



Prédisposition au cancer du sein triple négatif  
en l'absence de mutation germinale délétère de  
**BRCA1/BRCA2 :**  
identification de nouveaux gènes et étude de  
leur implication fonctionnelle

Journée ERTICA, 16/09/2014

Marie OLLIER,  
Doctorante au LOM, Centre Jean Perrin  
Directeur de thèse: Pr Yves-Jean BIGNON

# OBJECTIF

- **Recherche de gènes de prédisposition :**
  - aux cancers du sein familiaux
  - sans mutation de BRCA1 ou BRCA2
  - de type triple négatif (CSTN)

## **-> hypothèse :**

certaines CSTN survenant dans un contexte familial de cancers du sein pourraient partager une prédisposition génétique spécifique, différente de celle des autres types de cancer du sein.

# MÉTHODE

- **Sélection de la population d'étude :**

- Base de données du service d'oncogénétique  
(patientes vues en oncogénétique CJP (11 000 personnes environ))
- Critères d'inclusion :
  - patientes ayant eu un cancer du sein triple négatif,
  - non porteuses de mutation dans les gènes BRCA1 et BRCA2,
  - pour lesquelles nous disposons d'ADN,
  - contexte familial à risque :
    - un apparenté au 1er degré ayant eu un cancer du sein,
    - ou appartenir à une famille avec un score de Manchester > 12

-> 50 patientes incluses

# MÉTHODE

- **Population contrôle**

- Bases de données bio-informatiques (contrôle population générale)  
(1000 genomes, Exome variant server)

- Séquençage ciblé par méthode de Sanger des variants pertinents retrouvés chez les cas :

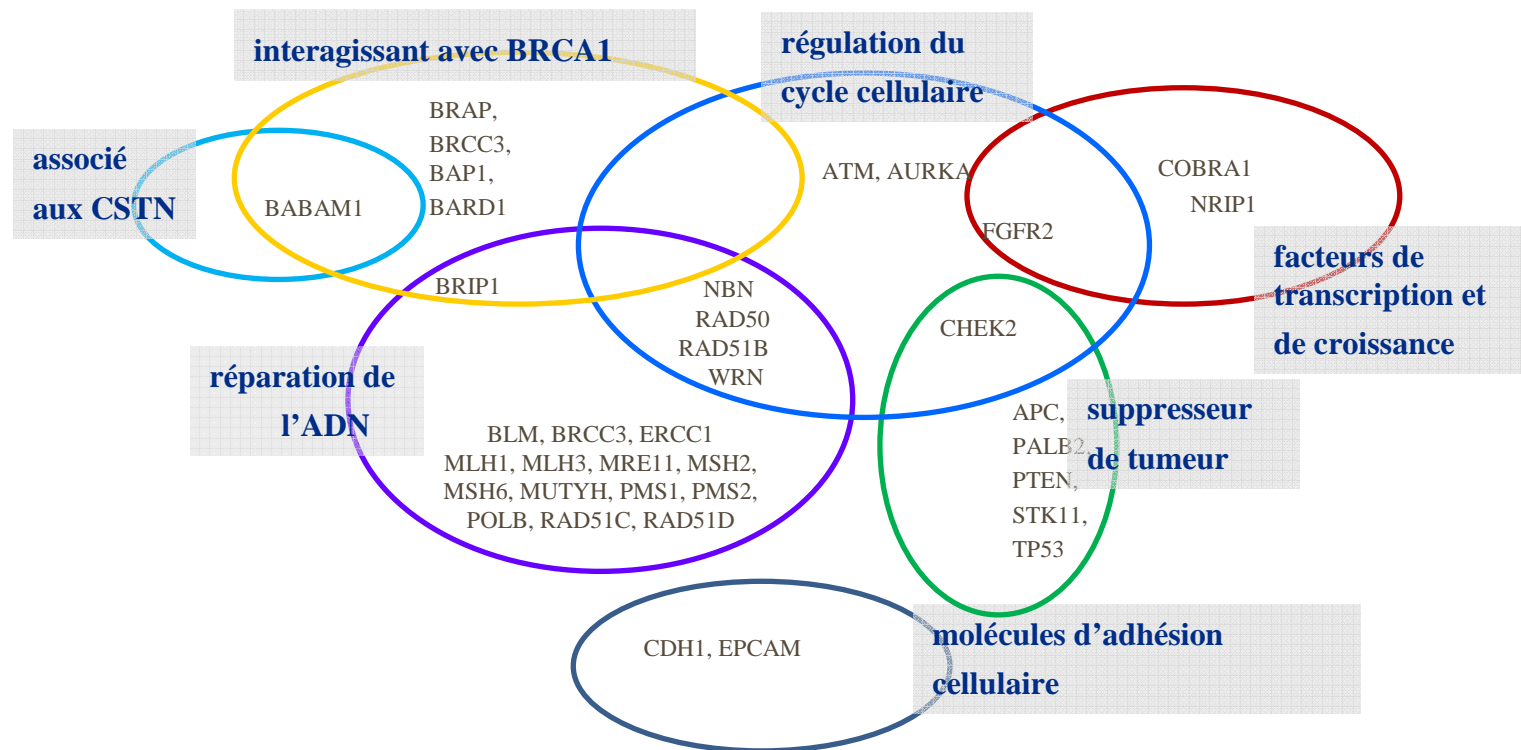
- > dans population contrôle :

- 51 femmes sans histoire personnelle ou familiale de cancer du sein,  
de la même région géographique que les cas,

- appariés sur l'âge (et pour lesquelles nous disposons d'ADN : population COSA témoin).

# MÉTHODE

- **Approche gènes candidats**

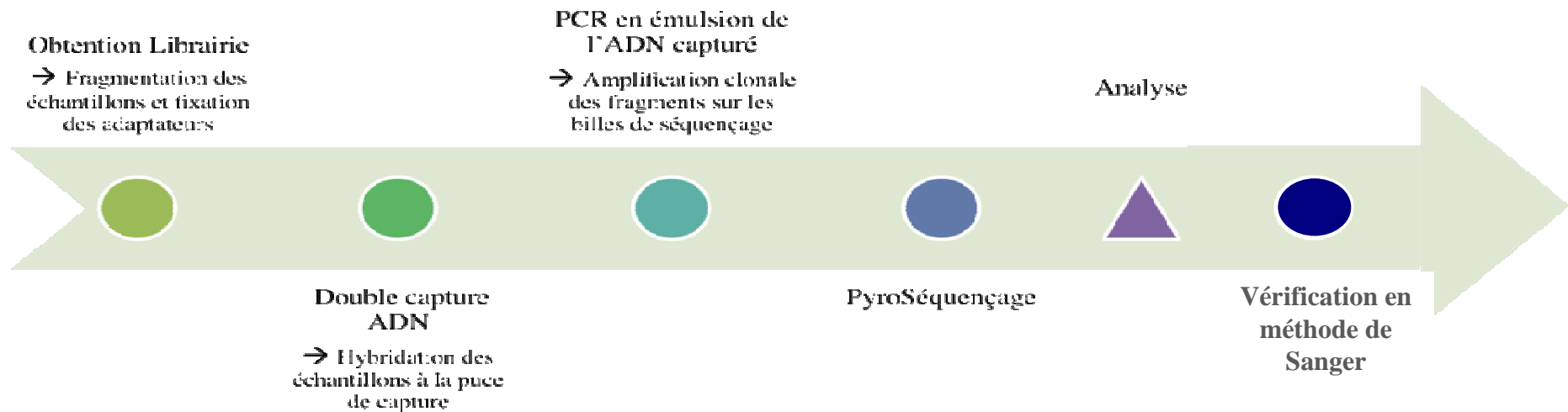


-> Design des amorces : régions codantes, bornes introns-exons et régions régulatrices.

# MÉTHODE

- **Séquençage**

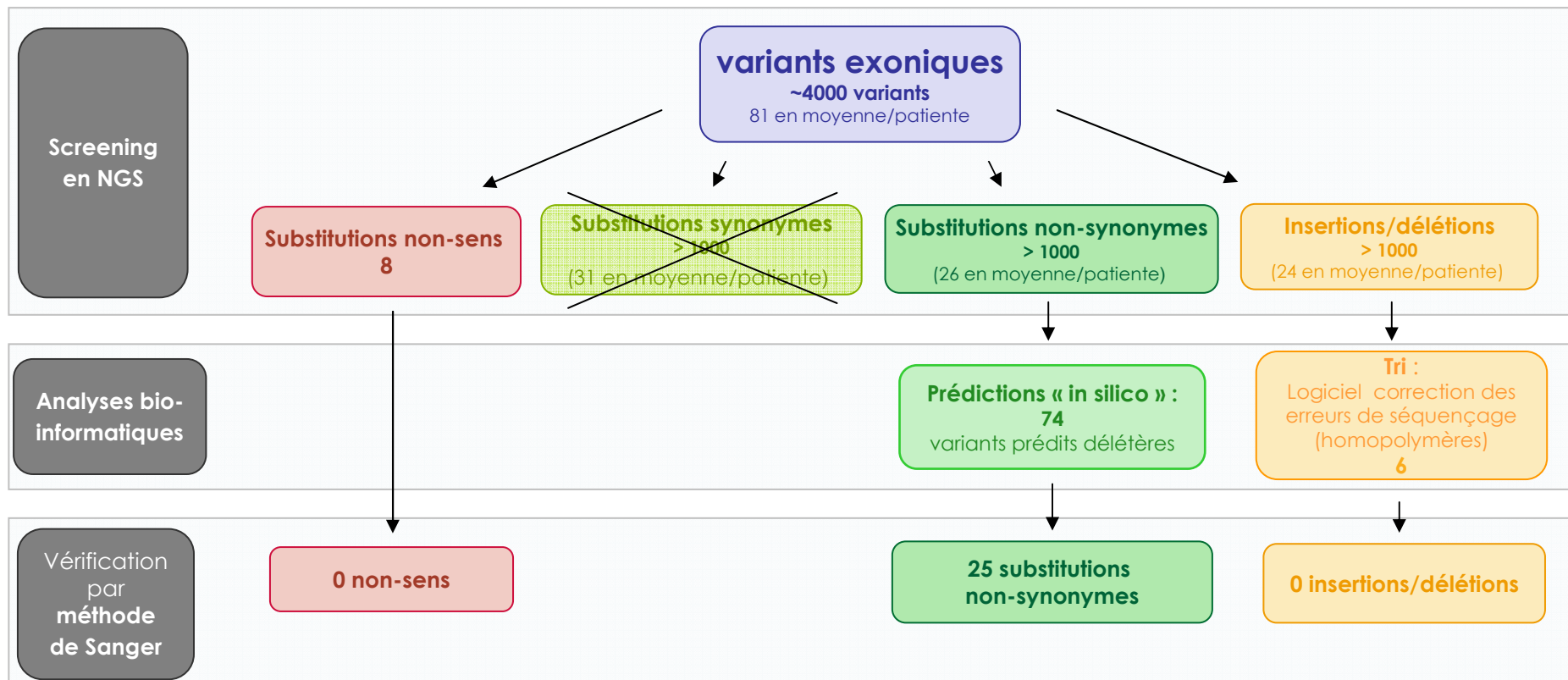
- Double capture des 38 gènes d'intérêt, chez les 50 patientes incluses
- Pyroséquençage GS-FLX (454 ROCHE)



# RÉSULTATS - AVANCÉES DES TRAVAUX

## • Répartition des variants retrouvés

-> 355 variants en moyenne par patiente



# RÉSULTATS - AVANCÉES DES TRAVAUX

- **Sélection des substitutions non-synonymes :**

- 25 retrouvées en méthode de Sanger
  - Puis sélection sur la fréquence :
    - fréquence du variant ds pop. générale < 0,1% (*Damiola et al. 2014*)
    - différence significative entre fréquence du variant dans pop. d'étude et dans pop. générale
- > 7

Gène	Dénomination du variant	Fréquence de l'allèle mineur pop. générale	Commentaires
ANKLE1	NM_152363.4:c.281T>A	T:0,4287 /7252	prédit délétère
APC	NM_000038.5:c.7862C>G	G: 0,0048 /8598	prédit délétère
APC	NM_000038.5:c.3949G>C	C : 0,004/8	répertorié pathogène
ATM	NM_000051.3:c.3161C>G	G: 0,0228 /8596	prédit délétère
ATM	NM_000051.3:c.4258C>T	T: 0,0178 /8584	prédit délétère
ATM	NM_000051.3:c.5558A>T	T: 0,0069 /8596	prédit délétère
BARD1	NM_000465.2:c.70C>T	A: 0,3474 /8230	prédit délétère
BLM	NM_000057.2:c.2603C>T	T: 0,053 /116 (1000G)	prédit délétère
BRIP1	NM_032043.2:c.517C>T	A: 0,0049 /8600	prédit délétère
CHEK2	NM_001005735.1:c.1214G>A	inconnu	prédit délétère
MLH1	NM_000249.3:c.199G>T	N/A	répertorié pathogène
MRE11A	NM_005591.3:c.901C>G	inconnu	prédit délétère
MSH6	NM_000179.2:c.431G>T	T: 0,0014 /8600	prédit délétère
MUTYH	NM_001128425.1:c.1187G>A	T: 0,005 /8600 N/A	prédit délétère
NRIP1	NM_003489.3:c.1342C>G	C: 0,1044 /8600 N/A	prédit délétère
NRIP1	NM_003489.3:c.3403C>T	A: 0,0133 /8600	prédit délétère
PALB2	NM_024675.3:c.1010T>C	G: 0,0197 /8600	prédit délétère
PALB2	NM_024675.3:c.2794G>A	T: 0,0059 /8600	prédit délétère
PALB2	NM_024675.3:c.2897T>C	inconnu	prédit délétère
PALB2	NM_024675.3:c.2993G>A	T:0,024 /8600	prédit délétère
POLB	NM_002690.1:c.725C>G	G: 0,0151 /8600	prédit délétère
RAD51B	NM_133509.3:c.515T>G	G: 0,014 /8600 N/A	prédit délétère
RAD51D	NM_001142571.1:c.853G>A	T: 0,0002 /8600 N/A	prédit délétère
STK11	NM_000455.4:c.1062C>G	G : 0,0053 /8520	répertorié pathogène
WRN	NM_000553.4:c.4099T>C	C: 0,2558 /8600	prédit délétère



# RÉSULTATS - AVANCÉES DES TRAVAUX

- **En résumé :**

- **7 variants :**

- dans 7 gènes différents
    - 7 substitutions non synonymes :
      - 5 prédites délétères « in silico » :  
3 inconnues et 2 très rares et signif + freq
      - 2 répertoriées comme pathogènes

- **Chez 7 familles :**

- 1 patiente a 2 variants
    - 2 patientes ont le même variant dans RAD51D

Gène	Dénomination du variant	ID variant	Nb de patients ayant ce variant	Commentaire
APC	NM_000038.5:c.3949G>C	rs1801166	1	répertorié pathogène
CHEK2	NM_001005735.1:c.1214G>A	inconnu	1	prédit délétère
MLH1	NM_000249.3:c.199G>T	rs63750206	1	répertorié pathogène
MRE11A	NM_005591.3:c.901C>G	inconnu	1	prédit délétère
MSH6	NM_000179.2:c.431G>T	rs3211299	1	prédit délétère
PALB2	NM_024675.3:c.2897T>C	inconnu	1	prédit délétère
RAD51D	NM_001142571.1:c.853G>A	rs140285068	2	prédit délétère

# RÉSULTATS - AVANCÉES DES TRAVAUX

- **Gènes MMR et cancer du sein :**

- **Dans notre population :**

- MSH6 : substitution prédite délétère c.431G>T (rs3211299) (*Doss CG and Sethumadhavan R; 2009*) (famille sans Kc du colon)
- MLH1 : substitution répertoriée pathogène : c.199G>T

- Contrôles : variant dans MSH6 et MLH1 non retrouvé

- Place du cancer du sein dans le spectre des porteurs de mutations gènes MMR controversée

(*Pande M. et al. 2012; Win AK. et al. 2013*)

- MSH6 : que 5% des Sd de Lynch, ms plus associés aux cancers extra-coliques (*Pande M. et al. 2012*)

- Tumeurs sein avec mutation MMR plutôt triple-négatives (sur 226 CSTN/90 non-CSTN -> 4 ds CSTN/0 (sporadique)) (*Wen YH, et al. 2012*)

Distribution of colorectal and extracolonic cancers

	Total cancers N = 504	Colonic N = 236	Extracolonic N = 268	P
MMR mutation [N (%)]				
hMLH1	186 (36.9)	97 (52.2)	89 (47.8)	0.1
hMSH2	287 (56.9)	130 (45.3)	157 (54.7)	
hMSH6	28 (5.6)	8 (28.6)	20 (71.4)	
hPMS2	3 (0.6)	1 (33.3)	2 (66.7)	

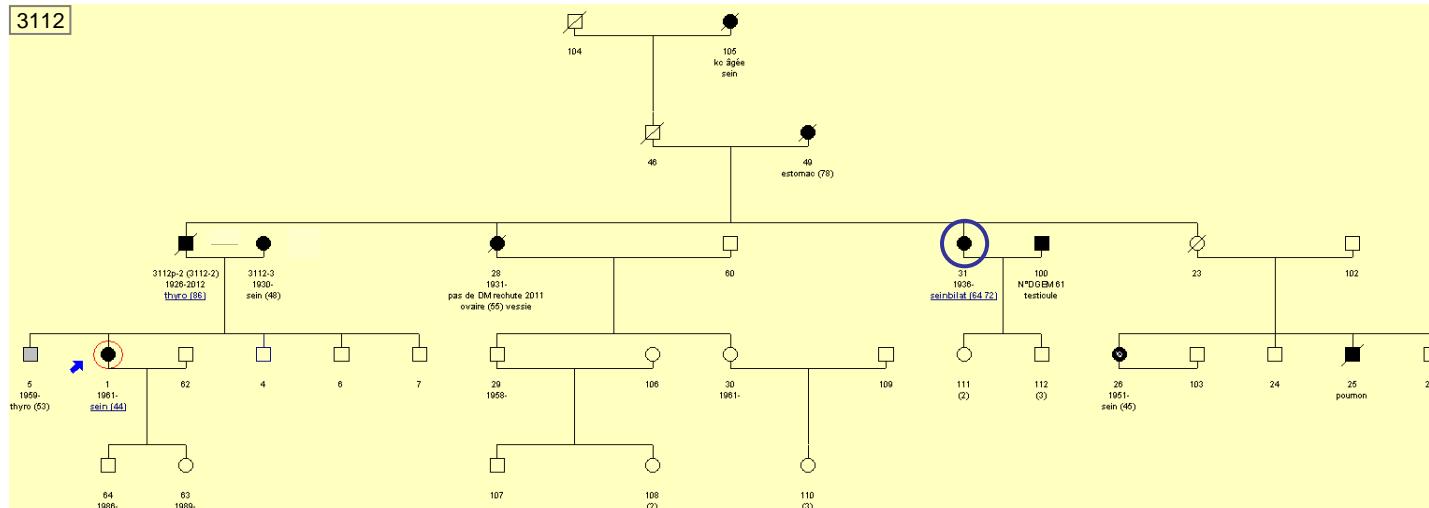
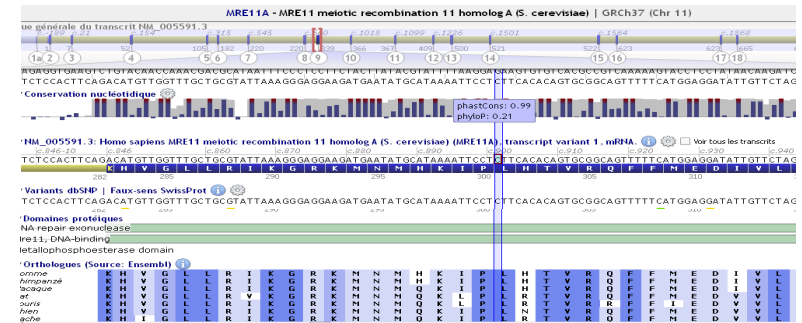
(*Pande M et al. 2012*)

# RÉSULTATS - AVANCÉES DES TRAVAUX

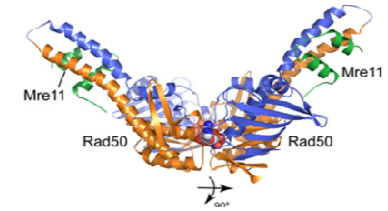
- MRE11A :**

- Dans notre population :

- MRE11A : c.901C>G (inconnu) chez 3112-31 :  
exon 9, située à la fois sur les domaines exonucléase et de liaison à l'ADN
- A rechercher chez 3 apparentés (1 sain, 2 atteints : 3112-01, -28, -30)
- Contrôles : variant non retrouvé



# RÉSULTATS - AVANCÉES DES TRAVAUX



- **MRE11 et cancer du sein :**

- MRE11A code pour nucléase, appartenant au complexe MRN (avec RAD50 et NBS1) qui se lie à l'ADN au niveau des cassures DB et initie la voie de réparation ATM/ATR (Damiola et al. 2014)

- Conséquences de mutations dans MRE11A :

- responsable de l'ATLD : Ataxia-telangectasia-like Disorder (GS Stewart et al. 1999)
- hypersensibilité aux radiations ionisantes (GS Stewart et al. 1999)
- association au risque de cancers peu décrite, mais :

- > ADK poumon chez 2 frères (Uchisaka N, 2009)

Mol Oncol. 2008 Dec;2(4):296-316. doi: 10.1016/j.molonc.2008.09.007. Epub 2008 Oct 7.

**Aberrations of the MRE11-RAD50-NBS1 DNA damage sensor complex in human breast cancer: MRE11 as a candidate familial cancer-predisposing gene.**

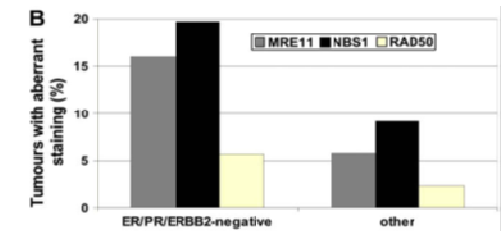
Bartkova J<sup>1</sup>, Tommiska J, Oplustilova L, Aaltonen K, Tamminen A, Heikkinen T, Mistrik M, Aittomäki K, Blomqvist C, Heikkilä P, Lukas J, Nevanlinna H, Bar

- > cancer du sein :

- 2008 : expression aberrante/réduite complexe MRN (↓ et/ou ds moins de φ) significativement plus fréq ds tumeurs triple neg (Bartkova et al. 2008)

- 2013 : tumeurs mammaires induites chez souris MRE11<sup>ATLD/ATLD</sup> -> basal-like (Gupta GP, et al. 2013)

- 2014 : MRE11A serait gène de susceptibilité (risque intermed) au cancer du sein (Damiola et al. 2014 : 8 variants /1313 cas Kc sein précoces)



# RÉSULTATS - AVANCÉES DES TRAVAUX

- **RAD51D et cancer du sein :**

- Associé aux cancers de l'ovaire, et au Sd sein-ovaire, mais très rare ou absent dans les familles avec cancer du sein seul.

(Thompson ER1, et al. 2013) -> 0/1060 BC/OC and 2/245 sporadic ovarian cancer , (Gutiérrez-Enríquez S, et al. 2014)

- **Dans notre population :**

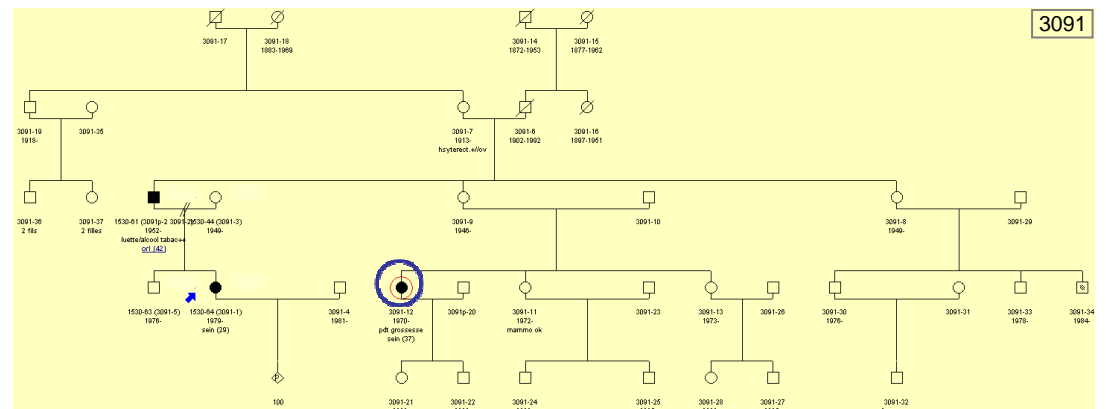
2 patientes avec le même variant (3091-12, 2899-01) :

- c.853G>A, se situe au niveau du domaine ATPase
- dans 2 familles sans cancer de l'ovaire (et peu de cancer), mais patientes très jeunes (35 et 37 ans)

- **Apparentés :**

- famille 3091 : 3091-01,-02,-08,-09,-11,-13
- famille 2899 : pas d'autre prélèvement

- **Contrôles :** variant non retrouvé



# RÉSULTATS - AVANCÉES DES TRAVAUX

- **PALB2 :**

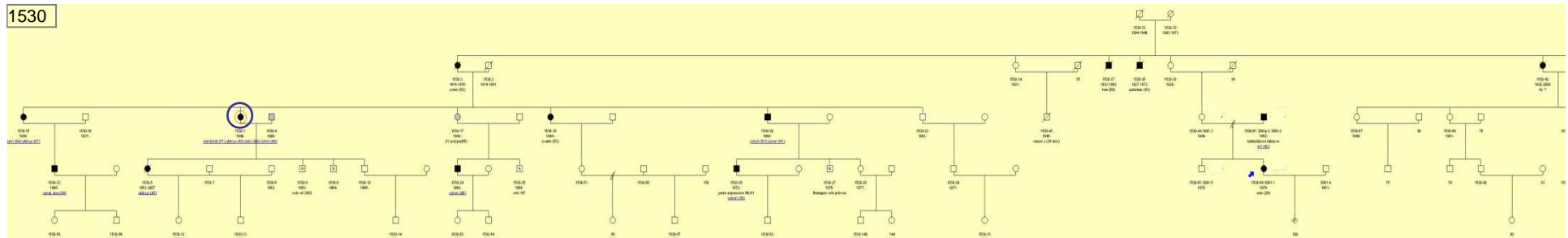
- **Dans notre population :**

- Une patiente (1530-01) : PALB2 c.2897T>C et MLH1 c.199G>T (Kc sein bilat(51), endomètre(63), colon(68))
- Famille très touchée par cancers (spectre MMR : colon, endomètre, ovaire) -> famille doublement mutée? (a rechercher chez nombreux apparentés prélevés)
- Contrôles : variant non retrouvé

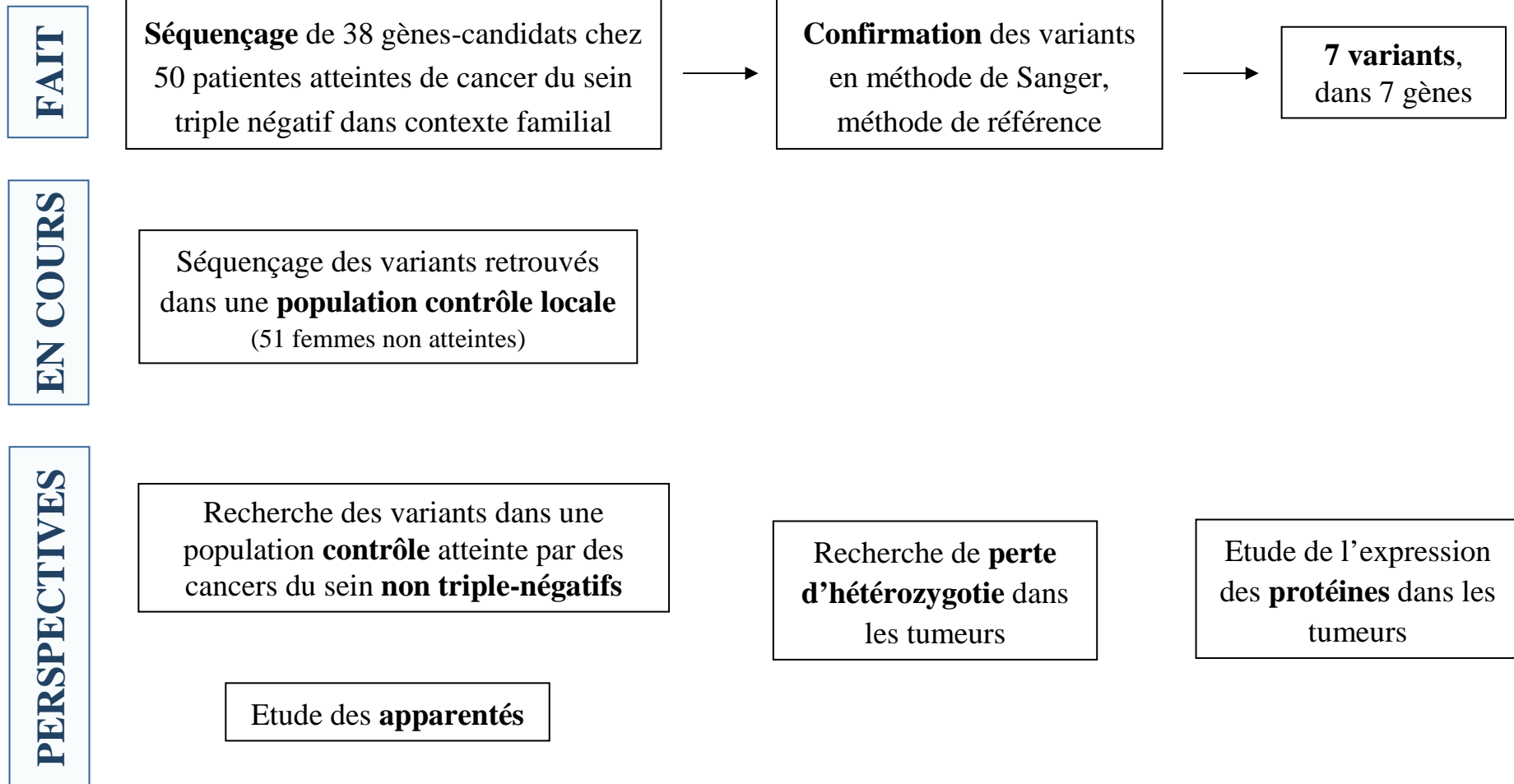
- PALB2 (partner and localizer of BRCA2) :

- code pour une protéine :  
se lie à BRCA2, forme le complexe BRCA1–PALB2–BRCA2 et permet localisation nucléaire (*Evans MK1, et al. 2014*)
- gène impliqué avec risque modéré dans cancer du sein

1530



# CONCLUSION



# BIBLIOGRAPHIE

- Breast Cancer Res. 2014 Jun 3;16(3):R58. Rare key functional domain missense substitutions in MRE11A, RAD50, and NBN contribute to breast cancer susceptibility: results from a Breast Cancer Family Registry case-control mutation-screening study. Damiola F, Pertesi M, Oliver J, et al.
- J Biomed Sci. 2009 Apr 24;16:42. Investigation on the role of nsSNPs in HNPCC genes--a bioinformatics approach. Doss CG1, Sethumadhavan R.
- Fam Cancer. 2012 Sep;11(3):441-7. Cancer spectrum in DNA mismatch repair gene mutation carriers: results from a hospital based Lynch syndrome registry. Pande M, Wei C, Chen J.
- Breast Cancer Res. 2013 Mar 19;15(2):R27. Risk of breast cancer in Lynch syndrome: a systematic review. Win AK, Lindor NM, Jenkins MA.
- Am J Surg Pathol. 2012 Nov;36(11):1700-8. DNA mismatch repair deficiency in breast carcinoma: a pilot study of triple-negative and non-triple-negative tumors. Wen YH1, Brogi E, Zeng Z, et al.
- J Pediatr 2009, 155:435-438. Two brothers with ataxia-telangiectasia-like disorder with lung adenocarcinoma. Uchisaka N, Takahashi N, Sato M, Kikuchi A, Mochizuki S, Imai K, Nonoyama S, Ohara O, Watanabe F, Mizutani S, Hanada R, Morio T.
- Mol Cell. 2013 Nov 7;52(3):353-65. The Mre11 complex suppresses oncogene-driven breast tumorigenesis and metastasis. Gupta GP1, Vanness K, Barlas A et al.
- Cell. 1999 Dec 10;99(6):577-87. The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. Stewart GS1, Maser RS, Stankovic T, et al.
- Mol Oncol. 2008 Dec;2(4):296-316. Aberrations of the MRE11-RAD50-NBS1 DNA damage sensor complex in human breast cancer: MRE11 as a candidate familial cancer-predisposing gene. Bartkova J1, Tommiska J, Oplustilova L et al.
- PLoS One. 2013;8(1):e54772. Analysis of RAD51D in ovarian cancer patients and families with a history of ovarian or breast cancer. Thompson ER1, Rowley SM, Sawyer S, et al.) -> 0/1060 BC/OC and 2/245 sporadic ovarian cancer
- Int J Cancer. 2014 May 1;134(9):2088-97. About 1% of the breast and ovarian Spanish families testing negative for BRCA1 and BRCA2 are carriers of RAD51D pathogenic variants. Gutiérrez-Enríquez S, Bonache S, de Garibay GR, et al.
- N Engl J Med. 2014 Aug 7;371(6):566-8. PALB2 mutations and breast-cancer risk. Evans MK1, Longo DL.