

PÉNÉTRANCE DES MUTATIONS DU GÈNE BRCA1 ET DE L'ADN MITOCHONDRIAL DANS L'OCCURRENCE DU CANCER DU SEIN EN TUNISIE

Wafa Troudi*&***, Besma Loueslati **, Amal Bacchar *, Farhat Ben Ayed **, Amel Ben Ammar El Gaaied *.

(*) Laboratory of Genetics, Immunology and Human Pathology at the Faculty of Sciences of Tunis. Faculty of Sciences of Tunis. University El Manar I

(**) Salah Azaiez Institute of Carcinology of Tunis

W. Troudi, B. Loueslati, A. Bacchar, F. Ben Ayed, A. Ben Ammar El Gaaied.

W. Troudi, B. Loueslati, A. Bacchar, F. Ben Ayed, A. Ben Ammar El Gaaied.

PÉNÉTRANCE DES MUTATIONS DU GÈNE BRCA1 ET DE L'ADN MITOCHONDRIAL DANS L'OCCURRENCE DU CANCER DU SEIN EN TUNISIE

PENETRANCE OF BRCA1 GENE MUTATION AND DNA MITOCHONDRIAL IN TUNISIAN BREAST CANCER OCCURRENCE

LA TUNISIE MEDICALE - 2009 ; Vol 87 (n°08) : 494 - 498

LA TUNISIE MEDICALE - 2009 ; Vol 87 (n°08) : 494 - 498

RÉSUMÉ

But: L'objectif de cette étude est d'évaluer l'implication des mutations du gène BRCA1 ainsi que les mutations du microsatellite mitochondrial situé entre les positions 303-315 dans l'occurrence du cancer du sein en Tunisie.

Méthodes : Neuf patientes Tunisiennes atteintes de cancer du sein héréditaire ont été analysées. Pour chaque patiente, l'ADN génomique total a été extrait et utilisé comme matrice pour l'amplification des 24 exons du gène BRCA1 et de la région hypervariable HV2 de l'ADN mitochondrial. Les amplicons obtenus ont été purifiés puis séquencés automatiquement.

Résultats : Les résultats ont révélé cinq types de mutations au niveau du microsatellite mitochondrial situé entre les positions 303 et 315 et deux mutations délétères du gène BRCA1 chez deux patientes non apparentées qui présentent la même mutation mitochondriale (315.insC) suggérant son implication dans la modulation de la pénétrance des mutations délétères de BRCA1.

SUMMARY

Aim : The aim of this study is to evaluate the implication of BRCA1 gene and the mitochondrial micro satellite (situated between 303 and 315 positions) mutations in the occurrence of breast cancer in Tunisia.

Methods : Nine Tunisian patients with hereditary breast cancer have been analyzed. For each patient, total genomic DNA was extracted and used as a template for the amplification of 24 exons of the BRCA1 gene and an hyper variable mitochondrial region. The obtained products were purified and automatically sequenced.

Results : The results revealed five types of mutations for the micro satellite situated between the 303 and 315 positions and two deleterious BRCA1 mutations for two unrelated patients which present the same mitochondrial mutation (315.insC) suggesting his implication in the modulation of the BRCA1 deleterious mutations penetrance.

MOTS - CLÉS

Cancer du sein, gène BRCA1, ADN mitochondrial, Tunisie

KEY - WORDS

Breast cancer; BRCA1 gene; mitochondrial DNA; Tunisia.

تدخل طفرات الجين BRCA1 المتقدراتي في توارث سرطان الثدي في تونس.

الباحثون : ترودي. و - وسلاتي. ب - بن عمار القعيد. أ.

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم تدخل طفرات الجين اششؤص في توارث سرطان الثدي في تونس.

أشتملت دراستنا على 9 مريضات مصابات بسرطان الثدي الوراثي.

أثبت نتائج الأبحاث الجينية التي أجريت بواسطة الهطش المجيني وجود 5 أنماط للطفرات الجينية على مستوى السوائل الصغيرة المتقدراتية المتواجدة بين الأوضاع 303 و 315 و

نمطين للطفرات الجينية للجين اششؤص لدى مريضتين غير متقاربتين تحملان نفس الطفرة (315.insC) توحي بتدخل الطفرات في تطبع أنتفاذ طفرات BRCA1

الكلمات الأساسية : سرطان الثدي - جين -ACRB1 تونس

Le cancer du sein représente, dans le monde, la néoplasie la plus fréquente de la femme [1]. Son incidence est plus élevée dans les pays développés que dans les pays en développement (63,2/100000 versus 23,1/100000) [2,3].

En Tunisie, comme dans la grande majorité des pays du monde, le cancer du sein est le premier cancer féminin; son incidence standardisée a été estimée à 24,3 pour 100000 femmes entre 1993-1997 [1]. Il se caractérise par sa survenue relativement fréquente chez la femme jeune. Le diagnostic est relativement tardif dans la majorité des cas, avec des tumeurs assez volumineuses (4 cm de diamètre moyen) et d'emblée un pourcentage élevé d'extension métastatique [4,5].

Ce cancer peut être héréditaire ou sporadique. Plusieurs facteurs de risque sont impliqués: les facteurs hormonaux, héréditaires, environnementaux, et alimentaires.

Des études de liaison génétique dans certaines familles à haut risque de cancer du sein ont identifié 2 gènes majeurs, BRCA1 et BRCA2, localisés respectivement sur les chromosomes 17q21 et 13q12-13 [6]. Cependant, des études épidémiologiques ont montré que des mutations délétères dans ces gènes sont relativement rares dans la population générale [7]. Les mutations constitutionnelles au niveau des gènes BRCA1 et BRCA2 peuvent justifier ensemble 2 à 3 % de tous les cancers du sein et aux environ 30 à 40% de tous les cancers héréditaires [8] qui constituent 5 à 10% de l'ensemble des cancers du sein. En Tunisie, les mutations des gènes BRCA1 et BRCA2 sont impliquées dans 19,4 % des cancers du sein héréditaires [9].

La présentation des familles de cancer du sein montre clairement que malgré leur forte pénétrance, les mutations délétères dans les gènes majeurs BRCA1 et BRCA2 ne conduisent pas toujours au cancer du sein. Cette pénétrance incomplète s'expliquerait par des facteurs environnementaux et génétiques modulant l'expression des mutations dans les gènes majeurs.

Les mutations mitochondriales pourraient constituer un facteur de risque génétique, pouvant interférer avec la pénétrance des gènes majeurs.

Récemment, des mutations de l'ADN mitochondrial, ont été corrélées au mécanisme de la carcinogenèse. En effet, les mitochondries sont des organites qui jouent un rôle essentiel dans le métabolisme énergétique et la régulation de l'apoptose [10], qui joue un rôle critique dans le développement des cancers ainsi que dans la réponse cellulaires aux agents anticancéreux. De ce fait l'étude des mutations mitochondriales dans les cancers représente, actuellement, un domaine d'investigation important [11,12].

Dans le cancer du sein, les mutations mitochondriales ont été identifiées au niveau somatique chez 74% des cas. La majorité de ces mutations sont des insertions et/ou délétions d'une ou de plusieurs cytosines qui surviennent au niveau d'un microsatellite situé entre les positions 303 et 315, dans la deuxième région hypervariable HV2 de la majeure région non codante de l'ADN mitochondrial [13].

Au niveau germinale, les mutations mitochondriales peuvent être impliquées dans l'occurrence du cancer du sein dans les familles présentant une transmission maternelle de la

pathologie. En effet, le génome mitochondrial présente une hérédité maternelle.

Dans la présente étude, nous avons recherché les mutations du gène BRCA1 ainsi que les mutations du microsatellite mitochondrial situé entre les positions 303-315 chez 9 patientes Tunisiennes atteintes d'un cancer du sein héréditaire afin d'évaluer l'implication de ces deux marqueurs dans la survenue de cette pathologie.

MATERIELS ET METHODES

1- Patientes

Neuf patientes Tunisiennes atteintes de cancer du sein héréditaire, traitées au service de Chimiothérapie à l'Institut de Carcinologie Salah Azaiez, ont fait l'objet de cette étude.

Pour chaque patiente un arbre généalogique a été établi suite à un questionnaire et un consentement éclairé.

Certains critères de sélections permettent de prédire la suggestivité de la famille en terme de mutation BRCA1 ou BRCA2, ces critères ne diffèrent pas de ceux adoptés pour les patients européens et américains [14].

Ainsi pour prédire la suggestivité d'une famille de mutations BRCA1 il faut que cette dernière réponde à l'un des critères suivants : Au moins une apparentée au premier degré ayant développé un cancer du sein à un âge jeune (< 40 ans) ; trois apparentées au premier degré ayant développé le cancer du sein; au moins une apparentée au premier degré ayant développé le cancer ovarien ; apparition du cancer du sein bilatéral chez le cas index ou chez une apparentée au premier degré ; apparition du cancer dans deux sites différents essentiellement un cancer du sein associé à un cancer ovarien.

Pour prédire la suggestivité d'une famille de mutations BRCA2 le principal critère de sélection est la présence d'au moins deux cancers du sein dans la famille dont au moins un apparaissant chez un sujet masculin.

Les paramètres cliniques et anatomopathologiques ont été également obtenus à partir des dossiers cliniques.

2- Analyse moléculaire

Pour chaque patiente 5 ml de sang total ont été prélevés sur EDTA 0,1 M. L'ADN génomique total a été extrait à partir du culot leucocytaire suite à une digestion par la protéinase K puis purifié sur une colonne (QIAGEN Inc, Chatsworth, CA, USA). Les 24 exons du gène BRCA1 ont été analysés par PCR suivie de séquençage direct selon les protocoles décrits par Troudi et ses collaborateurs 2007 [9]. L'exon 11 qui constitue 60% de la région codante du gène BRCA1 a été amplifié en 9 régions qui se recouvrent. Au total, 32 amplicons ont été amplifiés puis séquencés pour chaque patiente.

Parallèlement, la région hypervariable HV2 de l'ADN mitochondrial a été amplifiée par PCR, en utilisant deux amorces spécifiques. Les réactions d'amplification ont été réalisées selon les mêmes conditions décrites par Friji et ses collaborateurs en 2006 [15]. Les amplifiats obtenus ont été par la suite purifiés en utilisant le kit de purification Invitrogen puis séquencés automatiquement avec les amorces sens et antisens utilisées pour la PCR. Chaque séquence ainsi obtenue a été

comparée à la version révisée de la séquence de référence de Cambridge: rCRS afin d'identifier les mutations entre les positions 303 et 315 [16].

RESULTATS

La présente étude a porté sur 9 patientes Tunisiennes atteintes de cancer du sein héréditaire. Selon les arbres généalogiques, six patientes parmi les neuf étudiées présentent une transmission maternelle du cancer du sein. En effet, au moins la mère et/ou la grand-mère et/ou la tante du cas index est atteinte par la même pathologie (figure 1).

L'âge moyen des patientes est de 46 ans compris entre 38 et 58 ans. La majorité des patientes est atteinte d'un cancer du sein canalaire infiltrant (6/9), une patiente présente un cancer lobulaire infiltrant et une patiente un carcinome mixte.

Quatre patientes sont de grade III, toutes les patientes ont un envahissement ganglionnaire, avec 5/9 cas de stade II (A ou B) (Tableau 1).

L'analyse moléculaire du gène BRCA1 a montré deux mutations délétères du gène BRCA1 chez deux patientes non apparentées (Tableau 2).

Par ailleurs, l'analyse des séquences de la région HV2 mitochondriale a révélé cinq types de mutations au niveau du microsatellite situé entre les positions 303 et 315. Quatre patientes présentent la mutation 315.insC, deux patientes ont à la fois les deux mutations 309.insC et 315.insC, deux patientes présentent respectivement la mutation 315.insA, d'une part et les deux mutations 309.insCC et 315.insC d'autre part; une seule patiente possède une séquence identique à la séquence de référence (rCRS) (Tableau 2).

Figure 1 :Pédigrées de 9 familles atteintes de cancer du sein héréditaire

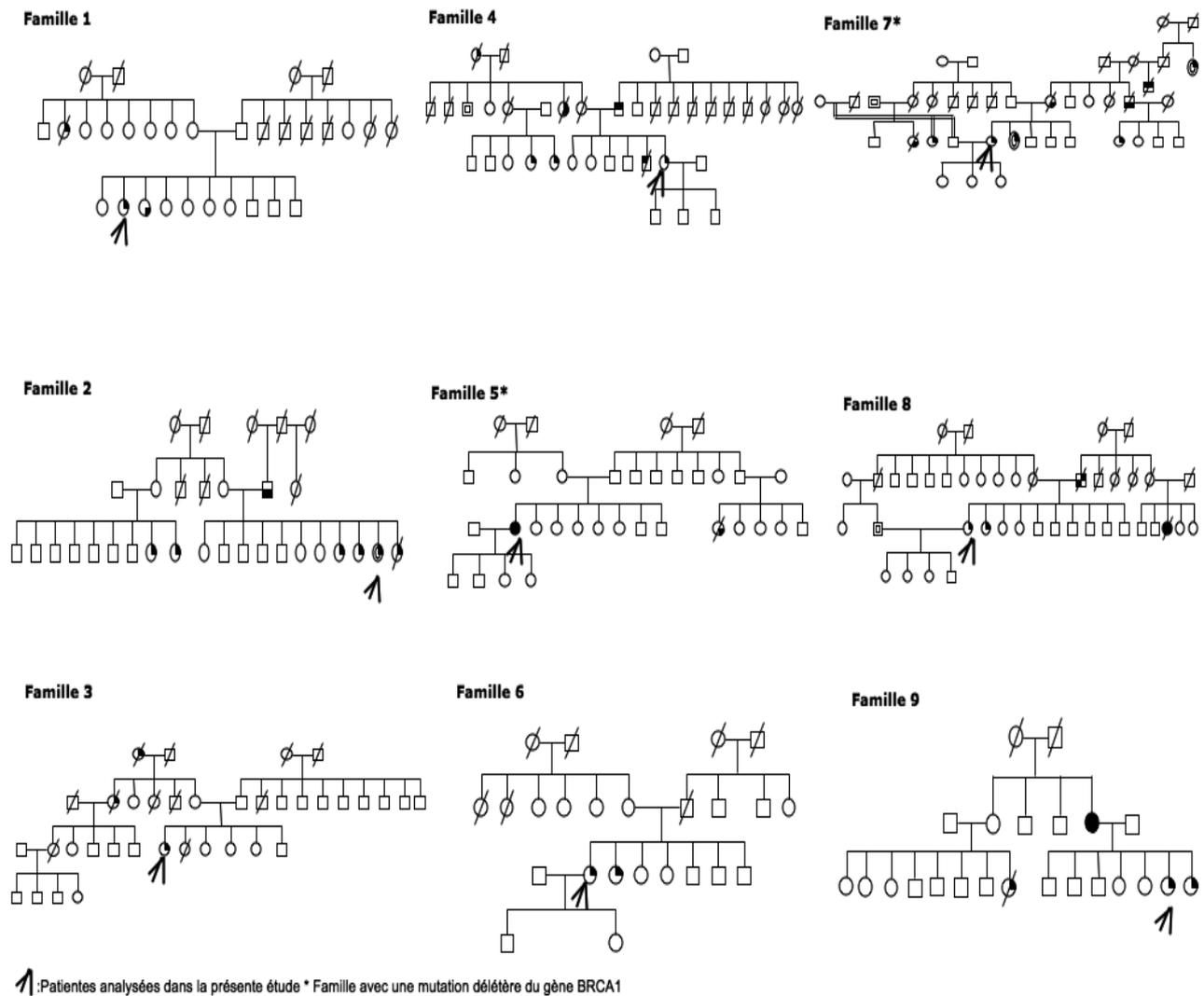


Tableau 1 : Paramètres cliniques et anatomopathologiques des patientes Tunisiennes atteintes de cancer du sein héréditaire

Code patientes	Age au diagnostic	Histologie	Grade			N	Stade FIGO
			I	II	III		
1	43	CCI	1		+	II B	
2	38						
3	52	CLI		1	+	I	
4	58	CCI + CLI	1		+	II A	
5	50	CCI		1	+	II B	
6	44	CCI	1		+		
7	45	CCI		1	+	II B	
8	45	CCI		1	+	II B	
9	40	CCI Bifocal	1		+	IV	

N : envahissement ganglionnaire ; ND : non déterminé ; CCI : carcinome canalaire infiltrant ; CLI : carcinome lobulaire infiltrant

Tableau 2 : Mutations mitochondriales et délétères du gène BRCA1 des patientes Tunisiennes atteintes de cancer du sein héréditaire

Code patientes	Transmission Maternelle de la maladie	Mutations du microsatellite mitochondrial 309-310	Mutations délétères du gène BRCA1
1	+	315.insC	
2	+	rCRS	
3	+	309.insCC-315.insC	
4	+	309.insC-315.insC	
5	-	315.insC	5385 insC
6	-	315.insA	
7	+	315.insC	2789 delG
8	-	309.insC-315.insC	
9	+	315.insC	

DISCUSSION

Les deux patientes (5 et 7) présentant chacune une mutation délétère du gène BRCA1 présentent la même mutation mitochondriale (315.insC). Cette dernière a été associée positivement à l'occurrence du cancer du sein en Tunisie (résultats soumis pour publication) et pourrait donc représenter un facteur de risque pour la survenue du cancer du sein. Sachant que les mutations délétères du gène BRCA1 constituent des mutations majeures s'exprimant avec une pénétrance incomplète (autour de 80%), les variants mitochondriaux pourraient constituer des gènes modificateurs modulant la pénétrance de BRCA1. En effet, l'analyse des arbres généalogiques de ces deux patients montrent que:

- La patiente 5 atteinte d'un cancer du sein et d'un cancer ovarien a une cousine paternelle atteinte d'un cancer ovarien d'où l'hypothèse de la transmission paternelle de la mutation du gène BRCA1. Chez cette patiente, l'occurrence du cancer serait le résultat, en plus d'autres facteurs environnementaux et épidémiologiques, de l'effet additif de la mutation mitochondriale (315.insC) transmise par la mère et de la mutation délétère du gène BRCA1, transmise par le père.

- Pour la patiente 7 dont la mère est atteinte d'un cancer ovarien et dont la grand-mère, la sœur ainsi que deux cousines sont atteintes d'un cancer du sein, la transmission maternelle de la mutation BRCA1 est associée à celle de la mutation mitochondriale. La transmission selon le mode autosomique dominant de la susceptibilité au cancer du sein due à la mutation BRCA1, s'accompagne d'une forte pénétrance de cette dernière. Cette forte pénétrance s'expliquerait par l'effet modificateur de la mutation mitochondriale 315. insC qui co ségrége dans la famille avec la mutation délétère.

En conclusion, les résultats obtenus pour ces deux familles, permettraient de considérer la mutation mitochondriale 315insC comme une mutation modulatrice de la pénétrance des mutations délétères de BRCA1. Mais ces hypothèses nécessitent d'être confirmés par l'analyse génétique des tous les membres des deux fratries. Cela ne pourra se réaliser que dans le cadre d'une consultation d'oncogénétique et en respect des règles éthiques.

Pour les 7 familles restantes, l'implication du gène BRCA2 dans la prédisposition héréditaire au cancer du sein ou l'implication d'autres facteurs mineurs tel que les mutations mitochondriales doivent être prise en considération. En effet, chez 6 sur les 7 familles considérées, nous avons mis en évidence des mutations au niveau du microsatellite mitochondrial.

Plusieurs études ayant analysé les mutations mitochondriales au niveau de la région non codante ont montré en effet que les mutations du microsatellite mitochondrial 303-315 sont très fréquentes dans la majorité des types de cancers analysés [17]. D'un point de vue fonctionnel, le microsatellite mitochondrial 303-315 est impliqué dans la formation d'un hybride ADN-ARN persistant qui permet l'initiation de la réplication du brin lourd [18,19]. Une mutation de ce microsatellite pourrait bloquer la formation de cet hybride ADN-ARN et donc l'initiation de la réplication du brin lourd de la molécule d'ADN mitochondrial. Le rôle de ce blocage de la réplication du génome mitochondrial dans la transformation tumorale et dans l'échappement des cellules tumorales à la mort cellulaire programmée reste à élucider.

REMERCIEMENTS

Nos remerciements s'adressent à toutes les patientes qui ont accepté volontairement de participer à cette étude. Nous remercions également tout le staff de l'Institut de Carcinologie Salah Azaiez pour leur aide. Cette étude a été financée par le ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche scientifique et de la technologie.

RÉFÉRENCES

1. Hsairi M, Fakhfakh R, Ben Abdallah M, Jlidi R, Sellami A, Zheni S et al. Estimation à l'échelle nationale de l'incidence des cancers en Tunisie. 1993-1997. *Tunisie Médicale* 2002; 80: 57-64.
2. Ben ahmed S, Aloulou S, Bibi M, Landolsi A, Nouira M, Ben Fatma L et al. Pronostic du cancer du sein chez les femmes tunisiennes. Analyse d'une série hospitalière de 729 patientes. *Santé Publique* 2002; 14: 231-41.
3. Ferlay J, Boyle P. Cancer incidence, mortality and prevalence world wide. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France 2004. *Annals of Oncology* 2005; 16: 481-488.
4. Maalej M, Hentati D, Messai T, Kochbati L, El May A, Mrad K, Romdhane KB, Ben Abdallah M, Zouari B. Breast cancer in Tunisia in 2004: a comparative clinical and epidemiological study. *Bull Cancer* 2008; 95: 5-9.
5. Hsairi M, Fakhfakh R, Bellaaj R, Achour N. Knowledge, attitudes and behaviors of women towards breast cancer screening. *East Mediterr Health J* 2003; 9:87-98.
6. Ford D, Easton DF. The genetics of breast and ovarian cancer. *Br J Cancer* 1995; 72: 805-12.
7. Peto J, Collins N, Barfoot R, Seal S, Warren W, Rahman N et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in patients with early-onset breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 943-9.
8. Wooster R, Weber BL. Breast and ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 2339-47.
9. Troudi W, Uhrhammer N, Sibille C, Dahan C, Mahfoudh W, Bouchlaka Souissi C et al. Contribution of the BRCA1 and BRCA2 mutations to breast cancer in Tunisia. *J Hum Genet* 2007; 52: 915-920.
10. Wang T, Lerer I, Gueta Z, Sagi M, Kadouri L, Peretz T, Abeliovich D. A deletion/insertion mutation in the BRCA2 gene in a breast cancer family: a possible role of the Alu-polyA tail in the evolution of the deletion. *Genes Chromosomes Cancer* 2001; 31: 91-5.
11. Alonso A, Martin P, Albarran C, Aquilera B, Garcia O, Guzman A, Oliva H, Sancho M. Detection of somatic mutations in the mitochondrial DNA control region of colorectal and gastric tumors by heteroduplex and single-strand conformation analysis. *Electrophoresis* 1997; 18: 682-685.
12. Zhu W, Qin W, Bradley P, Wessel A, Puckett CL, Sauter ER. Mitochondrial DNA mutations in breast cancer tissue and in matched nipple aspirate fluid. *Carcinogenesis* 2005; 26: 145-152.
13. Parella P, Seripa D, Matera MG, Rabitti C, Rinaldi M, Mazzealli P, Gravina C et al. Mutation of the D310 mitochondrial mononucleotide repeat in primary tumors cytological specimens. *Cancer Letters* 2003; 190: 147-150.
14. Arena JF, Smith S, Plewinska M. BRCA1 mutations in African American women. *Am J Hum Genet* 1996; 59: Suppl A34.
15. Frigi S, Yacoubi B, Pereira F, Pereira L, Amorim A, Elgaaied A. mtDNA lineages in two Tunisian Berber communities: comparing diversities between villages and towns. *International Congress Series* 2006; 1288: 121-123.
16. Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* 1999; 23: 147.
17. Sharma H, Singh A, Sharma C, Jain S K, Singh N. Mutations in the mitochondrial D-loop region are frequent in cervical cancer. *Cancer Cell International* 2005; 34: 1-6.
18. Kang D, Miyako K, Kai Y, Irie T, Takeshige K. In vivo determination of replication origins of human mitochondrial DNA by ligation-mediated polymerase chain reaction. *J Biol Chem* 1997; 272: 15275-15279.
19. Lee DY and Clayton DA. Initiation of mitochondrial DNA replication by transcription and R-loop processing. *J Biol Chem* 1998; 273: 30614-30621.