 est le premier médicament approuvé pour le traitement du cancer du sein avec surexpression de l'HER2.

1.5. Epidémiologie génétique du cancer du sein

1.5.1. Rappels de notions de génétique

L'épidémiologie génétique et moléculaire nécessite d'utiliser différents termes ci-dessous [39] :

- **Gène :** le gène, du latin et du grec « *genesis* » qui veut dire « naissance », est une séquence de la molécule d'Acide Désoxyribonucléique (ADN), et par conséquent d'un chromosome, qui code pour la synthèse d'une protéine dans la cellule où elle s'exprime. En association ou seul, il est responsable d'un caractère génétique. A la surface du gène, nous distinguons plusieurs régions : le promoteur qui précède la partie codante ; des parties non codantes (introns) qui alternent avec des parties codantes (exons).
- **Allèle :** un allèle est une version variable d'un même gène, c'est-à-dire une forme variée qui peut être distinguée par des variations de sa séquence nucléotidique. Il existe généralement quelques allèles pour chaque gène, mais certains gènes possèdent plusieurs dizaines d'allèles. Les allèles d'une paire de chromosomes homologues peuvent être identiques, c'est l'homozygotie, ou différents, c'est l'hétérozygotie.

- **Génome :** le génome, est l'ensemble du matériel génétique d'une espèce codé dans son ADN à l'exception de certains virus dont le génome est constitué d'acide ribonucléique (ARN). Il se décompose en séquences codantes (transcrites en ARN messagers et traduites en protéines) et non codantes (non transcrites, ou transcrites en ARN, mais non traduites). Le génome est constitué d'un ou plusieurs chromosomes dont le nombre total dépend de l'espèce considérée. Chez l'homme, le génome nucléaire est réparti sur 46 chromosomes, soit 22 paires d'autosomes et deux gonosomes (XX chez la femme, XY chez l'homme) .
- **Génotype :** le génotype est une partie donnée de l'information génétique d'un individu. Le génotype d'un individu est donc la composition allélique de tous les gènes de cet individu.
- **Phénotype :** le phénotype est l'ensemble des traits observables d'un organisme. Pour certains traits simples, la correspondance entre le génotype et le phénotype est directe, et les deux sources d'information sont redondantes. Cependant, la plupart des caractères dépendent de multiples gènes, et l'influence du milieu peut être un facteur déterminant. Dans ce cas, le génotype ne permet pas de prévoir précisément le phénotype de l'individu, mais seulement d'estimer sa valeur moyenne.
- **Next-generation sequencing (NGS) :** c'est une méthodologie moléculaire qui permet le séquençage rapide de milliers à des millions de molécules d'ADN ou d'ARN simultanément, en déterminant l'ordre unique et spécifique des bases des acides nucléiques. Cet outil permet donc le séquençage de plusieurs gènes et de plusieurs individus simultanément, en comparant la séquence du patient à une séquence de référence.

1.5.2. Facteurs de risque génétique du cancer du sein

Une transmission héréditaire pourrait être à l'origine de 10 % des cancers du sein [42]. Certains variants sporadiques ou acquis se produisent naturellement dans

certaines de nos cellules au cours de notre vie et ne se transmettent habituellement pas aux enfants. D'autres variants héréditaires sont transmis par notre père ou par notre mère dès notre conception et se trouvent dans toutes les cellules de notre corps. Les variants héréditaires présentent un risque de transmission aux enfants de 50 %. Le cancer du sein est considéré à 70% comme sporadique et à 30% comme un cancer héréditaire avec une incidence élevée. Lorsque plusieurs personnes d'une même famille sont atteintes du même cancer, il peut s'agir d'un cancer héréditaire dû à une anomalie au niveau d'un gène ; qui se transmet d'une génération à une autre. Cette anomalie est encore appelée mutation génétique. Le cancer du sein est caractérisé par des altérations génétiques irréversibles dans les cellules mamm aires. C'est une maladie hétérogène. Grâce aux progrès récents de la génétiqu e moléculaire, on sait maintenant que le cancer est une maladie de l'ADN qui résulte de l'accumulation d'événements mutationnels successifs. La prédisposition au cancer du sein fait intervenir des facteurs de risque qui sont définis comme tout ce qui affecte les chances d'une personne de contracter une maladie. 5 à 10 % des cancers du sein s'inscrivent dans un contexte de prédispositions génétiques héréditaires. La recherche a permis d'identifier un certain nombre de mutations génétiques favorisant la survenue de cancers du sein. Le plus souvent, celles-ci portent sur des gènes appelés BRCA1 (pour Breast Cancer 1 : gène 1 du cancer du sein) et le BRCA2 (pour Breast Cancer 2 : gène 2 du cancer du sein). Être porteur d'une mutation sur l'un de ces gènes ne se traduit pas systématiquement par l'apparition d'un cancer, mais augmente le risque d'en développer un. C'est ce que l'on appelle une prédisposition génétique. Il existe plusieurs autres gènes de prédisposition associant un risque élevé ou modéré de cancer du sein [43]. Dans le contexte d'une suspicion de prédisposition aux cancers du sein, le séquençage haut débit permet de réaliser un dépistage moléculaire simultané de plusieurs gènes [42]. Les premières anomalies décrites, permettent d'entrevoir quels gènes participent au processus tumoral. Les mécanismes mis en cause peuvent comporter l'activation de proto-oncogènes,

l'inactivation de gènes suppresseurs, l'expression anormale de différentes protéines. De nombreuses altérations génétiques sont probablement nécessaires pour qu'un tissu mammaire normal devienne tumoral. La grande majorité de ces altérations semble être somatique [44]. En temps normal, lorsque les mutations sont trop importantes ou nombreuses pour être réparées, la cellule s'autodétruit, par apoptose (un mécanisme de mort cellulaire programmée). Mais parfois, ces systèmes de sécurité fonctionnent mal ou ne fonctionnent plus. La cellule continue alors à se multiplier malgré la présence de mutations non réparées. Si ces dernières touchent des gènes impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire ou de l'apoptose, la cellule peut rapidement devenir incontrôlable. Elle se multiplie et conduit à la formation d'une tumeur, maligne ou bénigne. Toutefois, en règle générale, une cellule ne devient cancéreuse que lorsqu'elle a acquis une ou deux anomalies génétiques. C'est l'accumulation de nombreuses altérations au cours du temps qui lui confère les propriétés d'une cellule cancéreuse. Cela explique en partie pourquoi la fréquence des cancers augmente avec l'âge et avec la durée ou l'intensité d'exposition à des agents mutagènes. Différentes étapes ont été identifiées dans le développement d'un cancer : l'initiation, la promotion et la progression. Dans un premier temps, il se produit une lésion majeure au niveau de l'ADN d'une cellule ; il en résulte une transformation de cette cellule. Dans un second temps, la cellule transformée se développe et prolifère en formant un groupe de cellules transformées identiques. Enfin, dans un troisième temps, la cellule acquiert les caractéristiques d'une cellule cancéreuse. Elle se multiplie de façon anarchique, en perdant en partie son caractère différencié. L'évolution se fait d'abord localement, puis peut s'étendre via le sang et la lymphe à d'autres endroits du corps où se forment les métastases.

1.5.3. Différents types de mutations

On distingue 4 types de mutations génétiques :

1.5.3.1. Les mutations chromosomiques [40,41]

D'anomalies **chromosomiques** impliquent le remaniement de la structure d'un ou de plusieurs chromosomes.

Substitutions nucléotidiques : elles constituent près de 70 % des mutations. On distingue les transitions (remplacement d'une base pyrimidique (C ou T) ou purique (A ou G) par une autre base de même nature) et les transversions (remplacement d'une base purique par une base pyrimidique, ou inversement). Les substitutions nucléotidiques peuvent être induites par des agents environnementaux mutagènes (substances chimiques, rayonnements...) ou par le métabolisme endogène, mais également être la conséquence d'erreurs spontanées intervenant lors de la réplication de l'ADN, et non détectées par les systèmes de réparation. Les transitions sont en moyenne deux fois plus fréquentes que les transversions.

- **Duplication :** elle correspond à la multiplication de matériel génétique sur un chromosome. Il existe plusieurs mécanismes qui résultent de la duplication soit d'une large portion chromosomique, soit d'un gène ou bien d'une suite nucléotidique.
- **Inversion** : c'est une mutation génétique caractérisée par le renversement bout à bout d'une portion de chromatide sur un chromosome.
- **Insertion** : c'est une mutation génétique caractérisée par l'enchâssement de matériel génétique dans un chromosome. La taille d'insertion varie entre une paire de bases et tout un secteur d'un chromosome déplacé vers un autre. Dans ce dernier cas, une partie des données génétiques du premier chromosome est effacée.
- **Délétion** : c'est une mutation génétique caractérisée par la perte de matériel génétique sur un chromosome. La taille des délétions varie d'une paire de base à toute une région chromosomique. Les délétions peuvent survenir n'importe où sur le chromosome. Les grandes délétions peuvent résulter d'erreurs d'enjambement lors de la méiose, d'un enjambement inégal

(*crossing-over inégal*), d'une cassure sans réparation ou de pertes associées à un chromosome dérivé d'une translocation. Les petites délétions (de quelques nucléotides) peuvent être la conséquence d'erreur lors de la réplication de l'ADN par l'ADN polymérase réplicative.

1.5.3.2. Les mutations ponctuelles

Les **mutations ponctuelles** impliquent quant à elles la modification d'une ou de quelques paires de bases d'un seul gène, sans affecter l'organisation d'un chromosome. On peut citer :

- **La mutation non-sens** : un codon qui spécifie un acide aminé est remplacé par un codon-stop.
- **La mutation faux-sens** : dans ce cas, un nucléotide vient en remplacer un autre. Selon le cas, la mutation peut entraîner un changement de l'acide aminé codé.
- **La mutation silencieuse** : compte tenu de la redondance du code génétique, la séquence d'une protéine reste intacte, d'où l'appellation « silencieuse ».

1.5.3.3. Les mutations germinales / somatiques

Dans le cas d'une **mutation somatique,** le phénomène ne touche pas les cellules reproductrices, en conséquence, l'altération ne se poursuit pas sur plusieurs générations.

Dans le cas d'une **mutation germinale**, le phénomène touche les cellules destinées à la reproduction. L'embryon sera donc porteur du gène muté, quand bien même il n'est pas présent dans le patrimoine génétique de ses parents.

1.5.3.4. Les mutations dynamiques

Elles sont le plus souvent observées dans les maladies génétiques, telles que la chorée de l'Huntington ou la dystrophie myotonique de Steinert. Elles évoluent suivant les générations.

1.5.4. Les gènes de prédisposition génétique

- **BRCA 1 (Breast Cancer 1)**

BRCA1 fut le premier gène identifié comme gêne de susceptibilité au cancer du sein [45]. Situé sur le chromosome 17q21.31, le gène BRCA1 joue un rôle dans la réparation de l'ADN, le contrôle des points de contrôle du cycle cellulaire et le maintien de la stabilité génomique [46]. Il code pour une phosphoprotéine nucléaire, qui est un suppresseur de tumeurs, régulateur négatif de la croissance tumorale [45]. Environ 5 à 10% des patientes atteintes du cancer du sein sont porteuses d'une mutation du gène BRCA1 de type perte de fonction. Les mutations héréditaires de BRCA1 prédisposent à un risque élevé de cancer du sein [46]. Les femmes porteuses d'une mutation du gène BRCA1 développent des cancers du sein à un âge plus précoce que dans la population générale [47]. Plus de 80 % des tumeurs ayant pour origine des mutations de BRCA1 sont de phénotype triple-négatif (n'exprimant ni récepteurs des œstrogènes ni récepteur de la progestérone et ne présentant pas d'amplification du récepteur Her2 [45]. Les tumeurs BRCA1 sont plus agressives, elles apparaissent en revanche, plus sensibles aux agents cytotoxiques, ce qui améliore significativement leur pronostic.

- **BRCA 2 (Breast Cancer 2)**

Localisé sur le chromosome 13q13.1 il est impliqué dans le maintien de la stabilité génomique par la voie de la recombinaison homologue. Il répare les cassures de l'ADN double brin [48]. Les femmes porteuses d'une mutation du gène BRCA2 développent également des cancers du sein à un âge plus précoce que celles de la population générale [47]. Les tumeurs des patientes présentant des mutations de BRCA2 sont hétérogènes, sans type histologique prédominant et ressemblent aux tumeurs du sein sporadiques [45].

- **TP 53 (Protéine tumorale 53)**

Une mutation constitutionnelle du gène TP53 constitue, dans sa forme classique, le syndrome de Li Fraumeni [45]. Les mutations de ce gène confèrent un risque élevé de cancers du sein survenant à un âge très jeune (médiane de 25 ans) [49].

Le gène TP53 est un suppresseur de tumeurs jouant un rôle clé dans de nombreuses voies cellulaires contrôlant la prolifération cellulaire et la survie des cellules. Il est localisé sur le chromosome 17p13.1 et code pour la protéine p53 localisée dans le noyau de toutes les cellules de l'organisme. Le facteur de transcription p53 répond à divers stress cellulaires tels que l'hypoxie, des dommages à l'ADN, des changements dans le métabolisme pour réguler les gènes cibles qui induisent l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, la sénescence, la réparation de l'ADN. L'altération ou l'inactivation de p53 favorise des défauts au niveau des points de contrôle du cycle cellulaire, provoquant l'instabilité génomique et une survie incontrôlée des cellules conduisant à des cas de cancer [45]. TP53 se trouve altéré dans 20 à 40% des carcinomes mammaires, la fréquence de mutation varie de 15 à 71% avec une prédominance élevée chez les jeunes malades. On note environ 10% des mutations de TP53 se situent en dehors de la région conservée (Exons 5-8), parce que p53 est essentiel pour réguler la réparation de l'ADN et la division cellulaire, il a été surnommé le « gardien du génome » [45].

- **PALB2**

Le gène PALB2 est situé sur le chromosome 16. Il constitue avec BRCA2 un médiateur de la recombinaison homologue, contribuant aux mécanismes de réparation de l'ADN et à la suppression des tumeurs [50]. Une mutation bi-allélique de PALB2 est à l'origine d'une anémie de Fanconi [47], à l'instar de ce qui a été observé pour une mutation bi-allélique de BRCA2 [19,45]. Les études estimant le risque de cancer du sein chez les femmes porteuses de mutations du gène PALB2 rapportent un risque très élevé, voisin de celui observé chez les femmes porteuses de mutations des gènes BRCA1 ou BRCA2. Le niveau de risque de cancer du sein chez les femmes porteuses d'une mutation du gène PALB2 est considéré comme très élevé. L'analyse du gène PALB2 est systématiquement réalisée lorsque le contexte personnel ou familial est évocateur

d'un syndrome dit HBOC (hereditary breast and ovarian cancer) chez les femmes (atteintes de cancer) [45].

- **PTEN (Homologue de la Phosphatase et de la Tensine)**

Le gène PTEN (phosphatase and tensin homolog) est un gène suppresseur de tumeur localisé sur le chromosome 10, en 10q23.3 [51]. Un dysfonctionnement de PTEN empêche l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose et conduit à une survie anormale des cellules [52]. Une mutation germinale avec perte de fonction de PTEN peut conduire au syndrome de Cowden [53]. Les patientes porteuses d'une mutation germinale du gène PTEN ont un risque augmenté de cancer du sein : 50 % développent un cancer du sein au cours de leur vie, à un âge moyen de 40 ans, avec parfois des diagnostics très précoces d'histologie pathognomonique : carcinome canalaire [45].

- **STK 11 (Sérine Thréonine kinase 11)**

Le gène STK11 (sérine/thréonine kinase 11) est un gène suppresseur de tumeurs [45] situé sur le chromosome 19, en 19p13.3. Il participe à la signalisation et à l'apoptose. Une mutation germinale de STK11 est à l'origine du syndrome de Peutz-Jeghers10 [54], et les patientes mutées présentent un risque augmenté de cancer du sein [47].

- **CHEK2 (Point de Contrôle kinase 2)**

Le gène CHEK2 (checkpoint kinase 2) est un gène suppresseur de tumeur [55] situé sur le chromosome 22 [45]. Il code une sérine-thréonine kinase qui est activée lors de cassures double-brin de l'ADN [56] et contribue à la transduction des signaux qui conduiront à la réparation de l'ADN [57].

- **ATM (Ataxie Télangiectasie Mutée)**

Le gène ATM est situé sur le chromosome 11. Il joue un rôle pivot dans la réparation de l'ADN et la progression du cycle cellulaire [58]. Une mutation germinale bi-allélique de ce gène est à l'origine du syndrome pédiatrique [47] ataxie-télangiectasie à la révélation dans l'enfance, caractérisé par une ataxie cérébrale [45], des télangiectasies caractéristiques, une immunodéficience et un

risque accru de tumeurs malignes, notamment mammaires et gastriques. Dans un contexte familial d'enfants atteints d'ataxie télangiectasie, le niveau de risque de cancer du sein chez les femmes porteuses d'une mutation du gène ATM semble élevé [59].

2. CADRE ET METHODE D'ETUDE

2.1. Cadre d'étude

L'étude s'est déroulée dans :

- deux centres hospitalo-universitaires de référence à l'échelle nationale pour la prise en charge des cancers du sein au Bénin (CNHU-HKM et CHU-MEL),
- le laboratoire d'Histologie, de Biologie de la Reproduction, Cytogénétique et Génétique Médicale (LHBRCGM) à Cotonou,
- le laboratoire d'anatomie et de cytologie pathologique DUBOIS à Cotonou,
- le service d'anatomie pathologique du CHU Dupuytren à Limoges en France,
- le laboratoire d'Epidémiologie des Maladies Chroniques en zone Tropicale (EpiMaCT) à Limoges en France.

2.1.1. Le Centre National Hospitalier Universitaire Hubert KOUTOUKOU MAGA (CNHU-HKM) de Cotonou

Le **CNHU-HKM** est un hôpital de référence au Bénin qui a été créé en 1962 sous le nom de « hôpital 350 lits ». De 1976 à 2001, il a porté le nom de Centre National Hospitalier et Universitaire (CNHU), avant d'être rebaptisé Centre National Hospitalier Universitaire Hubert KOUTOUKOU MAGA (CNHU-HKM). Le CNHU-HKM est un centre de soins, d'enseignement, de recherche et de formation pour les agents de santé de tous les niveaux. Le service impliqué dans notre étude a été la Clinique Universitaire de Chirurgie Viscérale.

La Clinique Universitaire de Chirurgie Viscérale (CUCV) a été créée le 1er juillet 1989 au CNHU-HKM, elle dispose d'un pavillon d'hospitalisation d'une capacité totale de 39 lits et de deux salles d'opération au bloc opératoire central. Les activités du service sont réalisées par deux Professeurs Titulaires, trois Maîtres de Conférences Agrégés (MCA), deux chirurgiens, un surveillant, une secrétaire, huit infirmiers et sept aides-soignants. Le service reçoit différentes catégories de stagiaires : les médecins en spécialisation, les étudiants en médecine

générale, les élèves infirmiers et des étudiants en nutrition. Certaines patientes de notre étude ont été prélevées dans ce service.

2.1.2. Le Centre Hospitalier Universitaire de la Mère et de l'Enfant Lagune (CHU-MEL)

Créé depuis 1958, le CHU-MEL est un établissement public à caractère social, un hôpital de référence dans les domaines de la gynécologie, de l'obstétrique et de la pédiatrie. Il est divisé en plusieurs services. Nous nous sommes intéressées au service de gynécologie-obstétrique et de médecine de la reproduction. Certaines patientes de notre étude ont été prélevées dans ce service.

2.1.3. Le laboratoire d'Histologie, de Biologie de la Reproduction, Cytogénétique et Génétique Médicale (LHBRCGM)

Ce laboratoire est logé dans le bâtiment de l'Institut des Sciences Biomédicales Appliquées (ISBA) à la Faculté des Sciences de la Santé (FSS) de Cotonou. Il comporte plusieurs salles que sont : la salle d'accueil des patients, la salle réservée aux techniciens et stagiaires, les salles de manipulation, les salles de microscopie, la salle polyvalente, la salle de métrologie, la salle de culture et le bureau du professeur. Il compte : un Professeur Titulaire, qui est le directeur du laboratoire, un Maître de Conférence Agrégé, un attaché de recherche qui est responsable du plateau technique et de la gestion du laboratoire, trois techniciens qui sont chargés des travaux. Les extractions d'ADN à partir des échantillons de
notre étude prospective ont été réalisées dans ce laboratoire.

2.1.4. Le laboratoire d'anatomie et de cytologie pathologique DUBOIS

C'est un laboratoire privé d'analyse médicale spécialisé dans les explorations en anatomie et cytologie pathologique. Il effectue des examens macroscopiques et des techniques de cytologie pathologique. Il est situé à Fifadji dans le même bâtiment que la Clinique de Cancérologie de Cotonou. Il dispose d'une salle d'accueil, d'une salle de prélèvement et d'un laboratoire équipé. Son personnel

est constitué de deux médecins spécialistes d'anatomie et de cytopathologie, deux techniciens supérieurs de laboratoire et d'une secrétaire. L'ensemble des échantillons de notre étude rétrospective a été inclus en paraffine dans ce laboratoire.

2.1.5. Le laboratoire d'Epidémiologie des Maladies Chroniques en zone Tropicale (EpiMaCT)

Le laboratoire EpiMaCT, est une unité monothématique dont les tutelles sont l'Université de Limoges, l'Inserm, l'IRD et le CHU de Limoges. Cette unité est localisée sur le campus de Marcland dans les locaux des Facultés de Médecine et de Pharmacie de Limoges (France). L'unité implique près de 75 personnes dont 20 enseignants-chercheurs, 17 autres membres (chercheurs, praticiens hospitaliers), 13 techniciens, 21 doctorants et 4 post-doctorats. L'extraction d'ADN à partir des blocs de paraffine de notre étude rétrospective a été réalisée dans ce laboratoire. Les séquençages des études rétrospectives et prospectives ont été réalisés dans le laboratoire EpiMaCT.

2.1.6. Le service d'anatomie pathologique du CHU Dupuytren

Le service d'anatomie pathologique réalise les examens des pièces opératoires et des biopsies. L'ensemble des blocs de notre étude rétrospective a été analysé dans ce laboratoire afin de délimiter la zone tumorale avant extraction d'ADN.

2.2. Méthode d'étude

2.2.1. Type d'étude

Il s'est agi d'une étude transversale descriptive à la fois rétrospective et prospective.

2.2.2. Période d'étude

La partie rétrospective a intéressé la période du 01 Janvier 2015 au 31 Décembre 2019.

La partie prospective a intéressé la période du 07 Février au 31 Octobre 2022.

2.2.3. Population d'étude

- **La partie rétrospective** a porté sur des blocs de cancer du sein histologiquement confirmé fixés au formol et inclus en paraffine et les observations médicales de ces mêmes patientes.
- **La partie prospective** a porté sur des prélèvements tissulaires de tumeur de patientes atteintes d'un cancer du sein histologiquement confirmé.

2.2.4. Critères d'inclusion et de non inclusion

2.2.4.1. Critères d'inclusion

- **Partie rétrospective** : ont été inclus des blocs de tumeur du sein de patientes diagnostiquées et prises en charge pour un cancer de sein au CNHU-HKM ou au CHU-MEL entre 2015 et 2019.
- **Partie prospective** : ont été incluses, les patientes vues en consultation ou hospitalisées au CNHU/HKM ou au CHU-MEL du 07 Février au 31 Octobre 2022, pour une tumeur de sein suspecte d'être un cancer et dont le diagnostic a été ultérieurement confirmé par l'examen anatomopathologique.

2.2.4.2. Critères de non inclusion

- **Partie rétrospective** : les blocs de tumeur du sein fixés au formol et inclus en paraffine dont les dossiers cliniques correspondant n'ont pas été retrouvés.
- **Partie prospective** : les patientes n'ayant pas donné leur consentement éclairé.

2.2.5. Echantillonnage

2.2.5.1. Taille de l'échantillon

- **Parte rétrospective** : la taille a été déterminée par commodité. Il était prévu d'inclure 25 blocs de tumeur du sein dans l'étude.
- **Partie prospective** : la taille a été déterminée par commodité. Il était prévu d'inclure 16 patientes atteintes du cancer du sein.

2.2.5.2. Technique d'échantillonnage

- **Partie rétrospective** : il s'est agi d'un échantillonnage aléatoire de 25 blocs de tumeur du sein, histologiquement confirmés et disposant d'une immunohistochimie sur les 325 disponibles au laboratoire DUBOIS.
- **Partie prospective** : il s'est agi d'un échantillonnage non probabiliste de convenance.

2.2.6. Variables étudiées

Les variables socio-démographiques recueillies étaient :

- l'âge,
- la profession,
- le niveau d'instruction,

Les caractéristiques cliniques étudiées étaient :

- le motif de consultation,
- les caractéristiques de la tumeur,
- les antécédents personnels,
- les antécédents familiaux,

La caractéristique paraclinique étudiée était le type histologique.

2.2.7. Outils et technique de collecte des données

2.2.7.1. Source de données

- **Partie rétrospective** : les données ont été obtenues à partir des observations médicales des patientes que nous avons recherchés dans les archives du CNHU/HKM et du CHU-MEL. Des éléments complémentaires ont été obtenus par des appels téléphoniques aux patientes ou aux familles des patientes lorsqu'un numéro téléphonique était disponible dans l'observation médicale.
- **Partie prospective** : les données provenaient d'un entretien face à face avec les patientes, des dossiers des patientes, des comptes-rendus d'examen anatomo-pathologique et d'imagerie médicale.

2.2.7.2. Outil de collecte

Pour la collecte nous avons utilisé deux fiches standardisées individuelles préétablies contenant les variables détaillées plus haut :

- une fiche adaptée pour la partie rétrospective
- une autre fiche adaptée pour la partie prospective

Les deux fiches sont présentées en annexe.

2.2.8. Déroulement de l'enquête

- **Partie rétrospective :** les données ont été obtenues à partir de la base de données issue du travail épidémiologique en milieu hospitalier réalisé au sein du laboratoire LEMACEN. Les blocs ont été recherchés au laboratoire d'anatomie et de cytogie pathologique DUBOIS.
- **Partie prospective** : pendant la période qui s'étendait du 07 Février au 31 Octobre 2022, les patientes vues en consultation ou hospitalisées au CNHU/HKM ou au CHU-MEL pour une tumeur du sein suspecte d'être un cancer du sein étaient informées de l'étude. Un consentement écrit était signé lorsqu'elles acceptaient d'y participer. Un micro fragment biopsique

était recueilli lors de la biopsie diagnostique ou de l'intervention chirurgicale. Les dossiers de ces patientes, les comptes rendus d'examen anatomo-pathologique et d'imagerie médicale ont été également exploités.

2.2.9. Etude génétique

2.2.9.1. Partie rétrospective

2.2.9.1.1. Traitement des blocs de paraffine

Les blocs de tumeur du sein fixés au formol et inclus en paraffine ont été envoyés au laboratoire d'anatomie pathologique du CHU de Limoges en France par avion.

2.2.9.1.2. Extraction de l'ADN

Des blocs avaient été confiés au préalable au service d'anatomie pathologique du CHU Dupuytren de Limoges afin de déterminer les zones riches en cellules tumorales par réalisation d'une coupe sur lame colorée par Hématoxyline/Eosine/Safran (HES). Pour certains blocs qui s'étaient avérés de mauvaise qualité, une nouvelle fixation au formol et inclusion en paraffine avait été réalisée. La figure 4 montre la technique d'identification de la région riche en cellules tumorales.

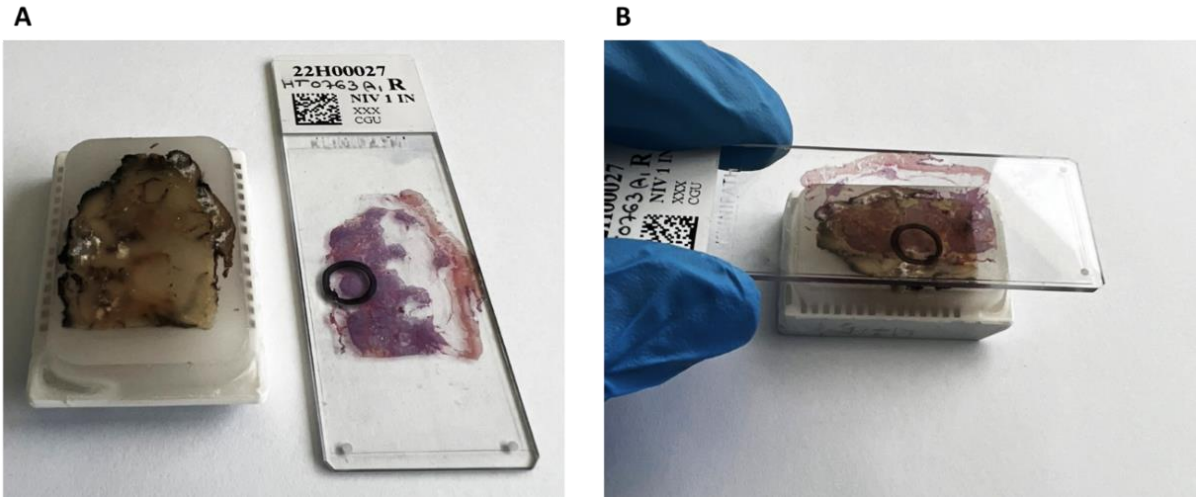


Figure 4: technique d'identification de la région riche en cellules tumorales.

Source : Dr Alexis PARENTE, Université de Limoges-France, 2022

L'ADN génomique des blocs était extrait à l'aide du kit GeneReadTM DNA FFPE Kit (Qiagen) et s'sest fait sur 2 jours consécutifs. La zone tumorale sélectionnée avait été prélevée par grattage avec un scalpel stérile par superposition avec la lame colorée sur le bloc de parrafine et transféré dans un tube eppendorf. Le prélèvement était déparaffiné par ajout de 160µl de tampon « Déparaffinisation » et était incubé à 56°C pendant 3 minutes. Ensuite, 55µl d'eau « Rnase Free », 25µl de tampon FTB et 20µl de protéinase K étaient ajoutés à l'échantillon qui était alors incubé à 56°C sur la nuit. Après incubation d'une heure à 80°C, la phase claire était transférée dans un tube eppendorf et 115µl d'eau « Rnase Free » était ajouté ainsi que 35µl UNG. Le tube était alors incubé à 50°C pendant 1 heure. 250µl de tampon AL et 250µl d'éthanol absolu étaient ajoutés. L'ensemble était transféré sur une colonne Qiagen puis était centrifugé à 13000 rpm durant une minute. La colonne avait été lavée par ajout de 500µl de tampon AW1, 500µl de tampon AW2 et 250µl d'éthanol absolu, puis centrifugation à vitesse maximale durant 1 minute. Les ADNs génomiques étaient élués par ajout de 20µl de buffer ATE, puis incubation à température ambiante pendant 5 minutes. L'ADN était congelé pour conservation.

2.2.9.2. Partie prospective

2.2.9.2.1. Prélèvements tissulaires

2.2.9.2.2. Conservation des fragments tissulaires

Les fragments tissulaires issus d'une micro biopsie ou d'un prélèvement tissulaire étaient conservés dans du sérum physiologique stérile et acheminé immédiatement au laboratoire LHBRCGM. L'échantillon était congelé à -20°C.

2.2.9.3. Extraction de l'ADN à partir de biopsie

L'extraction était faite en suivant le manuel du kit DNeasy Blood & Tissue Kit. Après avoir décongelé un fragment de biopsie, 25 mg de tissu étaient coupés à l'aide d'un scalpel et déposé dans un tube Eppendorf de 1,5ml. 180µl de tampon

ATL et 20µl de protéinase K étaient déposés dans le tube Eppendorf de 1,5ml contenant le tissu. Le mélange obtenu était ensuite vortexé et incubé à 56°C pendant 3 heures jusqu'à dissolution complète du tissu.

Après cette étape de digestion complète, 200µl de tampon AL était complété au produit puis porté sur vortex pendant 15s. Le mélange obtenu était incubé à 70°C pendant 10min. Le nouveau mélange obtenu était centrifugé brièvement puis 200µl d'éthanol absolu était ajouté et vortexé pendant 15 secondes. Le mélange obtenu était déposé sur une mini colonne QIAamp et centrifugé à 8000 tours / minute pendant 1min 30 secondes. À la fin de la centrifugation le tube collecteur était vidé. Sur la mini colonne QIAamp contenant le mélange, 500µL de tampon AW1 était ajouté. Ce mélange était aussi centrifugé à 8000 tours / minute pendant 1min 30 secondes. Le nouveau tube collecteur était vidé. Sur la mini colonne QIAamp contenant le mélange, 500µL de tampon AW2 était ajouté. À cette étape le mélange était centrifugé à 14000 tours / minute pendant 4 minutes 30 secondes. À la fin de la centrifugation le tube collecteur était vidé. A la dernière étape, la mini colonne QIAamp contenant l'ADN était placé sur un tube Eppendorf de 1,5ml préalablement identifié. 100µL de tampon AE était ajouté pour l'élution de l'ADN. Ensuite la mini colonne QIAamp était centrifugée à 18000 tours / minutes pendant 2 minutes. L'ADN était congelé pour conservation. La figure 5 montre l'extraction de l'ADN à partir de biopsie.



Figure 5: extraction de l'ADN à partir de biopsie

SOURCE : Pr Anatole LALEYE, Laboratoire d'Histologie, de Biologie de la Reproduction, Cytogénétique et Génétique Médicale-Cotonou, 2022

2.2.10. Dosage de la quantité d'ADN

La quantité de l'ADN pour chaque échantillon extrait était mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre en utilisant un volume de 1µl de l'échantillon avec une longueur d'onde de 230nm. La figure 6 montre le dosage de la quantité de l'ADN au spectrophotomètre.



Figure 6: dosage de la quantité de l'ADN au spectrophotomètre

SOURCE : Pr Anatole LALEYE, Laboratoire d'Histologie, de Biologie de la Reproduction, Cytogénétique et Génétique Médicale-Cotonou, 2022

2.2.11. Dosage de la qualité d'ADN : la PCR quantitative

La PCR quantitative (qPCR) était utilisée pour évaluer la qualité des échantillons extraits. La réaction de qPCR était réalisée dans un volume final de 20µl à l'aide de QuantStudio™ 3 Real-Time PCR Instrument. Environ 6ng d'ADN étaient ajoutés au Mix PCR (10µl de Master Mix 2X Meltdoctor SYBRE Green ; 0,2µl d'amorce sens à 10µM ; 0,2µl d'amorce antisens à 10µM et 8,1µl d'H_2O). Trois gènes contrôles étaient amplifiés en utilisant 3 couples d'amorce spécifiques : le gène HPRT (Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transférase), le gène ALB (Albumine) et le gène TBP (Tata Box-Binding Protéine). Les réactions d'amplification étaient réalisées en tripliquât. Le programme thermocycleur était de 45 cycles : 96°C pendant 15 secondes (séparation des deux brins d'ADN), 60°C pendant 1 minute (hybridation des amorces), 68°C pendant

2 minutes (élongation). Les résultats étaient analysés grâce au logiciel QuantStudio™. La taille des amplicons attendue pour chaque région amplifiée pour les gènes ALB, HPRT et TBP était de 63pb, 160pb et 295pb respectivement. Pour chaque amplification, une courbe de fluorescence était tracée par rapport au cycle. La valeur de Ct (Cycle Threshold) était déterminée dans la phase exponentielle, à l'intersection de la ligne de bruit de fond avec la courbe de fluorescence.

2.2.12. Préparation de librairie pour le séquençage haut débit par capture

La préparation de librairies était réalisée à l'aide du kit SOPHIA GENETICS suivant les recommandations du fournisseur par la Plateforme Génétique Moléculaire des Cancers du CHU (PGMC). Le séquençage était effectué sur le panel GREAT (SOPHIA GENETICS) pour la recherche sur 20 gènes de prédisposition au cancer du sein : ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDK12, CHEK1, CHEK2, FANCA, FANCD2, FANCL, MRE11, NBN, PALB2, PPP2R2A, RAD51B, RAD51C, RAD51D, RAD54L, TP53.

2.2.13. La réaction de polymérisation en chaine

Préalablement au séquençage de Sanger et pour confirmer les résultats issus du séquençage NGS, une amplification ciblée par PCR était réalisée. Les deux régions génomiques d'intérêt étaient amplifiées à l'aide de deux couples d'amorces spécifiquement conçus avec le logiciel Primer3 Input (version 0.4.0). Les tailles d'amplicon attendues étaient de 225 paires de base (pb) pour le gène TP53 et de 100 pb pour le gène BRCA2. La PCR était réalisée dans un volume réactionnel final de 50µl. Environ 40ng d'ADN étaient ajoutés au mix PCR. Le programme thermocycleur était réalisé à l'aide du SimpliAmp™ (Applied Biosystems®) suivant : 5min à 94°C, suivi de 35 cycles répétés de 30s à 94°C, 30s à 58°C, 45s à 72°C et une extension finale à 72°C durant 5 minutes. 10µl du produit PCR étaient soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 2% pour vérifier que la taille des amplifications est correcte.

2.2.14. Séquençage de Sanger

Le séquençage était réalisé après amplification par PCR des régions d'intérêts après purification. Pour cela :

- la réaction de purification du produit PCR était réalisée dans un volume final de 14µl : 10µl produit PCR et de 4µl ExoSapStar™ (Illustra™). Le programme de thermocyclage était le suivant : 37°C pendant 60 minutes et 80°C durant 15 minutes.
- la réaction de séquençage était réalisée avec l'amorce sens ou antisens : 5µl de mix de séquençage + 1µl d'amorce sens ou antisens à 10µM + 7µl produit du PCR purifié. Le programme de séquençage était le suivant : 3 min à 94°C, 25 cycles : 96°C pendant 10s, Tm des amorces pendant 5s et 60°C pendant 4min.

  Purification de séquence avant injection (Chromatographie d'exclusion) : 400µl de la solution de Séphadex™ G-50 (GE Healthcare) était ajouté dans les plaques à fond filtrant, centrifuger 3min à 2500rpm ; dépôt de 20µl de séquence au centre sur la colonne puis centrifugation pendant 3min à 2500rpm ; élimination du volume de réaction de séquençage en utilisant un bain marie à sec à une température de 94°C durant 17min, la plaque reste ouverte pour permettre l'évaporation. Reprendre dans 10µl de formamide, dénaturation pendant 3min à 94°C puis la plaque était placée dans la glace pendant 3min ; transfert des séquences dans la microplaque 96 puits adapté au séquenceur Applied, puis identification et dépôt de la plaque dans le service de séquençage du CHU.

3.2.15. Traitement et analyse des données

Les résultats ont été saisis sous forme de texte dans le logiciel WORD 2019. Les graphiques ont été réalisés dans EXCEL 2019.

3.2.16. Considérations éthiques

L'étude a été réalisée dans la confidentialité de l'identité des patientes.

Ce projet a été validé par le Comité National d'Éthique pour la Recherche en Santé (CNERS) de Cotonou (Bénin) en décembre 2021 (N°007-2021/UAC/CERSS/P/SG/R/SA). Des mesures de sécurité strictes ont été appliquées pour assurer cette confidentialité.

Les formulaires remplis ont été stockés dans une armoire verrouillée au niveau du Laboratoire d'Epidémiologie des Maladies Chroniques et Neurologiques (LEMACEN) à la Faculté des Sciences de la Santé. Leur accès était limité aux seules personnes autorisées. L'accès à la base de données numérique était strictement limité et réservé à l'équipe de recherche. Elle est conservée dans un ordinateur, et protégée par un nom d'utilisateur et un mot de passe. Les fichiers étaient anonymes et codés avant tout transfert par support électronique ou e-mail.

3.2.17. Difficultés rencontrées

Cette étude ayant un volet rétrospectif, nous avons été confrontée à certaines difficultés :

- le mauvais archivage des dossiers a fait que nous avons eu des difficultés à les retrouver. Cela a allongé la durée de la collecte des données
- le mauvais remplissage des données de l'adresse et des numéros de téléphone dans les dossiers a fait que certains sujets n'ont pu être contactés pour le dernier contrôle. Par ailleurs, certaines patientes avaient changé d'adresse et n'étaient donc plus joignables.

3. RESULTATS

3.1. Partie rétrospective

3.1.1. Caractéristiques des patientes

3.1.1.1. Caractéristiques socio démographiques des patientes

Age des patientes

L'âge moyen des patientes était de 47,1ans ± 10,3. La patiente la plus âgée avait 75 ans et la moins âgée 31 ans.

3.1.1.2. Antécédents

3.1.1.2.1. Antécédents personnels médicaux

L'hypertension artérielle était le principal antécédent médical des patientes : 20% soit 5/25.

3.1.1.2.2. Antécédents familiaux de cancer

Les antécédents familiaux de cancers du sein ont été recherchés dans 25 dossiers. Seul 1/25 avait un antécédent familial de cancer.

3.1.1.3. Types histologiques

Le Tableau II présente les types histologiques des tumeurs

Tableau II: types histologiques des tumeurs

	Effectif (n)	Fréquence (%)
C. canalaire infiltrant	22	88,0
C. mucineux	2	8,0
C. canalaire in situ	1	4,0
Total	25	100,0

Le type histologique le plus fréquemment rencontré est le carcinome canalaire infiltrant, soit 88%.

3.1.2. Faisabilité d'analyse génétique à partir de blocs de paraffine

3.1.2.1. Quantité d'ADN

Après extraction de l'ADN sur les vingt-cinq blocs, la quantité des ADN mesurées, variait de 19,4 à 631,2 ng/µl. Le Tableau III résume l'analyse de la quantité des vingt-cinq ADN extraits des blocs.

Tableau III: analyse de la quantité des vingt-cinq ADN extraits des blocs

	Numéro des blocs	Quantité D'ADN (ug/uL)
1	HT0879 A4	245,8
2	HT1989 A7	312,1
3	HT1167 A1	19,4
4	HT1617 A4	378,8
5	HT0412 A4	253,1
6	HT2056 A3	294,9
7	HT1887 A10	240,9
8	HT1051 A1	240,1
9	HT0598A2	508
10	HT0888B1	511,3
11	HT1090A3	107
12	RC1140A5	88,2
13	HT0651A4	376,1
14	HT0849A7	146
15	HT2156 A2	186,9
16	HT0410 A3	440,7
17	HT0046 A2	270,6
18	HT0041B	730
19	RC115 A3	223
20	HT0763 A1	631,2
21	HT0208 A2	121,2
22	HT0185 A1	25
23	RC3792A1	123
24	HT0912A9	302
25	2175A13	522

3.1.2.2. Qualité d'ADN

Afin de vérifier la qualité des ADN génomiques, une PCR quantitative (Sybr Green) a été réalisée sur deux ADN ainsi que sur un ADN contrôle commercial (ADN témoin T+) en utilisant trois couples d'amorces pour amplifier les gènes HPRT, ALB et TBP respectivement. Le premier couple amplifie l'intron 7 du gène HPRT et génère un fragment de 63 pb. Le deuxième couple amplifie l'intron 11-12 du gène ALB et génère un fragment de 160 pb. Le troisième couple amplifie l'intron 6 du gène TBP et génère un fragment de 295 pb. Après vérification de la spécificité des différents couples d'amorces, la qualité des échantillons a été vérifiée par l'analyse de la courbe d'amplification des gènes (en tripliquât) pour chaque échantillon. L'ADN du bloc 2175A13 présente une amplification pour les trois gènes testés alors que l'ADN du bloc HT0912A9 ne présente pas d'amplification pour ces différents gènes (sauf pour 1 tripliquât pour le gène HPRT). Entre l'ADN témoin (T+) et celui issu du bloc 2175A13, aucune grande différence de CT n'est observée confirmant ainsi la bonne qualité de l'ADN obtenu à partir de ce bloc. En revanche, celui issu du bloc HT0912A9 est dégradé malgré une concentration de 302 ng/µl d'ADN. La figure 8 montre la comparaison des courbes d'amplification en qPCR de trois échantillons d'ADN et le Tableau V montre l'analyse de la qualité des deux ADN extraits de blocs FFPE.

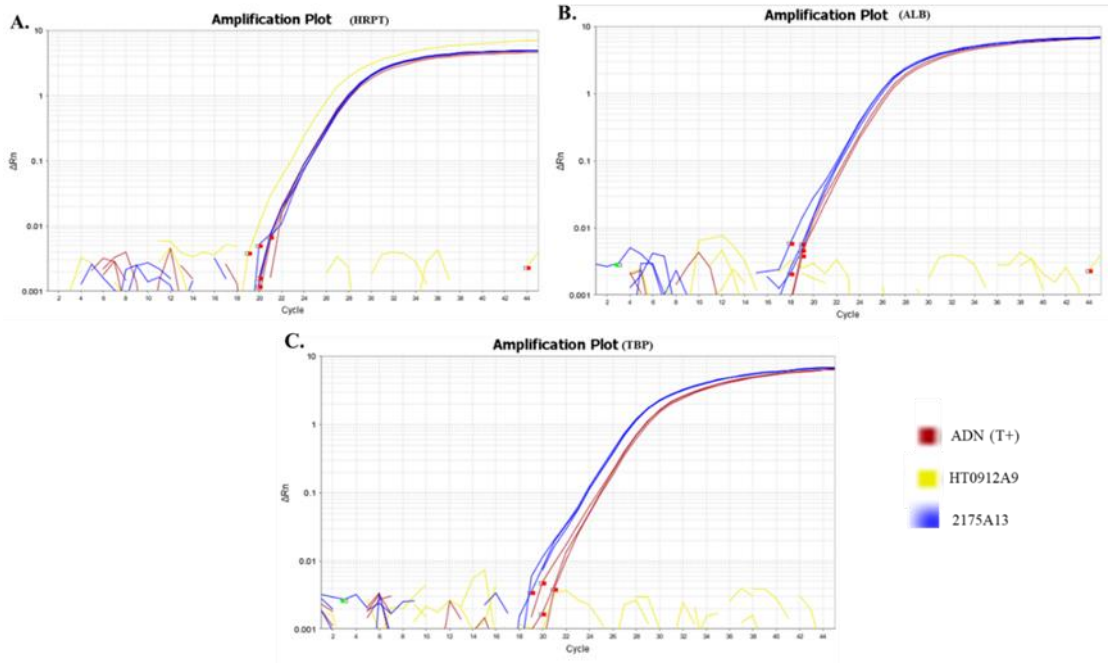


Figure 7: comparaison des courbes d'amplification en qPCR de trois échantillons d'ADN

Tableau IV: analyse de la qualité des deux ADN extraits de blocs FFPE

	QUALITE D'ADN (µg/µl)								
NUMERO DES BLOCS	HPRT			ABL			TBP		
ADN (T+)	25,79	25,86	24,37	23,71	23,5	23,5	25,8	25,7	25,1
HT0912A9	33,1	/	/	/	/	/	/	/	/
2175A13	25,9	25,8	26,08	24,85	25,02	24,91	27,05	27,21	26,98

3.1.2.3. Extraction en série des différents blocs mise à disposition

Concernant la qualité des vingt-trois autres ADN extraits, nous avons décidé de ne pas montrer l'ensemble des courbes d'amplification mais de présenter un tableau bilan présentant les valeurs de Ct (valeur seuil). Ainsi, trois blocs présentent une amplification pour les trois gènes, huit blocs présentent une amplification pour deux des gènes (HPRT et ALB) et cinq blocs présentent seulement une amplification pour le gène HPRT. Enfin, sept blocs ne présentent aucune amplification pour les différents gènes testés. Le tableau V montre l'analyse de la qualité des vingt-trois ADN extraits de blocs.

Tableau V: analyse de la qualité des vingt-trois ADN extraits des blocs

	NUMERO DES BLOCS	QUANTITE DES ADN (ug/uL)	HPRT			ALB			TBP		
1	HT0879 A4	245,8	/	/	/	/	/	/	/	/	/
2	HT1989 A7	312,1	36,9	36,8	36,6	/	/	/	/	/	/
3	HT1167 A1	19,4	/	/	/	/	/	/	/	/	/
4	HT1617 A4	378,8	/	/	/	/	/	/	/	/	/
5	HT0412 A4	253,1	38,3	43,43	36,4	/	/	/	/	/	/
6	HT2056 A3	294,9	33,9	36,6	34,9	/	/	/	/	/	/
7	HT1887 A10	240,9	33,1	32,74	32,9	/	/	/	/	/	/
8	HT1051 A1	240,1	32,6	32,3	32,1	42,7	/	/	/	/	/
9	HT0598A2	508	/	/	/	/	/	/	/	/	/
10	HT0888B1	511,3	/	/	/	/	/	/	/	/	/
11	HT1090A3	107	33,8	33,8	34	34,8	/	/	/	/	/ (38 ?)
12	RC1140A5	88,2	34,6	34	34,3	38,4	/	/	/	/	/
13	HT0651A4	376,1	/	/	/	/	/	/	/	/	/
14	HT0849A7	146	/	/	/	/(36,9?)	/	/	/	/	/
15	HT2156 A2	186,9	32,8	31,7	31,9	/	36,9	/	/	/	/
16	HT0410 A3	440,7	26,8	26,5	26,7	27,7	27,3	27,5	39,9	37,2	36,9
17	HT0046 A2	270,6	27,9	28,2	28	28,9	28,6	28,8	38,7	39,2	/
18	HT0041B	730	27,4	27,5	27,1	29,7	29,7	28,6	/	/	/
19	RC115 A3	223	31,63	31,1	31,1	33,8	32,9	34,4	/	/	/
20	HT0763 A1	631,2	36,9	/	34,3	/	/	/	/	/	/
21	HT0208 A2	121,2	29,24	29,65	29,377	34,19	34,23	34,92	/	/	/
22	HT0185 A1	25	29,7	29,7	29,8	30,8	32,5	31,1	/	/	/
23	RC3792A1	123	31,5	32	32,7	25,3	25,2	25,31	28,3	28,03	28,11

3.1.2.4. Résultats du Séquençage NGS

Trois blocs ont été choisis pour le séquençage NGS :

- le bloc HT0912A9 ayant donné des ADN de mauvaise qualité.
- le bloc 2175A13 ayant donné des ADN de bonne qualité.
- le bloc RC3792A1 ayant donné des ADN de très bonne qualité.

Le séquençage de l'ADN issu du bloc HT0912A9 n'a donné aucun résultat dû à la très mauvaise qualité de l'ADN.

Le séquençage de l'ADN issu du bloc 2175A13 montre que la patiente présente 2 mutations pathogènes :

- une mutation dans le gène BRCA2 correspondant à une substitution d'un C en T en position 376 dans l'exon 4,
- une mutation dans le gène TP53 correspondant à une Indel (Insertion+ Délétion) : une délétion de 8 nucléotides de la position 197 à 204 ainsi qu'une insertion d'un nucléotide A dans l'exon 4.

Le séquençage de l'ADN issu du bloc RC3792A1 montre que la patiente présente une mutation pathogène dans le gène BRCA2 correspondant à une substitution d'un G en T en position 1609 dans l'exon 10.

3.1.2.5. Validation des mutations par séquençage Sanger

Afin de vérifier la présence des deux mutations de la patiente 2175A13, le séquençage Sanger de ces deux différentes régions a été entrepris. Des couples d'amorces spécifiques à ces régions ont été conçus. Le tableau VI montre la liste des couples d'amorces utilisés pour la réaction de la PCR.

Tableau VI: liste des couples d'amorces utilisés pour la réaction de la PCR

Gènes	Amorces	Tm	Tailles attendues
BRCA2-EX4-2	**AF :** CAGGAAGGAATGTTCCCAAT **AR:** CAAGAATTTAGAAGTGGACAGG AA	55°C 57°C	100pb
TP53-EX4-del-F	**AF** : AATGGATGATTTGATGCTGTCC **AR** : AAGAAGCCCAGACGGAAACC	58°C 59°C	225pb

Pour le gène BRCA2, la région ciblée de l'exon 4 a bien été amplifiée par PCR avec une amplification de 100 pb. Le séquençage Sanger d'un échantillon contrôle commercial versus de notre échantillon montre bien une substitution d'un C en T en position 376 dans l'exon 4. Cette mutation est hétérozygote (ou monoallélique)

puisqu'un double « pic » est retrouvé à la position 376 : l'allèle sauvage C et l'allèle mutant T.

Pour le gène TP53, la région ciblée de l'exon 4 a bien été amplifiée par PCR avec une amplification de 225 pb. Le séquençage Sanger d'un échantillon contrôle commercial versus de notre échantillon montre bien une délétion de 8 nucléotides de la position 197 à 204 (CTCTGGCA) ainsi que l'insertion d'un nucléotide A. Comme pour la mutation précédente, cette indel est hétérozygote (monoallélique) puisque des doubles pics sont retrouvés tout au long de la séquence sur le chromatogramme mutant après la mutation. L'ensemble de ces résultats valide les résultats précédemment obtenus lors du séquençage NGS. La figure 9 montre le résultat d'amplification des deux régions présentant une mutation lors du séquençage NGS.

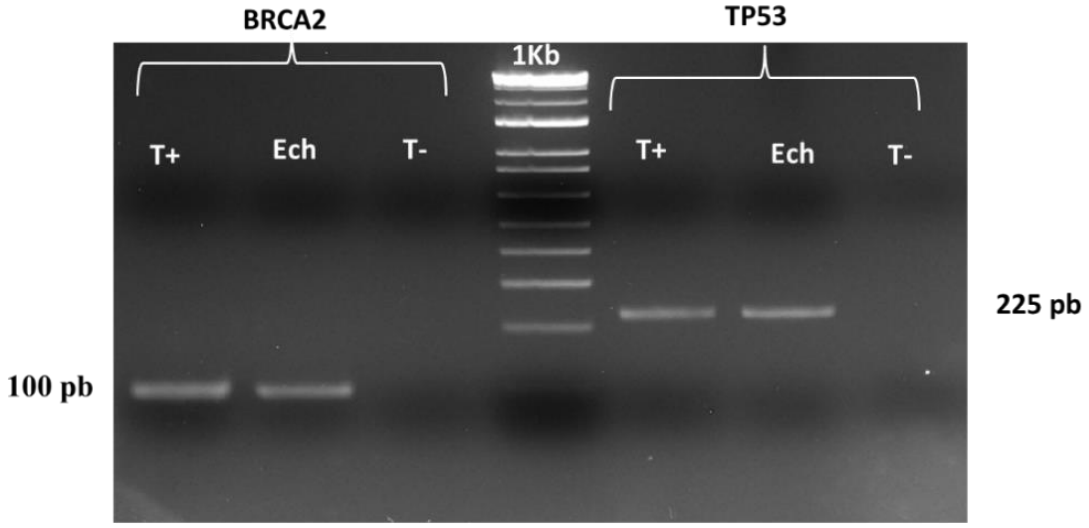


Figure 8: résultat d'amplification des deux régions présentant une mutation lors du séquençage NGS.

A gauche amplification de 100 pb de l'Exon 4 du gène BRCA2 et à droite l'amplification de 225 pb de l'Exon 4 du gène TP53.

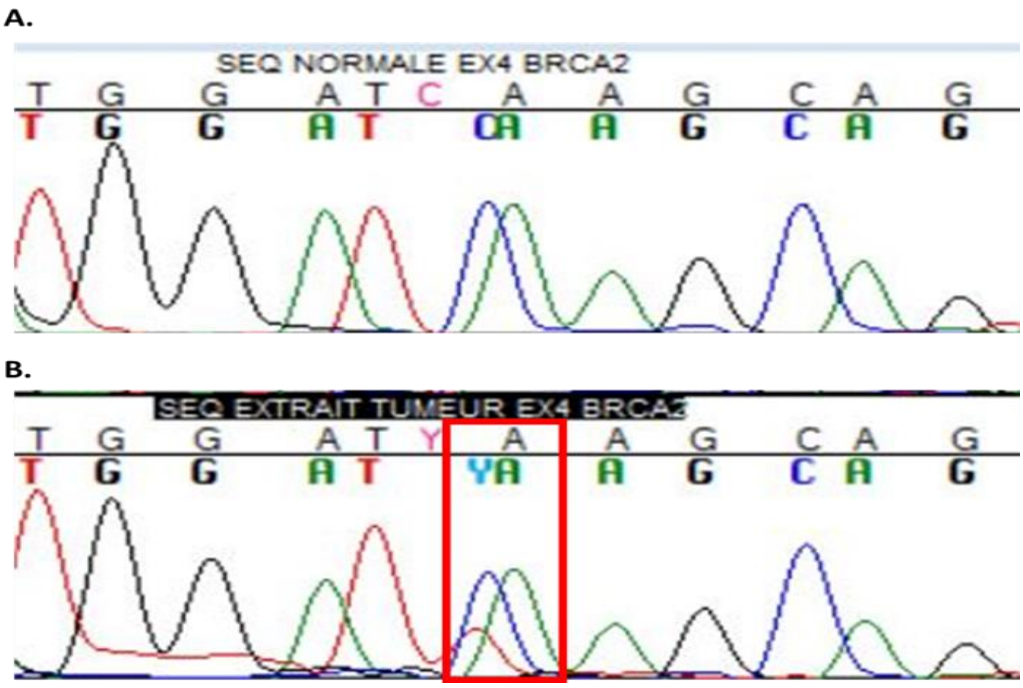


Figure 9: résultat du séquençage Sanger au niveau de l'exon 4 du gène BRCA2.

En A la séquence normale de l'Exon 4 du gène BRCA2, et en B la séquence mutée de l'Exon 4 du BRCA2. Pour cette dernière, en plus de l'allèle normal (C), présence de l'allèle muté (T).

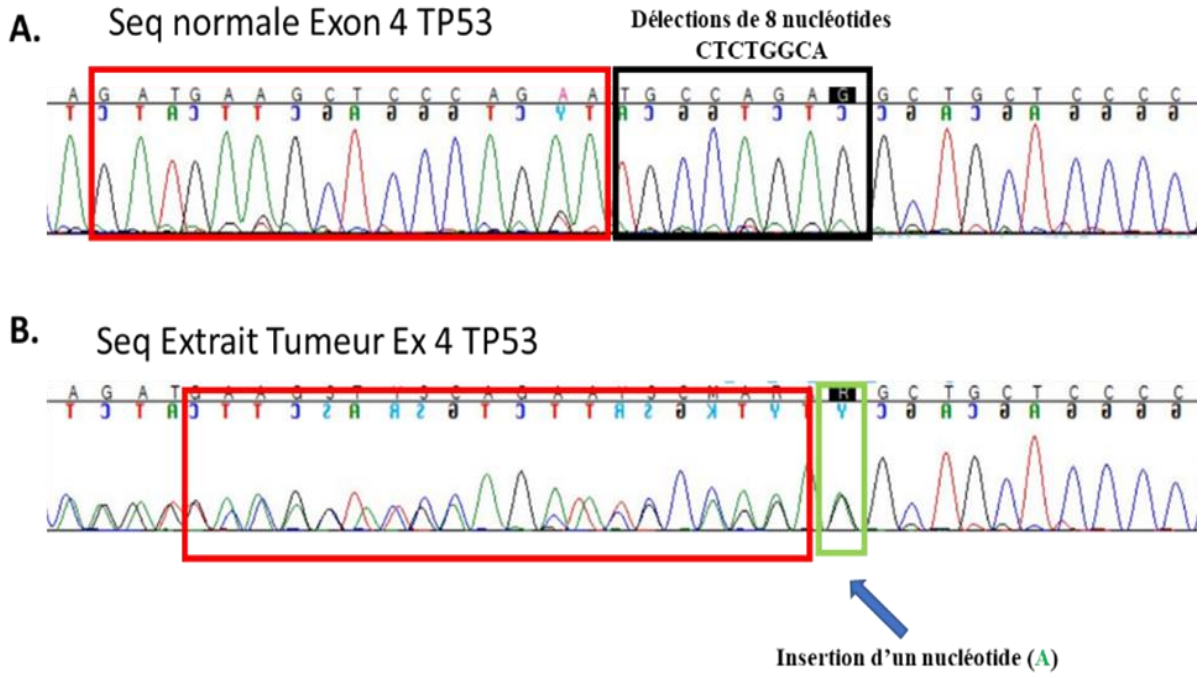


Figure 10: résultat du séquençage Sanger au niveau de l'exon 4 du gène TP53.

En A la séquence normale, en B la séquence présentant une Indel. En noir, les 8 nucléotides supprimés dans la cellule tumorale () et en vert le nucléotide inséré (A). En rouge, la même séquence.

3.2. Etude prospective

3.2.1. Caractéristiques des patientes

3.2.1.1. Caractéristiques socio démographiques des patientes

Age des patientes

L'âge moyen des patientes était de 49,4ans ± 13,4. La patiente la plus âgée avait 75 ans et la plus jeune, 26 ans.

3.2.1.2. Antécédents et facteurs de risque

3.2.1.2.1. Age des ménarches

L'âge des ménarches avait été renseigné chez 13 patientes.

L'âge moyen des ménarches était de 14,6 ± 1,1 ans avec des extrêmes de 13 et 17 ans.

3.2.1.2.2. Antécédents de ménopause et de mastopathie

Les patientes étaient ménopausées dans 3,2% des cas (5/16). Elles n'avaient pas d'antécédent de mastopathie.

3.2.1.2.3. Contraception hormonale œstroprogestative

Sur 16 patientes où la contraception avait été renseignée, 2/16 avaient pratiqué la contraception œstroprogestative, soit 12,5 %.

3.2.1.2.4. Autres antécédents personnels médicaux

L'Hypertension artérielle et le diabète étaient les principaux antécédents médicaux des patientes avec des taux respectifs de : 50% et 12,5%.

3.2.1.2.5. Antécédents familiaux de cancer

Les antécédents familiaux de cancer du sein avaient été recherchés chez 16 patientes. 12,5 % avaient un antécédent familial de cancer chez un parent de deuxième degré.

3.2.2. Données relatives aux caractéristiques cliniques des tumeurs

3.2.2.1. Motif de consultation

Le tableau VII montre la répartition des patientes de la phase prospective, atteintes de cancer du sein au CNHU-HKM et au CHU-MEL de Cotonou, en fonction du motif de consultation.

Tableau VII: répartition des patientes de la phase prospective, atteintes de cancer du sein au CNHU-HKM et au CHU-MEL de Cotonou, en fonction du motif de consultation.

	Effectif (n)	Fréquence (%)
Nodule	12	75,1
Écoulement	1	6,2
Ulcération cutanée	1	6,2
Inconnu	2	12,5
Total	16	100,0

Le motif de consultation le plus fréquent était la découverte d'un nodule du sein par la patiente elle-même dans 75,1% des cas.

3.2.2.2. Siège de la tumeur

Le Tableau VIII montre la répartition des patientes de la phase prospective, atteintes de cancer du sein au CNHU-HKM et au CHU-MEL de Cotonou, en fonction du siège de la tumeur.

Tableau VIII: répartition des patientes de la phase prospective, atteintes de cancer du sein au CNHU-HKM et au CHU-MEL de Cotonou, en fonction du siège de la tumeur.

	Effectifs (n)	Pourcentage %
Latéralité du sein (N=16)		
Droit	3	18 ,8
Gauche	11	68,7
Bilatéral	2	12,5

Le sein gauche était le plus touché (68,7%).

3.2.3. Types histologiques

Le tableau IX présente les types histologiques des tumeurs.

Tableau IX: types histologiques des tumeurs des patientes atteintes de cancer du sein au CNHU-KHM et au CHU-MEL de Cotonou

	Effectif (n)	Fréquence (%)
Carcinome canalaire infiltrant	12	48,0
Carcinome intra canalaire de bas grade	1	6,3
Non fait	3	18,7
Total	16	100,0

Le type histologique la plus représenté était le carcinome canalaire infiltrant soit 12%.

3.2.4. Faisabilité d'analyse génétique à partir de tissus frais

3.2.4.1. Quantité d'ADN

Après extraction de l'ADN sur les seize blocs, la quantité des ADN mesurées, variait de 13,5 à 1275ng/µL.

3.2.4.2. Qualité d'ADN

Le tableau X montre l'analyse de la quantité et de la qualité des seize ADN extraits.

Tableau X: analyse de la quantité et de la qualité des seize ADN extraits

N°	[]° ng/µl	HPRT			ALB			TBP		
T2	13,5	25,9	25,8	26,1	24,9	25	24,9	27	27,2	27
A	110	25,5	25,7	25,5	24,3	24,1	24,3	25,9	26,3	26,3
B	138,2	25,7	25,5	25,5	24,3	24,3	26	27	27,1	27,1
C	430	24,4	24,4	24,5	23,3	23,3	23,2	26,1	26,1	26
D	1275	26,4	26,6	26,2	25,1	25,2	25	27,4	27,3	27,5
E	175,4	24,5	24,8	24,5	23,2	23	23,1	26,5	26,4	26,3
F	363	26,1	26	25,9	24,3	24,3	24,4	27	27,2	27,3
G	150	25,7	25,8	25,5	25,2	24,9	25,6	28	27,9	27,7
H	30	28	28	28,1	26,6	26,5	26,6	28,9	28,8	29,2
I	590	27,4	27,5	27,6	26,7	26,8	26,8	29,5	29,3	29,3
J	192	25,4	25,7	25,8	24,6	24,5	24,5	26,7	26,7	26,7
K	771	25	25,3	25,1	24,2	24,5	24,8	27,3	26,8	/
L	60	26	26,3	25,9	24,9	24,8	25	27,8	27,5	27,5
M	415	25,7	25,7	25,7	24,4	24,4	24,3	27,1	26,9	26,9
N	193	25,8	25,7	25,7	24,6	24,5	24,7	26,8	27	26,9
O	586	25	25	25,1	23,9	24,2	23,8	26,4	26	26,1

En ce qui concerne la qualité des seize ADN génomiques extraits, nous constatons que tous les prélèvements présentent une amplification pour les trois gènes (HPRT, ALB, TBP).

3.2.4.3. Séquençage NGS sur l'échantillon T2

Le séquençage NGS a été effectué sur l'ADN du prélèvement T2 et montre que la patiente présente deux mutations pathogènes :

- une mutation dans le gène TP53 correspondant à une substitution d'un G en A à la position nucléotidique 527 dans l'exon.
- une mutation dans le gène PALB2 correspond à une insertion d'un T entre les nucléotides 390 et 391.

4. DISCUSSION

La discussion des résultats de notre étude s'est articulée autour de trois points :

- **l'atteinte des objectifs de notre étude**
- **la validité de nos résultats**
- **la comparaison des résultats avec ceux des études d'autres auteurs**

4.1. Atteinte des objectifs de notre étude

Au terme de cette étude, nous avons pu déterminer aussi bien la quantité et la qualité des ADN extraits à partir des blocs de tumeur du sein fixé au formol et inclus en paraffine d'une part, et de prélèvements biopsiques d'autre part. Cette étude nous a également permis d'identifier certaines mutations génétiques impliquées dans la prédisposition au cancer du sein au Bénin.

4.2. Validité de nos résultats

Il s'est agi d'une étude transversale descriptive à la fois rétrospective et prospective

- Nous avons eu de difficultés à retrouver l'intégralité des blocs de tumeur envoyés au laboratoire DUBOIS pour examen anatomopathologique.
- Les différentes mutations retrouvées à partir des prélèvements biopsiques n'ont pu être confirmées par le séquençage de Sanger.
- Le séquençage NGS n'a pas pu être réalisé sur l'ensemble des blocs et des prélèvements biopsiques en raison du coût financier.
- La recherche de mutations constitutionnelles à partir des prélèvements sanguins n'a pas pu être réalisé

4.3. Comparaison des résultats avec ceux des études d'autres auteurs

4.3.1. Caractéristiques sociodémographiques

4.3.1.1. Age des patientes

L'âge moyen des patientes était de 47,1ans ± 10,3. Avec des extrêmes allant de 31 à 75 ans pour la partie rétrospective. Pour la partie prospective, l'âge moyen

était de 49,4ans ± 13,4. La patiente la plus jeune avait 26 ans et la plus âgée avait 75 ans. Mehinto et al. ont trouvé des données similaires (48,5 ans) en 2007[60]. Des résultats similaires (46,58±15,72 ans) ont également été retrouvés au Cameroun en 2015 [61]. Les données de A Traoré et al. vont dans le même sens avec une moyenne d'âge de 47,4 ans au moment du diagnostic au Mali dans une étude réalisée en 2009 [62]. Dans les pays développés cet âge était en général supérieur à 50 ans : 60,6 ans en France [63] et 56,6 ans en Colombie [64]. Cela explique que le cancer du sein survient à des âges beaucoup plus jeunes dans les pays africains que dans les pays développés. Ces différences pourraient être dues à des facteurs génétiques.

4.3.1.2. Age des ménarches

L'âge précoce des ménarches (< 12 ans) est un facteur de risque connu de cancer de sein[65]. La puberté précoce a été peu notée dans notre étude avec l'âge des ménarches à 14,6 +/- 1,1ans.

4.3.1.3. Antécédent familial de cancer

Les patientes de notre étude avaient un antécédent familial de cancer chez un parent de deuxième degré dans 12,5 % des cas.

Dans une étude réalisée en 2003 par Althuis et al. le risque lié aux antécédents familiaux de cancer du sein est de 1,9 pour toute forme de parenté. Ce risque est plus accru chez les femmes plus jeunes et lorsque la maladie s'est développée chez un parent au premier degré avant l'âge de 50 ans[68]. Pharoah et al partagent également cet avis [69]**.** Dans les séries occidentales comme aux Etats-Unis, l'antécédent familial de cancer du sein a été retrouvé chez 23% des patientes [70]. L'histoire familiale est associée, de manière régulière, à un risque accru de cancer du sein. Des études publiées par Ford et al. [71], Wolper et al. [72] au Canada ont retrouvé que certaines mutations génétiques sont susceptibles d'augmenter le risque de cancer du sein. Deux gènes, BRCA1 et BCRA2, semblent les plus impliqués. Par rapport à la population générale, les femmes porteuses des

mutations sur ces gènes présentent un risque accru de cancer du sein. Il est estimé que le risque associé aux mutations de ces gènes dépasse 80 % pour les femmes, lorsque le sujet porteur de ces gènes atteint l'âge de 70 ans. Le fait d'avoir le même environnement, le même style de vie et un patrimoine génétique commun, ajouté à l'instabilité génomique en rapport avec les mutations, expliquerait en partie le risque accru de cancer du sein associé à l'agrégation familiale et aux mutations génétiques [72].

4.3.1.4. Allaitement maternel

Dans notre étude, 93,7% des patientes avaient pratiqué l'allaitement maternel.

Les femmes qui ont allaité pendant une durée totale d'au moins 25 mois présentent un risque réduit de 33 %, par rapport à celles qui n'ont jamais allaité de développer un cancer du sein[73]. Key et al. ont montré que la lactation produit des changements hormonaux endogènes, en particulier une réduction d'œstrogènes et une augmentation de la production de prolactine, qui sont supposées diminuer l'exposition cumulative aux œstrogènes chez la femme. Par conséquent, la lactation réprimerait l'apparition et le développement du cancer du sein[23]. Selon Petrakis et al. le niveau d'œstrogènes dans le sang des femmes qui allaitent augmente graduellement à partir du dernier accouchement, puis se maintient pendant plusieurs années, avant d'atteindre le niveau que l'on enregistre chez les femmes nullipares[74]. L'effet protecteur de l'allaitement serait attribuable à son rôle dans le décalage du rétablissement de l'ovulation [75].

4.3.1.5. Contraception œstroprogestative

Dans notre étude, la contraception œstroprogestative a été retrouvée comme facteur associé à la survenue de cancer du sein avec un taux de 12,5%.

Plusieurs études ont déjà montré que la contraception hormonale œstroprogestative est un facteur de risque de cancer du sein. Le risque est d'autant plus important que la durée d'utilisation est longue [73,76,77].

La prise de contraceptifs oraux augmente faiblement le risque de cancer du sein. Ce risque décroît après l'arrêt de la contraception, et rejoint celui des femmes jamais traitées environ dix ans après l'arrêt. La durée totale d'utilisation, la dose et le type de contraceptif oral ne semblent pas avoir d'effet. Seuls un petit nombre de cas de cancers du sein sont toutefois attribuables à la prise de contraceptifs oraux du fait de la faible augmentation du risque et des taux de cancer du sein peu élevés dans les tranches d'âge concernées par la contraception [78].

4.3.1.6. Motif de consultation

Dans notre étude, le motif de consultation le plus fréquent était la découverte d'un nodule du sein par la patiente elle-même dans 75,1% des cas. Des études réalisées dans d'autres pays en voie de développement comme au Maroc [79] et au Cameroun révèlent la même tendance. Par contre dans les pays développés, grâce aux politiques de dépistage efficaces mises en place, beaucoup de cas de cancer du sein sont détectés à des stades infracliniques [61].

4.3.2. Etude génétique

4.3.2.1. Partie rétrospective

Dans un premier temps, il s'agissait de mettre en place un protocole d'extraction d'ADN à partir des blocs de tumeur, de contrôler sa quantité et sa qualité puis de faire une vérification par le séquençage Sanger des potentielles mutations retrouvées.

En effet, les blocs de tumeur représentent la plus grande source de matériaux d'archives pour la recherche en biologie moléculaire en Afrique (plus facilement conservable que des échantillons congelés). Dobrovic et al. ont montré que les blocs de tissus représentent une riche ressource pour les études génomiques cliniques, en particulier lorsqu'ils sont associés à des dossiers médicaux complets. Leur utilisation dans le séquençage de nouvelle génération est une priorité [80]. William et al. aussi ont montré que l'analyse génomique des tissus d'archives

fixés dans du formol est d'une importance fondamentale dans la recherche biomédicale, et de nombreuses études ont utilisé ce matériel [81].

Einaga et al. ont également conclu que les tissus fixés au formol et inclus en paraffine utilisés pour le diagnostic pathologique sont précieux pour l'étude de la génomique du cancer [82].

Au total 25 blocs ont été extraits avec des quantités d'ADN variant de 19,4 ng/µl à 631,2 ng/µl, ce qui suggère que le protocole d'extraction appliqué semble satisfaisant.

Nguyen et al. ont montré que l'obtention d'ADN de quantité et de qualité adéquate est une étape cruciale pour toute procédure de diagnostic. De plus, la qualité de l'échantillon de départ a une incidence sur les résultats du séquençage [83]. Il est donc nécessaire de vérifier la qualité de l'ADN génomique extrait. Nous avons choisi de la tester en utilisant la méthode de qPCR par SybrGreen. Les résultats montrent que la moitié des ADN sont partiellement ou totalement dégradés ce qui peut altérer le séquençage.

Nguyen et al. ont montré que la dégradation de l'ADN peut être liée à la concentration de formol utilisée pour la fixation des tissus [83]. Les travaux de Einaga et al. ont conclu que la meilleure qualité d'ADN extrait à partir de blocs FFPE est obtenue par fixation tissulaire avec 10% de formol tamponné neutre pendant une journée [82].

- Le séquençage NGS de l'ADN issu du bloc 2175A13 (ADN de bonne qualité) montre que la patiente présente deux mutations pathogènes (une mutation dans le gène BRCA2 et une mutation dans le gène TP53).

La mutation dans le gène BRCA2 correspond une mutation non-sens de type substitution du nucléotide C>T en position 376 qui conduit à l'apparition d'un codon stop précoce (CAA → TAA).

Cette substitution entraine le changement de l'acide aminé Glutamine (Gln) en position 126 en un codon stop. Ce qui conduit à la synthèse d'une protéine tronquée ou à son absence. La protéine BRAC2 étant de grande taille (3418 acides

aminés), cette mutation en position 126 entraîne une délétion quasi-totale de la protéine.

Ce variant est donc considéré comme pathogène par un consortium clinique bien établi et les bases de données (ClinVar). Ce variant est retrouvé sous le nom de BRCA2 : c.376C>T (p.Gln126Ter).

La mutation dans le gène TP53 correspond à une délétion de huit nucléotides de la position 197 à 204 (TGCCAGAG) et l'insertion d'un nucléotide (A) conduisant à une délétion finale de sept nucléotides et donc à un décalage du cadre de lecture. De manière intéressante, cette mutation n'a jamais été rapportée dans la littérature et dans les bases de données. Cette nouvelle mutation dans TP53 sera dorénavant nommée c.197_204delinsA. Au niveau protéique, cette indel entraine le changement de la méthionine en position 66 (M) en une lysine (K) puis le décalage du cadre de lecture avec apparition d'un codon stop en position 120. La protéine TP53 possède 393 acides aminés. L'apparition d'un codon stop en position 120 entraine une délétion quasi-totale des domaines importants de la protéine. Ce variant peut donc être considéré comme pathogène.

Dans une étude réalisée par Huszno et al. les mutations TP53 ont un facteur de pronostic négatif. Les tumeurs présentant des mutations TP53 sont plus susceptibles d'être agressives (cancer du sein triple négatif) et de résister à la chimiothérapie et à la radiothérapie [84].

- Le séquençage NGS de l'ADN issu du bloc RC3792A1 (ADN de bonne qualité) montre que la patiente présente une mutation dans le gène BRCA2 correspondant à une substitution d'un G en T en position 1609 (c.1609G>T) dans l'exon 10.

Cette substitution entraîne le changement de l'acide aminée Glutamine (Glu) en position 537 de la protéine en un codon stop. Ce variant n'est pas signalé dans la base de données de population Genome Aggregation Database (PMID : 32461654), et n'a pas été signalé dans ClinVar. Ce variant peut donc être considéré comme pathogène.

- Le séquençage NGS de l'ADN issu du bloc HT0912A9 n'a donné aucun résultat due à la très mauvaise qualité de l'ADN.

L'ensemble de ces résultats montre qu'il est nécessaire d'avoir une qualité d'ADN suffisante afin de réaliser le séquençage NGS. Les résultats de Einaga et al. vont dans le même sens [82]. Il serait intéressant d'étudier si ces nouvelles mutations sont retrouvées chez d'autres patientes atteintes du cancer du sein au Bénin.

4.3.2.2. Partie prospective

Le protocole d'extraction d'ADN à partir des prélèvements biopsiques a bien fonctionné puisqu'elle nous a permis d'obtenir des ADN variant de 30 à 1275ng/µl. On conclut que la quantité d'ADN extraite des prélèvements biopsiques est nettement meilleure à celle obtenue à partir des blocs.

Concernant la qualité des 15 ADN extraits, nous constatons que tous les prélèvements présentent une amplification pour les trois gènes (HPRT, ALB, TBP).

Contrairement aux blocs FFPE, les ADN issus des prélèvements biopsiques sont de bonne qualité et peuvent donc être séquencés. Le séquençage NGS du prélèvement T2 montre deux mutations (une mutation dans le gène TP53 et une mutation dans le gène PALB2) .

La mutation dans le gène TP53, correspondant à une substitution d'un G en A à la position nucléotidique 527 (527G>A) située dans l'exon 4 du gène TP53. La cystéine au codon 176 de la protéine TP53 est alors remplacée par une tyrosine, un acide aminé aux propriétés très différentes. Cette altération est située dans le domaine IV hautement conservé du domaine de liaison à l'ADN.

Des études menées sur des lignées cellulaires humaines indiquent que cette mutation entraine une défaillance dans l'activité de suppression de tumeur de TP53 [85,86].

La mutation dans le gène PALB2, correspondant à une insertion d'un T entre les nucléotides 390 et 391 (390_391insT). Cette insertion entraine le changement de l'acide aminé Arginine (Arg) en position 131 en un codon stop. Ce qui conduit à la synthèse d'une protéine tronquée ou à son absence. Cette mutation n'a pas été signalée dans la littérature à notre connaissance. Ce variant n'est pas signalé dans la base de données de population Genome Aggregation Database (PMID : 32461654), et n'a pas été signalé dans ClinVar. Ce variant peut donc être considéré comme pathogène. Il serait intéressant d'étudier si cette nouvelle mutation est retrouvée chez d'autres patientes atteintes du cancer du sein au Bénin.

CONCLUSION

Au terme de cette étude transversale descriptive à la fois rétrospective et prospective, portant sur la recherche de mutations génétiques délétères chez des femmes atteintes d'un cancer du sein à Cotonou, il se dégage que :

- La quantité d'ADN issue des blocs varie de 19,4 ng/µl à 631,2 ng/µl et celle obtenue à partir des prélèvements biopsiques, de 30 à 1275ng/µl. Ainsi donc les méthodes de conservation des échantillons tissulaires et d'extraction d'ADN dans l'un ou l'autre des cas permettent d'obtenir une bonne quantité d'ADN.
- La moitié de l'ADN des blocs est dégradée. Par contre, tous les ADN des prélèvements biopsiques présentent une amplification pour les trois gènes
- Le séquençage NGS de l'ADN issu des blocs a retrouvé une mutation dans le gène BRCA2, TP53, PALB2.
- Le séquençage de l'ADN issu du prélèvement T2 a montré que la patiente présente une mutation pathogène dans le gène TP53 et une mutation dans le gène PALB2.
- L'ensemble de ces résultats montre qu'il est nécessaire d'avoir une qualité d'ADN suffisante afin de réaliser le séquençage NGS.

Nous ne pouvons pas conclure quant à l'origine des mutations retrouvées chez nos patientes, à savoir si ce sont des mutations germinales ou somatiques puisque l'ADN a été extrait directement de la zone tumorale. Il serait donc intéressant d'obtenir un échantillon de sang de la patiente pour pouvoir voir si ces mutations sont germinales (constitutionnelles) c'est-à-dire présentes dans toutes les cellules de l'organisme et transmissibles à la descendance.

SUGGESTIONS

- **A l'endroit des autorités sanitaires**
  - Œuvrer pour la mise en place des unités de recherche en oncogénétique.
  - Mettre en place des centres spécialisés pour la prise en charge des cancers du sein.
  - Assurer la formation des ressources humaines nécessaires à la prise en charge des cancers au Bénin : anatomopathologistes, oncologues médicaux, généticiens, radiothérapeutes, chirurgiens, gynécologues obstétriciens spécialisés en sénologie.
  - Mettre en place un service de génétique médicale et rendre disponible le séquençage NGS.
  - Promouvoir l'archivage des données de façon numérique dans toutes les structures sanitaires du Bénin.

- **Aux autorités du CNHU-HKM, du CHU-MEL**
  - Réorganiser la gestion des archives pour faciliter la recherche.
  - Envisager l'informatisation des dossiers médicaux.
  - Créer un service ou une consultation d'oncogénétique.

- **A l'endroit du personnel des laboratoires d'anatomie pathologique**
  - Mettre en place une meilleure organisation pour mieux archiver les blocs de paraffine et si possible disposer d'un code barre numériser.
  - Informer les cliniciens sur les normes de formaldéhyde pour la conservation des blocs.
  - Créer une banque d'ADN pour un suivi plus rapide des patientes
  - Se conformer aux recommandations internationales pour la conservation des prélèvements.
  - Sensibiliser sur les erreurs d'identification des échantillons.

- **A l'endroit des praticiens**
  - Bien renseigner les dossiers médicaux
  - Adresser en consultation d'oncogénétique les patientes diagnostiquées pour cancer du sein.

- **A l'endroit de la population**

  Supprimer les facteurs de risque évitables tels que la sédentarité, l'obésité, certaines contraceptions hormonales, le diabète, l'allaitement artificiel, la première grossesse tardive.

REFERENCES

1. Joko-Fru WY, Miranda-Filho A, Soerjomataram I, Egue M, Akele-Akpo MT, et al. Breast cancer survival in sub-Saharan Africa by age, stage at diagnosis and human development index: A population-based registry study. Int J Cancer. 2020;146(5):1208-18.

2. Gnangnon F, Brun L, Worou C, Seidou F, D'almeida T, Amidou S, et al. Âge du diagnostic des cancers du sein en République du Bénin (Afrique de l'Ouest) : pouvons-nous encore appliquer les standards occidentaux en matière de dépistage ? EPICLIN 2020 / Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique. 2020;126(4):610-20.

3. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin. 2021;71(3):209-49.

4. Engbang JPN, Essome H, Simo G, Essam JDS, Mouelle AS, et al. Cancer du sein au Cameroun, profil histo-épidémiologique: à propos de 3044 cas. The PAMJ. 2015;21(4) 302-50.

5. Baquet CR, Mishra SI, Commiskey P, Ellison GL, DeShields M. Breast cancer epidemiology in blacks and whites: disparities in incidence, mortality, survival rates and histology. J Natl Med Assoc. 2008;100(5):480-95.

6. Tonato Bagnan JA, Denakpo JL, Aguida B, Hounkpatin L, Lokossou A, et al. Épidémiologie des cancers gynécologiques et mammaires à l'hôpital de la Mère et de l'Enfant-Lagune (HOMEL) et à la clinique universitaire de gynécologie et d'obstétrique (CUGO) de Cotonou, Bénin. Bulletin du Cancer. 2013;100(2):141-56.

7. Bray F, Parkin DM, Gnangnon F, Tshisimogo G, Peko JF, et al. Cancer in sub-Saharan Africa in 2020: a review of current estimates of the national burden, data gaps, and future needs. Lancet Oncol. 2022;23(6):719-28.

8. Haffty BG, Choi DH, Silber A, Ranieri K, Matloff E, et al. Breast cancer in young women (YBC): prevalence of BRCA1/2 mutations and risk of secondary malignancies across diverse racial groups. Annals of Oncology. 2009;20(1):165-89.

9. Nkondjock A, Ghadirian P. Facteurs de risque du cancer du sein. Med Sci. 2005;21(2):175-80.

10. Frikha N, Chlif M. Un aperçu des facteurs de risque du cancer du sein. Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine. 2021;205(5):519-27.

11. Nkondjock A, Ghadirian P.Risk factors and risk reduction of breast cancer. Med Sci. 2005;21(2):175-80.

12. Classe JM, Campone M, Lefebvre-Lacoeuille C. Cancer du sein: dépistage et prise en charge. Issy-les-Moulineaux: Elsevier Masson; 2016. 296p.

13. CGHF in Breast Cancer. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. Lancet Oncol. 1996;22(4):347-61.

14. Cordina-Duverger E, Truong T, Anger A, Sanchez M, Arveux P, Kerbrat P, et al. Risk of Breast Cancer by Type of Menopausal Hormone Therapy: a Case-Control Study among Post-Menopausal Women in France. PLoS One. 2013;18(7):580-96.

15. Clavel-Chapelon F, Gerber M. Reproductive factors and breast cancer risk. Do they differ according to age at diagnosis? Breast Cancer Res Treat. 2002;72(2):107-15.

16. Layde PM, Webster LA, Baughman AL, Wingo PA, Rubin GL, Ory HW. The independent associations of parity, age at first full term pregnancy, and duration of breastfeeding with the risk of breast cancer. Cancer and Steroid Hormone Study Group. J Clin Epidemiol. 1989;42(7):963-73.

17. Bernstein L, Henderson BE, Hanisch R, Sullivan-Halley J, Ross RK. Physical exercise and reduced risk of breast cancer in young women. J Natl Cancer Inst. 1994;86(18):1403-8.

18. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. Lancet Oncol. 2008;371(6):569-78.

19. Hamajima N, Hirose K, Tajima K, Rohan T, Calle EE, Heath CW, et al. Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. British Journal of Cancer. 2002;87(11):1234-45.

20. Yu H. Alcohol consumption and breast cancer risk. JAMA. 1998;280(13):1138-40.

21. Dossus L, Boutron-Ruault MC, Kaaks R, Gram IT, Vilier A, et al. Active and passive cigarette smoking and breast cancer risk: results from the EPIC cohort. Int J Cancer. 2014;134(8):1871-88.

22. Rudel RA, Attfield KR, Schifano JN, Brody JG. Chemicals causing mammary gland tumors in animals signal new directions for epidemiology, chemicals testing, and risk assessment for breast cancer prevention. Cancer. 2007;109(12):1635-66.

23. Key TJ, Verkasalo PK, Banks E. Epidemiology of breast cancer. Lancet Oncol. 2001;2(3):133-40.

24. Kamina P. Anatomie clinique :Thorax, Abdomen Pelvis. 4ème éd. Paris: Maloine; 2009. 330p.

25. Netter F. Atlas d'anatomie humaine. 6ème éd. Paris : Elsevier Masson; 2015. 624p.

26. Sultania M, Kataria K, Srivastava A, Misra MC, Parshad R, Dhar A, et al. Validation of Different Techniques in Physical Examination of Breast. Indian J Surg. 2017;79(3):219-25.

27. Goodson WH. Clinical breast examination. West J Med.1996;164(4):355-8.

28. Travade, Isnard, Gimbergues. Imagerie de la pathologie mammaire. Paris: Elsevier Masson; 2001.132p.

29. ACR. BI-RADS Atlas. 5e éd. American College of Radiology; 2013.

30. Boisserie-Lacroix M, Bentolila J, Laumonier H, Bouzgarrou M, et al. Échographie du sein : nouvelles approches. Gynécologie Obstétrique & Fertilité. 2006;34(9):170-7.

31. Radhakrishna S, Agarwal S, Parikh PM, Kaur K, Sharma S, et al. Role of magnetic resonance imaging in breast cancer management. South Asian J Cancer. 2018;7(2):69-71.

32. Lakhani S, Ellis I, Schnitt S, Tan P. WHO classification of tumours of the breast. IARC. 2012;7(4):240-2.

33. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. Histopathology. 1991;19(5):403-10.

34. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. Annal Oncol. 2011;22(8):1736-47.

35. Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, et al., AJCC Cancer Staging Manual.8e éd. 2017;67(2):93-99.

36. Chauvet MP. Nouvelle chirurgie du cancer du sein. La Presse Médicale. 2019;48(10):1123-30.

37. Lansac J, Ouldamer L. Chapitre19 - Cancer du sein. In: Lansac J, Marret H, éditeurs. Gynecologie pour le Pratricien. 9e éd. Paris: Elsevier Masson; 2018; 276-300p.

38. Masoud V, Pagès G. Targeted therapies in breast cancer: New challenges to fight against resistance. World J Clin Oncol. 2017;8(2):120-34.

39. Mahdieh N, Rabbani B. An Overview of Mutation Detection Methods in Genetic Disorders. Iran J Pediatr. 2013;23(4):375-88.

40. Hanna N, Parfait B, Vidaud D, Vidaud M. Mécanismes et conséquences des mutations. Med Sci. 2005;21(11):969-80.

41. Parsons RE. Thomas DB. Genomic analyses identify hundreds of variants associated with age at menarche and support a role for puberty timing in cancer risk. Nature Genetics. 2017;29(5):236-51.

42. Moretta J, Berthet P, Bonadona V, Caron O, Cohen-Haguenauer O, Colas C, et al. Recommandations françaises du Groupe Génétique et Cancer pour l'analyse en panel de gènes dans les prédispositions héréditaires au cancer du sein ou de l'ovaire. Bulletin du Cancer. 2018;105(10):907-17.

43. Viassolo V, Ayme A, Chappuis PO. Cancer du sein : risque génétique. Imagerie de la Femme. 2016;26(2):95-104.

44. Bièche I, Lidereau R. Génétique somatique du cancer du sein. Bulletin du Cancer. 1997;8(1):83-96.

45. Cohen-Haguenauer O. Prédisposition héréditaire au cancer du sein-Génétique. Med Sci. 2019;35(2):138-51.

46. Futreal PA, Liu Q, Shattuck-Eidens D, Cochran C, Harshman K, Tavtigian S, et al. BRCA1 Mutations in Primary Breast and Ovarian Carcinomas. Science. 1994;26(2):120-2.

47. Bonadona V, Lasset C. Prédispositions héréditaires au cancer du sein : après BRCA1 et BRCA2, quel(s) autre(s) gène(s) ? Bulletin du Cancer. 2003;90(7):587-94.

48. Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. A model for p53-induced apoptosis. Nature. 1997;38(8):300-5.

49. Masciari S, Dillon DA, Rath M, Robson M, Weitzel JN, Balmana J, et al. Breast cancer phenotype in women with TP53 germline mutations: a Li-Fraumeni syndrome consortium effort. Breast Cancer Res Treat. 2012;133(3):1125-30.

50. Buisson R, Dion-Côté AM, Coulombe Y, Launay H, Cai H, Stasiak AZ, et al. Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination. Nat Struct Mol Biol. 2010;17(10):1247-54.

51. Nelen MR, Padberg GW, Peeters EA, Lin AY, van den Helm B, Frants RR, et al. Localization of the gene for Cowden disease to chromosome. Nat Genet. 1996;13(1):114-6.

52. Hopkins BD, Parsons RE. Molecular pathways: intercellular PTEN and the potential of PTEN restoration therapy. Clin Cancer Res. 2014;20(2):379-83.

53. Pilarski R, Stephens JA, Noss R, Fisher JL, Prior TW. Predicting PTEN mutations: an evaluation of Cowden syndrome and Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome clinical features. J Med Genet. 2011;48(8):505-12.

54. Hemminki A, Tomlinson I, Markie D, Järvinen H, Sistonen P, et al. Localization of a susceptibility locus for Peutz-Jeghers syndrome to 19p using comparative genomic hybridization and targeted linkage analysis. Nat Genet. 1997;15(1):87-90.

55. Bell DW, Varley JM, Kang DH, Wahrer DC, Shannon KE, et al. Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. Science. 1999;86(9):528-31.

56. Shieh SY, Ahn J, Tamai K, Taya Y, Prives C. The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. Genes Dev. 2000;14(3):289-300.

57. Falck J, Mailand N, Syljuåsen RG, Bartek J, Lukas J. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. Nature. 2001;41(6):842-70.

58. Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, et al. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. Science. 1995;26(8):749-53.

59. Cavaciuti E, Laugé A, Janin N, Ossian K, Hall J, Stoppa-Lyonnet D, et al. Cancer risk according to type and location of ATM mutation in ataxia-telangiectasia families. Genes Chromosomes Cancer. 2005;4(1):1-9.

60. Mehinto D, Medji S, Houngbe F, Padonou N. Traitement du cancer du sein chez la femme. Médecine d'Afrique Noire.2007; 277-85

61. Engbang JPN, Essome H, Koh VM, Simo G, Essam JDS, Mouelle AS, et al. Cancer du sein au Cameroun, profil histo-épidémiologique: à propos de 3044 cas. PAMJ. 2015;21(4)132-50.

62. Togo A, Traoré A, Traoré C, Dembélé BT, Kanté L, Diakité I, et al. Cancer du sein dans deux centres hospitaliers de Bamako (Mali): aspects diagnostiques et thérapeutiques. J Afr Cancer. 2010;2(2):88-91.

63. Formet J, Dole C, Laroche J, De Lapparent T, Malincenco L, Gay C. Cancer du sein et chirurgie ambulatoire : état des lieux de l'activité et évaluation de la satisfaction des patientes. Gynécologie Obstétrique Fertilité & Sénologie. 2019;47(11):769-75.

64. Ramirez EJ, Trapido EJ. Amelie G. Advancing the Science of Cancer in Latinos. J Afr Cancer. 2019;3(2):3-13.

65. Nkondjock A, Ghadirian P. Facteurs de risque du cancer du sein. Med Sci. 2005;21(2):175-80.

66. Day FR, Thompson DJ, Chasman DI, Finucane H, Sulem P, et al. Genomic analyses identify hundreds of variants associated with age at menarche and support a role for puberty timing in cancer risk. Nature Genetics. 2017;49(6):834-41.

67. Coughlin SS. Epidemiology of Breast Cancer in Women. Med Biol. 2019;11(5):19-29.

68. Althuis MD, Brogan DD, Coates RJ, Daling JR, Gammon MD, Malone KE, et al. Breast cancers among very young premenopausal women. Cancer Causes Control. 2003;14(2):151-60.

69. Pharoah PD, Day NE, Duffy S, Easton DF, Ponder BA. Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. CA Cancer J Clin. 1997;71(5):800-9.

70. Melvin JC, Wulaningsih W, Hana Z, Purushotham AD, Pinder SE, Fentiman I, et al. Family history of breast cancer and its association with disease severity and mortality. Cancer Med. 2016;5(5):942-9.

71. Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. Am J Hum Genet. 1998;62(3):676-89.

72. Wolpert N, Warner E, Seminsky MF, Futreal A, Narod SA. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in male breast cancer patients in Canada. Clin Breast Cancer. 2000;1(1):57-63.

73. CGHFBC. Breast cancer and hormonal contraceptive: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. Lancet Oncol. 1996;37(7):713-27.

74. Petrakis NL, Wrensch MR, Ernster VL, Miike R, Murai J, Simberg N, et al. Influence of pregnancy and lactation on serum and breast fluid estrogen levels: implications for breast cancer risk. CA Cancer J Clin. 1987;40(5):587-91.

75. Kennedy KI. Effects of breastfeeding on women's health. Int J Gynaecol Obstet. 1994;4(2):11-20.

76. CGHFBC. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. Lancet Oncol. 2001;38(9):789-99.

77. Bethea TN, Rosenberg L, Troester MA, Lunetta KL, Bandera EV, et al. A case–control analysis of oral contraceptive use and breast cancer subtypes in the African American Breast Cancer Epidemiology and Risk Consortium. Breast Cancer Res. 2015;17(1):22.

78. CGHFBC. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. Lancet Oncol. 1996;34(7):713-27.

79. Aloulou S, Mahfoudi AE, Omrani AE, Khouchani M. Facteurs liés au diagnostic tardif du cancer du sein: expérience du CHU Mohammed VI Marrakech. PAMJ. 2015;2(1):162-72.

80. Do H, Dobrovic A. Sequence Artifacts in DNA from Formalin-Fixed Tissues: Causes and Strategies for Minimization. Clinical Chemistry. 2015;61(1):64-71.

81. Williams C, Pontén F, Moberg C, Söderkvist P, Uhlén M, Pontén J, et al. A High Frequency of Sequence Alterations Is Due to Formalin Fixation of Archival Specimens. AJP. 1999;55(5):467-71.

82. Einaga N, Yoshida A, Noda H, Suemitsu M, Nakayama Y, Sakurada A, et al. Assessment of the quality of DNA from various formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues and the use of this DNA for next-generation sequencing (NGS) with no artifactual mutation. PLoS One. 2017;12(5):762-31.

83. Nguyen NTT, Vincens P, Dufayard JF, Roest Crollius H, Louis A. Genomicus in 2022: comparative tools for thousands of genomes and reconstructed ancestors. Nucleic Acids Research. 2022;50(1):1025-31.

84. Huszno J, Grzybowska E. TP53 mutations and SNPs as prognostic and predictive factors in patients with breast cancer. Lancet Oncol. 2018;16(1):34-40.

85. Kotler E, Goldfeld G, Lotan-Pompan M, Tarcic O, Gershoni A, et al. A Systematic p53 Mutation Library Links Differential Functional Impact to Cancer Mutation Pattern and Evolutionary Conservation. Mol Cell. 2018;71(1):178-90.

86. Giacomelli AO, Lintner RE, McFarland JM, Duby M, Kim J, et al. Mutational processes shape the landscape of TP53 mutations in human cancer. Nat Genet. 2018;50(10):1381-7.

ANNEXES

Annexe 1 : Fiche de collecte

FICHE D'ENQUETE

N° de la fiche : .....

Hôpital : /___/ 1- CNHU/ HKM 2- HOMEL

Service : /___/ 1- CUGO 2- CHIRURGIE VISCERALE 3- MATERNITE LAGUNE

N° du dossier : /_____/

N° de téléphone : ……..

I- RENSEIGNEMENTS SOCIODEMOGRAPHIQUES DE LA PATIENTE

- Nom :……
- Prénoms :…….
- Age au moment du diagnostic
- Profession : /___/

Elève=1 Etudiante=2 Ménagère=3 Commerçante=4 Sans emploi=5

Avec emploi=5 NON /___/ Si OUI /___ /_ Préciser

Niveau d'instruction : /___/

Sans instruction =1 Niveau primaire=2 Niveau secondaire=3 Supérieur=4

- Ethnie : /___/

Fon=1 Mahi=2 Goun=3 Aizo=4 Ouèmé=5 Tori=6 Kotafon=7 Tofin=8 Adja=9 Xwla=10 Mina=12 Peda=13 Dendi=14 Bariba=15 G Yoruba=16 Nagot=17 Peulh=18 Autres africains=8

II- Eléments du diagnostic

1- Motif de consultation : /___/

Inflammation=1 Nodule=2 Mastodynie=3 Ecoulement mamelonnaire=4
Ulcération cutanée=5 Lymphœdème=6 Syndrome para néoplasique=7
Métastases=8 Adénopathies= 9

2- Antécédents

Antécédents personnels

-Médicaux

- De cancer du sein
- Autres antécédents médicaux à préciser

-Chirurgicaux

Antécédents gynécologiques

-Age de la ménarche /___/

-Age de la première grossesse /____/ Nombre de gestité /___/ Nombre de parité /___/

-Notion d'allaitement NON /____/ OUI /___/ Si OUI : Exclusif NON /__/ OUI /___/ Préciser la durée

-Contraception orale NON /____/ OUI /___/ Si OUI, Préciser la molécule

Antécédents familiaux

Cancer de sein NON /___/ OUI /___/ Préciser le lien de parenté

Cancer de l'ovaire NON /___/ OUI /___/ Préciser le lien de parenté

Autres cancers

3- Signes cliniques

- Etat général initial : IP/OMS **:** /___/
- Caractéristiques de la tumeur
  - Latéralité du sein : /___/ Droit=1 Gauche=2

- Quadrant : /___/ Inféro interne=1, Inféro externe=2, Supéro-interne=3, Supéro-externe=4
- Taille de la lésion primitive : /___/ (cm)
- SCHEMA DU SEIN

▪ Classification c TNM

- Taille de la tumeur(T) : /___/ T0=0 T1=1 T2=2 T3= 3 T4=4 Tx=5
- .Ganglions régionaux (N) : /___/ N0=0 N1=1 N2=2 N3=3 Nx=4
- Métastases (M) : /___/ M0=0 M1=1 Mx=2
- Si métastases (lors du diagnostic), localisation : /___/
- Stade UICC : /___/ Stade 0=0 Stade I=1 Stade II=2 Stade III= 3
  Stade IV= 4
- Cerveau=1 Poumon=2 Foie=3 Os=4 Prolongement axillaire = 5 Autres= 6 (Préciser

4- <u>Données paracliniques</u>

▪ **Mammographie** :

Classification ACR : /___/ ACR0=0 ACR1=1 ACR2= 2 ACR3=3 ACR4=4 ACR5=5

Taille des lésions : /___/ (mm)

▪ **Echographie** :

Classification ACR : /___/ ACR0=0 ACR1=1 ACR2= 2 ACR3=3 ACR4=4 ACR5=5

Adénopathies suspectes à l'échographie : /___/ Oui=1 Non=2

Si oui, préciser Siege : /___/ Cervicale=1 Thoracique=2 Abdominale=3 Pelvienne=4

▪ **Type de prélèvement** :

- Cytoponction à l'aiguille fine : /___/ Oui=1 Non=2

  Si oui, résultats : /___/ Positif=1 Négatif=2

  Biopsie à l'aiguille : /___/ Oui=1 Non=2

- **Histologie** :

  - Type de prélèvement : /___/ Biopsie=1 Pièce opératoire=2 Nodulectomie= 3

    Echoguidée : /___/ Oui =1 Non=2

  - Taille de la tumeur : /___/ (mm

  - Type histologique : /__/

C. canalaire in situ=1 C.lobulaire in situ=2 C. canalaire infiltrant(NS)=3 C. lobulaire infiltrant=4 C.tubuleux=5 C.médullaires=6 C.mucineux=7 C.adénoides kystiques ou cylindromes=8 C.métaplastique=9 C. inflammatoires=10 Autres tumeurs malignes non épithéliales=11

- Immunohistochimie

- Récepteurs aux œstrogènes : /___/ (+)=1 (-)=2

  Taux : /___/ Intensité : /___/ Une croix=1 Deux croix=2 Trois croix=3

- Récepteurs à la progestérone : /___/ (+)=1 (-)=2

  Taux : /___/ Intensité : /___/ Une croix=1 Deux croix=2 Trois croix=3

- Classification SBR : /___/ SBR1=1 SBR2=2 SBR3=3 Inconnu=4

- Her2 : /___/ Absent = 0 Une croix=1 Deux croix=2 Trois croix=3

- Profil IHC : /___/

Luminal A =1, Luminal B non Her=2 , Luminal B, Her=3 HER2=4 , Triple Négatif =5 Inclassable=6

Annexe 2 : Avis du comité d'éhique

UNIVERSITE D'ABOMEY-CALAVI
COMITE D'ETHIQUE ET DE RECHERCHE DES SCIENCES DE LA SANTE (CER-SS)

N° 007-2021/UAC/CERSS/P/SG/R/SA Cotonou le 17 décembre 2021

AVIS ETHIQUE

Le Comité d'Ethique et de Recherche des Sciences de la Santé (CERSS), en sa session du 17 décembre 2021 a étudié le dossier du projet de recherche « **Génétique des cancers du sein au Benin : recherche de mutations délétères constitutionnelles et acquises** » soumis par **FASSINOU Rose-Mariane**.

Ledit projet respecte les principes éthiques fondamentaux mais la composition du dossier de soumission n'est pas conforme aux critères d'évaluation du CERSS.

En conséquence, le CERSS émet un **avis favorable sous réserve** de la prise en compte des observations suivantes (à mettre à disposition du CERSS) :

- fournir l'engagement des auteurs à respecter l'avis éthique
- compléter la note d'information (Mieux renseigner la note d'information sur les risques (une biopsie est invasive) encourus et dire comment ces risques seront pris en charge)

Le Président

Comité d'Ethique pour la Recherche en Sciences de la Santé Université d'Abomey Calavi Le Président

Prof Francis DOSSOU

TABLE DES MATIERES

ACTION DE GRÂCE i
DEDICACES iii
REMERCIEMENTS vi
HOMMAGES ix
LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS xi
LISTE DES TABLEAUX xvi
LISTE DES FIGURES xvii
SOMMAIRE xix
INTRODUCTION 1
1. GENERALITES 3
1.1. Epidémiologie descriptive 4
1.1.1. Incidence 4
1.1.2. Mortalité 5
1.2. Epidémiologie analytique 6
1.2.1. Facteurs hormonaux 6
1.2.2. Facteurs liés à la reproduction 8
1.2.3. Facteurs liés aux habitudes de vie 8
1.2.4. Autres facteurs de risque 9
1.3. Rappels 10
1.3.1. Rappels anatomiques [24] 10
1.3.1.1. Situation des seins 10
1.3.1.2. Forme des seins 11
1.3.1.3. Poids et consistance des seins 11
1.3.1.4. Plaque aréolo-mammaire et la glande mammaire 11
1.3.1.5. Moyens de fixation du sein 12
1.3.1.6. Vascularisation 13
1.3.1.6.1. Artères 13
1.3.1.6.2. Veines 14

1.3.1.6.3. Lymphatiques 14
1.3.1.7. Innervation 15
1.3.2. Rappel histologique 15
1.3.3. Rappels physiologiques [24] 16
1.4. Diagnostic et traitement du cancer du sein 16
1.4.1. Diagnostic 16
1.4.1.1. Signes cliniques [26,27] 16
1.4.1.2. Examens paracliniques 17
1.4.1.2.1. Examens d'imagerie 17
1.4.1.2.2. Histologie 19
1.4.2. Traitement 23
1.4.2.1. But 23
1.4.2.2. Moyens 23
1.4.2.2.1. La chirurgie [36] 23
1.4.2.2.2. La radiothérapie 24
1.4.2.2.3. L'hormonothérapie [37] 24
1.4.2.2.4. La chimiothérapie [37] 24
1.4.2.2.5. Les thérapies ciblées [38] 25
1.5. Epidémiologie génétique du cancer du sein 25
1.5.1. Rappels de notions de génétique 25
1.5.2. Facteurs de risque génétique du cancer du sein 26
1.5.3. Différents types de mutations 28
1.5.3.1. Les mutations chromosomiques [40,41] 29
1.5.3.2. Les mutations ponctuelles 30
1.5.3.3. Les mutations germinales / somatiques 30
1.5.3.4. Les mutations dynamiques 30
1.5.4. Les gènes de prédisposition génétique 31
2. CADRE ET METHODE D'ETUDE 35
2.1. Cadre d'étude 36

2.1.1. Le Centre National Hospitalier Universitaire Hubert KOUTOUKOU MAGA (CNHU-HKM) de Cotonou 36
2.1.2. Le Centre Hospitalier Universitaire de la Mère et de l'Enfant Lagune (CHU-MEL) 37
2.1.3. Le laboratoire d'Histologie, de Biologie de la Reproduction, Cytogénétique et Génétique Médicale (LHBRCGM) 37
2.1.4. Le laboratoire d'anatomie et de cytologie pathologique DUBOIS 37
2.1.5. Le laboratoire d'Epidémiologie des Maladies Chroniques en zone Tropicale (EpiMaCT) 38
2.1.6. Le service d'anatomie pathologique du CHU Dupuytren 38
2.2. Méthode d'étude 38
2.2.1. Type d'étude 38
2.2.2. Période d'étude 39
2.2.3. Population d'étude 39
2.2.4. Critères d'inclusion et de non inclusion 39
2.2.4.1. Critères d'inclusion 39
2.2.4.2. Critères de non inclusion 39
2.2.5. Echantillonnage 40
2.2.5.1. Taille de l'échantillon 40
2.2.5.2. Technique d'échantillonnage 40
2.2.6. Variables étudiées 40
2.2.7. Outils et technique de collecte des données 41
2.2.7.1. Source de données 41
2.2.7.2. Outil de collecte 41
2.2.8. Déroulement de l'enquête 41
2.2.9. Etude génétique 42
2.2.9.1. Partie rétrospective 42
2.2.9.1.1. Traitement des blocs de paraffine 42
2.2.9.1.2. Extraction de l'ADN 42

2.2.9.2. Partie prospective 43
2.2.9.2.1. Prélèvements tissulaires 43
2.2.9.2.2. Conservation des fragments tissulaires 43
2.2.9.3. Extraction de l'ADN à partir de biopsie 43
2.2.10. Dosage de la quantité d'ADN 45
2.2.11. Dosage de la qualité d'ADN : la PCR quantitative 45
2.2.12. Préparation de librairie pour le séquençage haut débit par capture 46
2.2.13. La réaction de polymérisation en chaine 46
2.2.14. Séquençage de Sanger 47
3.2.15. Traitement et analyse des données 47
3.2.16. Considérations éthiques 47
3.2.17. Difficultés rencontrées 48
3. RESULTATS 49
3.1. Partie rétrospective 50
3.1.1. Caractéristiques des patientes 50
3.1.1.1. Caractéristiques socio démographiques des patientes 50
3.1.1.2. Antécédents 50
3.1.1.2.1. Antécédents personnels médicaux 50
3.1.1.2.2. Antécédents familiaux de cancer 50
3.1.1.3. Types histologiques 50
3.1.2. Faisabilité d'analyse génétique à partir de blocs de paraffine 51
3.1.2.1. Quantité d'ADN 51
3.1.2.2. Qualité d'ADN 52
3.1.2.3. Extraction en série des différents blocs mise à disposition 53
3.1.2.4. Résultats du Séquençage NGS 54
3.1.2.5. Validation des mutations par séquençage Sanger 55
3.2. Etude prospective 58
3.2.1. Caractéristiques des patientes 58
3.2.1.1. Caractéristiques socio démographiques des patientes 58

3.2.1.2. Antécédents et facteurs de risque 58
3.2.1.2.1. Age des ménarches 58
3.2.1.2.2. Antécédents de ménopause et de mastopathie 58
3.2.1.2.3. Contraception hormonale œstroprogestative 58
3.2.1.2.4. Autres antécédents personnels médicaux 58
3.2.1.2.5. Antécédents familiaux de cancer 59
3.2.2. Données relatives aux caractéristiques cliniques des tumeurs 59
3.2.2.1. Motif de consultation 59
3.2.2.2. Siège de la tumeur 60
3.2.3. Types histologiques 61
3.2.4. Faisabilité d'analyse génétique à partir de tissus frais 61
3.2.4.1. Quantité d'ADN 61
3.2.4.2. Qualité d'ADN 62
3.2.4.3. Séquençage NGS sur l'échantillon T2 62
4. DISCUSSION 63
4.1. Atteinte des objectifs de notre étude 64
4.2. Validité de nos résultats 64
4.3. Comparaison des résultats avec ceux des études d'autres auteurs 64
4.3.1. Caractéristiques sociodémographiques 64
4.3.1.1. Age des patientes 64
4.3.1.2. Age des ménarches 65
4.3.1.3. Antécédent familial de cancer 65
4.3.1.4. Allaitement maternel 66
4.3.1.5. Contraception œstroprogestative 66
4.3.1.6. Motif de consultation 67
4.3.2. Etude génétique 67
4.3.2.1. Partie rétrospective 67
4.3.2.2. Partie prospective 70
CONCLUSION 72

SUGGESTIONS 74
REFERENCES 77
ANNEXES ..... A
TABLE DES MATIERES ..... a

SERMENT D'HIPPOCRATE

Devant le peuple béninois et en présence des maîtres de cette faculté, de mes chers condisciples, devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'être suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires. Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me sont confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime. Je ne permettrai pas que les considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine dès la conception. Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

Respectueux et reconnaissant envers les maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs parents. Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobres et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Je le jure

LE PRESIDENT DU JURY

VU LE DOYEN

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

LE RECTEUR DE L'UNIVERSITE D'ABOMEY-CALAVI

RESUME

Introduction : Le cancer du sein est le premier cancer chez la femme au Bénin, aussi bien en termes d'incidence que de mortalité. Bien que l'incidence en Afrique au Sud du Sahara et au Bénin en particulier, reste l'une des plus faibles au monde, la mortalité y est parmi les plus élevées avec des formes particulièrement agressives atteignant des femmes jeunes ; ce qui suggère des facteurs génétiques. Au Bénin, à notre connaissance, peu d'étude ont été consacrée à la recherche de mutations génétiques délétères dans le cancer du sein par la méthode NGS.

Objectif : Identifier les mutations génétiques délétères chez des femmes atteintes d'un cancer du sein au Bénin.

Méthode : Il s'agissait d'une étude transversale descriptive à la fois rétrospective (du 01 Janvier 2015 au 31 Décembre 2019) et prospective (du 07 Février au 31 Octobre 2022). La partie rétrospective a porté sur des blocs de tumeurs du sein fixées au formol et inclus en paraffine et des observations médicales de patientes. La partie prospective a porté sur des patientes atteintes d'un cancer du sein et vues en consultation chez qui, des prélèvements tissulaires ont été réalisés. Après extraction de l'ADN, la quantité a été dosée par spectrophotomètre. La qualité de l'ADN a été évaluée par la méthode qPCR au Sybr Green.

Résultats : La partie rétrospective a intéressé un total 25 blocs de tumeur du sein. L'âge moyen des patientes était de 47,1ans ± 10,3. Une patiente (1/25) avait un antécédent familial de cancer du sein. La quantité d'ADN extraite des blocs variait entre 19,4 et 730ng/µL. Le séquençage NGS a montré la présence de mutations dans le gène BRCA2, TP53, PALB2. En ce qui concerne la partie prospective, l'âge moyen des patientes était de 49,4ans ± 13,4. L'extraction a permis d'avoir une quantité d'ADN variant de 13,5 à 1275ng/µL.

Conclusion : Le séquençage de type NGS peut être réalisé aussi bien sur des blocs de paraffine que sur des prélèvements tissulaires frais. Des mutations génétiques délétères sont retrouvées chez des femmes béninoises atteintes d'un cancer du sein.

Mots clés : Cancer du sein, Séquençage NGS, Mutations génétiques, BRCA2, TP53, PALB2

ABSTRACT

Introduction: Breast cancer is the leading cancer in women in Benin, both in terms of incidence and mortality. Although the incidence in sub-Saharan Africa, and in Benin in particular, remains one of the lowest in the world, mortality is among the highest, with particularly aggressive forms affecting young women ; which suggests genetic factors. In Benin, to our knowledge, few studies have been devoted to the search for deleterious genetic mutations in breast cancer by the NGS method.

Objective: To identify deleterious genetic mutations in women with breast cancer in Benin.

Method: This was a descriptive cross-sectional study, both retrospective (from January 01, 2015 to December 31, 2019) and prospective (from February 07 to October 31, 2022). The retrospective part included formalin-fixed, paraffin-embedded breast tumor blocks and medical observations of patients. The prospective part involved patients with breast cancer who were seen in consultation and from whom tissue samples were taken. After extraction of the DNA, the quantity was measured by spectrophotometer. The quality of the DNA was assessed by qPCR with Sybr Green.

Results: The retrospective part involved a total of 25 breast tumor blocks. The average age of the patients was 47.1 ± 10.3 years. One patient (1/25) had a family history of breast cancer. The amount of DNA extracted from the blocks ranged from 19.4 to 730ng/µL. NGS sequencing showed the presence of mutations in the BRCA2, TP53, PALB2 gene. For the prospective part, the average age of the patients was 49.4 ± 13.4 years. The extraction allowed to have a quantity of DNA ranging from 13.5 to 1275ng/µL.

Conclusion: NGS sequencing types can be performed on the blocks as well as on fresh tissue samples. Deleterious genetic mutations have been found in Beninese women with breast cancer

Keywords: Breast cancers, NGS sequencing, Genetic mutations, BRCA2, TP53, PALB2