

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	iv
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	x
Abréviations	xi
Dédicaces	xv
Remerciements	xvi
Avant-propos	xvii
Chapitre 1. Introduction	1
<i>1.1 Le cancer</i>	<i>1</i>
1.1.1 Épidémiologie.....	1
1.1.2 Étiologie	2
<i>1.2 Cancer du sein</i>	<i>3</i>
1.2.1 Épidémiologie.....	3
1.2.2 Étiologie	5
1.2.2.1. L'origine du cancer du sein	5
1.2.2.2 Les types histologiques de cancer du sein	6
1.2.2.3 Les sous-types moléculaires de carcinomes mammaires	8
1.2.3 Facteurs de risque du cancer du sein	10
1.2.4 Traitement du cancer du sein.....	11
<i>1.3 Cancer du sein controlatéral</i>	<i>12</i>
1.3.1 Épidémiologie.....	12

1.3.2 Facteurs de risque de cancer du sein controlatéral	13
<i>1.4 Épigenétique</i>	20
1.4.1 Historique	20
1.4.2 Modifications covalentes des histones	22
1.4.3 Le positionnement des nucléosomes	23
1.4.4 L'expression de l'ARNs non-codants	23
1.4.5 La méthylation de l'ADN	24
1.4.5.1 Historique	24
1.4.5.2 Mécanisme de méthylation	25
1.4.5.3 Rôle de la méthylation dans le développement cellulaire	26
1.4.5.4 Implication de la méthylation de l'ADN dans le cancer	27
1.4.5.5 Thérapie épigénétique.....	29
1.4.6 La méthylation de l'ADN dans le cancer du sein.....	31
1.4.6.1 Méthylation des gènes spécifiques dans les tissus mammaires normaux.....	33
1.4.6.2 Méthylation globale de l'ADN.....	35
<i>1.5 Techniques pour étudier la méthylation</i>	37
1.5.1 Les techniques enzymatiques	38
1.5.1.1 Enzymes de restriction.....	38
1.5.1.2 LUMA : « LUMinometric Methylation Assay »	38
1.5.2 Les techniques non enzymatiques	39
1.5.2.1 Immunoprécipitation de l'ADN méthylé (MeDIP)	40
1.5.2.2 Polymerase chain reaction (PCR).....	40
1.5.2.3 Chromatographie liquide à haute performance sur gel dénaturant (DHPLC)	41
1.5.2.4 Clonage et séquençage.....	41
1.5.2.5 Pyroséquençage	41
1.5.2.6 Illumina Infinium HumanMethylation 450 Assay.....	41
<i>1.6 Différents types d'échantillons pour la recherche</i>	43
Chapitre 2. Problématique, hypothèse et objectifs.....	45
<i>2.1 Problématique</i>	45

2.2 Hypothèse	46
2.3 Objectifs.....	46
Chapitre 3. Mise au point de la méthode d'extraction de l'ADN.....	48
3.1 Introduction	48
3.2 Méthode	48
3.3 Résultats	49
3.3.1 Préparation des échantillons	49
3.3.2 Choix de kit	52
3.3.3 Déparaffinage des tissus	53
3.3.4 Digestion par protéinase K	54
3.4 Conclusion.....	55
Chapitre 4. Matériels et Méthodes.....	57
4.1 Sélection des groupes	57
4.1.1 Collecte d'échantillons.....	57
4.2 Sélection des tissus	58
4.2.1 Effet de champ.....	59
4.3 Extraction de l'ADN.....	60
4.4 Contrôle de qualité	61
4.5 Conversion de bisulfite	61
4.6 Restauration de l'ADN	61
4.7 Illumina Infinium 450k.....	62
4.8 Analyse bio-informatique et statistique	63
Chapitre 5 : Résultats.....	66
5.1 Méthylation de l'ADN et cancer du sein controlatéral	66
5.1.1 Caractéristiques de la population pour l'étude principale	66

5.1.2 Méthylation globale de l'ADN et le risque de cancer du sein controlatéral.....	69
5.1.3 Différence de la méthylation globale de l'ADN selon la localisation des CpGs	69
5.1.4 Identification des sites différenciellement méthylés reliés au développement du cancer du sein controlatéral	71
5.1.5 Identification des régions différenciellement méthylées reliées au développement du cancer du sein controlatéral	73
<i>5.2 Méthylation de l'ADN et cancer du sein</i>	<i>74</i>
5.2.1 Caractéristiques de la population pour l'étude secondaire	74
5.2.2 Méthylation globale de l'ADN et le risque de cancer du sein.....	75
5.2.3 Différence de la méthylation globale de l'ADN selon la localisation des CpGs	76
5.2.4 Identification des sites différenciellement méthylés reliés au développement du cancer du sein	78
5.2.5 Identification des régions différenciellement méthylées reliées au développement du cancer du sein	80
<i>5.3 Identification des gènes impliqués dans le développement d'un cancer du sein primaire et controlatéral par chevauchement des résultats entre les deux études.</i>	<i>81</i>
Chapitre 6. Discussion et conclusion.....	84
6.1 Discussion.....	84
6.2 Conclusion.....	91
6.3 Perspective.....	91
Bibliographies	92
Annexe	112
.....	128

Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Classification histologique des carcinomes mammaires selon l'Institut National du Cancer.

Tableau 1.2 : Les sous-types moléculaires de cancer du sein définis de manière immunohistochimique.

Tableau 1.3 : Les facteurs de risque de cancer du sein controlatéral dans des études cohortes.

Tableau 1.4 : Les facteurs de risque de cancer du sein controlatéral dans des études cas-témoins.

Tableau 1.5 : Les inhibiteurs de l'ADN méthyltransférases (DNMTs) en oncologie.

Tableau 1.6 : La différence de la méthylation de l'ADN et le risque de cancer du sein.

Tableau 3.1 : La mise au point pour l'extraction de l'ADN.

Tableau 5.1 : Caractéristiques des femmes de l'étude principale.

Tableau 5.2 : Caractéristiques de la tumeur et des traitements de l'étude principale.

Tableau 5.3 : La méthylation globale de l'ADN et le risque de cancer du sein controlatéral.

Tableau 5.4 : La méthylation globale de l'ADN par régions CpG et le cancer du sein controlatéral.

Tableau 5.5 : La méthylation globale de l'ADN par localisation des régions génomiques et le cancer du sein controlatéral.

Tableau 5.6 : Diverses voies de signalisation, fonctions et maladies affectées par les sites hypométhylés et les sites hyperméthylés entre les controlatéraux et les primaires.

Tableau 5.6.1 : Les gènes impliqués dans les voies de signalisation, les fonctions et les maladies affectées par les sites différenciellement méthylés entre les controlatéraux et les primaires.

Tableau 5.7 : Caractéristiques des femmes de l'étude secondaire.

Tableau 5.8 : La méthylation globale de l'ADN et le risque de cancer du sein.

Tableau 5.9 : La méthylation globale de l'ADN par régions CpG et le cancer du sein.

Tableau 5.10 : La méthylation globale de l'ADN par localisation des régions génomiques et le cancer du sein.

Tableau 5.11 : Diverses voies de signalisation, fonctions et maladies affectées par les sites hypométhylés et les sites hyperméthylés entre les primaires et les bénins.

Tableau 5.11.1 : Les gènes impliqués dans les voies de signalisation, les fonctions et les maladies affectées par les sites différenciellement méthylés entre les primaires et les bénins.

Tableau 5.12 : Chevauchement des sites différenciellement méthylés entre les gènes impliqués dans le développement d'un cancer du sein controlatéral et d'un cancer du sein primaire.

Liste des figures

- Figure 1.1** : Taux d'incidence de différents types de cancer normalisé selon l'âge.
- Figure 1.2** : Taux d'incidence du cancer du sein standardisé selon l'âge pour 100 000 femmes en 2012.
- Figure 1.3** : Représentation des structures principales du sein.
- Figure 1.4** : Coupe histologique de tissus mammaires cancéreux.
- Figure 1.5** : Mécanismes de modifications épigénétiques.
- Figure 1.6** : Représentation des voies de méthylation de la cytosine.
- Figure 1.7** : État de méthylation des cellules normales versus cellules cancéreuses.
- Figure 1.8** : Réaction de conversion de cytosine en uracile par le bisulfite.
- Figure 1.9** : Illumina Infinium HumanMethylation 450 assay.
- Figure 3.1** : Construction des matrices tissulaires (TMAs).
- Figure 3.2** : Une démonstration de la construction du TMA.
- Figure 4.1** : Diagramme schématique des régions géniques et des régions de l'île CpG.

Abréviations

- ADAM23 = ADAM metallopeptidase domain 23
- ADN = Acide désoxyribonucléique
- Alu = *Arthrobacter luteus*
- AMR = Amp Mix Restore reagent
- APC = Adenomatous polyposis coli
- ARN = Acide ribonucléique
- ATM = Ataxia telangiectasia mutated
- BRCA1 = BReast CAncer 1
- BRCA2 = BReast CAncer 2
- CARS2 = cysteinyl-tRNA synthetase 2
- CASP8 = Cysteine-aspartic acid protease 8
- CCDC108 = Cilia and flagella associated protein 65
- CCI = Carcinome canalaire infiltrant
- CCIS = Carcinome canalaire *in situ*
- CDKN2A = Cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A
- CDH1 = Cadherin 1
- CHEK2 = Checkpoint kinase 2
- CIRC = Centre international de recherche sur le cancer
- CK5 = Cytokeratin-5
- CK6 = Cytokeratin-6
- CK8 = Cytokeratin-8
- CK18 = Cytokeratin-18
- CK19 = Cytokeratin-19
- CLI = Carcinome lobulaire infiltrant
- CLIS = Carcinome lobulaire *in situ*
- CMS = Centre des maladies du sein
- CMM = Convert Master Mix reagent
- C-myc = MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor
- Cons = Consommation
- CS = Cancer du sein
- CSC = Cancer du sein controlatéral
- CST6 = Cystatin E/M
- CSU = Cancer du sein unilatéral
- CXCL12 = C-X-C motif chemokine 12
- DACT2 = Dapper Antagonist of Catenin 2
- DAPK = Death-associated protein kinase
- DiH₂O = Deionized Water
- DNMT = DNA methyl-transferase
- EAPC = Annual percentage change
- EGFR = epidermal growth factor receptor
- ELOVL6 = Fatty Acid Elongase 6
- ER = Récepteur des œstrogènes
- ER α = Estrogen receptor alpha
- ERB = Elution Restore Buffer reagent

- ERS1= Estrogen Receptor 1
- FDA = Food and Drug Administration
- FFPE = Tissus fixés au formol et enrobés en paraffine
- GABRA5 = Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit alpha 5
- GB = Globule blanc
- GSTP1= Glutathione S-Transferase Pi 1
- HDACi = inhibiteurs de la déacétylation des histones
- HER2 = Récepteur épidermique humain 2
- H&E = L'hématoxyline et l'éosine
- HIN1 = Secretoglobin family 3A member 1
- HLA-DPA1= Major Histocompatibility Complex, Class II, DP Alpha 1
- HLA-DPB2 = Major Histocompatibility Complex, Class II, DP Beta 2
- HOOK2 = Hook Microtubule Tethering Protein 2
- HpaII = Enzyme de restriction sensible à la méthylation-méthyltransférase
- HPLC = High performance liquid chromatography
- HR = Hazard ratio
- H-ras = HRas Proto-Oncogene, GTPase
- HTS = Hormonothérapie substitutive
- HYAL2 = Hyaluronoglucosaminidase 2
- IGF2 = Insulin Like Growth Factor 2
- IL-10 = Interleukin-10
- IMC = Indice de masse corporelle
- JAG1 = Jagged1
- JRK = Jrk Helix-Turn-Helix Protein
- LCLAT1 = Lysocardiolipin Acyltransferase 1
- LHX2 = LIM Homeobox 2
- LINE1 = Long interspersed nuclear elements
- LUMA = LUminometric Methylation Assay
- MGMT = O-6-Methylguanine ADN-méthyltransférase
- MGRN1 = Mahogunin Ring Finger 1
- MLH1 = MutL homolog 1
- MSPI = Milk soy protein intolerance
- MTHFR = Methylene tetrahydrofolate reductase
- MTRR = 5-Methyltetrahydrofolate-Homocysteine Methyltransferase Reductase
- NFR = Nucleosome-Free-Region
- NHSL2 = NHS like 2
- Notch1 = Notch homolog 1, translocation-associated
- NS = Non significative
- ORP4/OSBP2 = Oxysterol Binding Protein 2
- OMS = Organisation mondiale de la Santé
- PCR = Polymerase chain reaction
- P16INK4 = Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor
- PCS = Premier cancer du sein
- PITX2 = Paired Like Homeodomain 2
- PPR = Primer Pre Restore reagent
- PR = Récepteur de la progestérone
- PRMTS = Proteines arginine methyltransferases

- PTEN = Phosphatase and tensin homolog
- QCT = Quality Control Template
- RAPSN = Receptor Associated Protein Of The Synapse
- RAPTOR = Regulatory-associated protein of mTOR
- RARB2 = Retinoic acid receptor B2
- RASSF1A = Ras association domain family 1 isoform A
- Rb = Retinoblastoma
- RC = Rapport de cotes
- RGAG4 = Retrotransposon Gag Domain Containing 4
- RH = Récepteur hormonal
- RT= Radiotherapy
- RUNX3 = Runt Related Transcription Factor 3
- SAH = S-adenosyl-homocysteine
- SAM = S-adenosyl-methionine
- SD = Stade ganglionnaire
- Sem = Semaine
- SEPT9-2V = Septin-9
- SFN= Stratifin
- SHR = Subdistribution hazard ratio
- SIR = Standardized incidence ratios
- SLC19A1 = Solute carrier family 19
- SLFN12 = Schlafen Family Member 12
- SNP = polymorphisme d'un seul nucléotide
- Sat2 = Satellite DNA sequence 2
- STK11 = Serine/Threonine Kinase 11
- SYK = Spleen Associated Tyrosine Kinase
- TDLU = Unité terminale ducto-lobulaire
- TFAM = facteur de transcription mitochondrial humain A
- TIMP3 = TIMP Metallopeptidase Inhibitor 3
- TMA = Tissue microarrays
- TWIST1 = Twist-related protein 1
- UV = Ultra-violet
- VHL = Von Hippel–Lindau
- 5-aza-CdR = 5-aza-2'-desoxycytidine
- 5-aza-CR = 5 azacytidine
- 5-mdc = 5-methyl-deoxy-cytidine

« Les murs de briques qui se trouvent sur votre chemin sont là pour une seule raison, vous pousser à vous dépasser pour obtenir ce que vous voulez vraiment »

Randy Paush

Dédicaces

À mes parents

La distance ne nous a jamais séparés, je vous remercie pour votre encouragement, votre présence et votre support. Vous avez toujours cru en moi, je n'ai pas lâché et je ne lâcherai jamais. C'est grâce à vous que je suis arrivée ici.

Dans une prochaine vie, papa-maman, j'aimerais vous reprendre comme parents.

À mes sœurs

Qui a dit d'avoir des frères est important,
Vous étiez mon support quand j'avais besoin, ma force dans la chute et ma joie en tout temps.
Je remercie Dieu de ne pas vous avoir juste comme 2 sœurs, mais aussi comme deux frères et deux amies.

À ma grande famille

Pour vos soutiens qui m'ont permis d'avancer dans mon chemin.

Que Dieu vous protège !!

Remerciements

À ma directrice de projet Caroline Diorio et ma codirectrice Francine Durocher.

Merci de m'avoir aidée à l'élaboration de ce projet.

Merci de votre conseil et votre soutien.

Je m'adresse aussi avec un grand merci à tous les collègues, à tous ceux qui m'ont aidée de près ou de loin à élaborer ce travail.

De tout mon cœur, je vous remercie.



Avant-propos

Ce mémoire comporte le fruit de mes travaux au cours des deux dernières années sur la méthylation de l'ADN et le risque de développer un cancer du sein controlatéral. Le cancer du sein est très répandu chez les femmes et le taux de survie accru augmente le risque de développer un second cancer du sein. En effet, le risque de développer un cancer du sein controlatéral est 3 à 5 fois plus élevé que celui de développer un premier cancer du sein. Plusieurs facteurs de risque tels que l'âge et le type histologique de la tumeur affectent le risque de développer un cancer du sein controlatéral, cependant des modifications épigénétiques possiblement réversibles telles que la méthylation de l'ADN pourraient jouer un rôle important dans la survenue du cancer du sein controlatéral. L'identification de facteurs modifiables spécifiques est nécessaire pour établir des moyens efficaces de prévention d'un second cancer du sein. Cependant, il n'y a pas de protocole bien identifié pour l'extraction de l'ADN des tissus mammaires normaux fixés. Donc, l'identification d'un protocole d'extraction était une des étapes essentielles pour procéder à l'analyse de la méthylation.

L'introduction de ce mémoire constitue une revue de la littérature qui comporte toutes les notions nécessaires pour comprendre le projet de recherche telles que l'épidémiologie et l'étiologie du cancer du sein, l'épigénétique ainsi que les techniques pour étudier la méthylation. La problématique de recherche ainsi que les objectifs sont présentés au chapitre 2. Le chapitre suivant présente la mise au point du protocole d'extraction (chapitre 3) suivi d'un chapitre sur les matériels et méthodes (chapitre 4). Les résultats obtenus pour ce projet de recherche sont présentés au chapitre 5, et une discussion, une conclusion et des perspectives (chapitre 6) complètent ce mémoire.

Contribution

Ce projet de recherche a été réalisé dans le laboratoire de Dre Caroline Diorio à l'Hôpital du Saint Sacrement. J'ai effectué tout le travail de mise au point de la technique d'extraction de l'ADN, et une grande partie du travail d'identification des carottes, de la fabrication des Tissue microarrays (TMAs), et de la préparation des échantillons pour

l'analyse. Le traitement au bisulfite ainsi que l'analyse de la méthylation ont été réalisés au Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill. J'ai également réalisé l'interprétation des résultats bio-informatiques et la rédaction du mémoire sous la supervision du Dre Caroline Diorio et du Dre Francine Durocher. Le protocole de ce projet de recherche a été présenté sous forme d'une affiche dans les journées de la recherche en Santé de l'Université Laval le 25 mai 2016 et au Atlantic-Québec Workshop for *Next-Gen Cancer Researchers* (TFRI workshop) à Montréal le 27 mai 2016.

Chapitre 1. Introduction

1.1 Le cancer

1.1.1 Épidémiologie

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), le cancer est une des principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde. Quatorze millions de nouveaux cas ont été diagnostiqués en 2012 et, de ce nombre, huit millions de personnes sont décédées (1). Mondialement, les cancers les plus fréquents pour l'ensemble des femmes et des hommes sont : le cancer du poumon (13,0 % du nombre total de cancers), du sein (11,9 %), du côlon-rectum (9,7 %) et de la prostate (7,8 %). Selon le sexe, les cinq types de cancers les plus courants chez les hommes sont : le cancer du poumon, de la prostate, du côlon-rectum, de l'estomac et du foie, tandis que chez les femmes, il s'agit : du cancer du poumon, du sein, du côlon-rectum, du col de l'utérus et de l'estomac (2) (**Figure 1.1**). L'incidence du cancer est en augmentation dans la majorité des régions du monde, mais il existe une inégalité importante entre les pays riches et pauvres. Selon le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC), les taux d'incidence demeurent très élevés dans les régions les plus développées. Cependant, la mortalité est beaucoup plus grande dans les pays pauvres étant donné le retard dans la détection de la maladie et l'impossibilité d'accéder aux traitements de pointe (3).

Selon la Société canadienne du cancer en 2015, 196 900 nouveaux cas de cancers ont été diagnostiqués et ont causé 78 000 décès, ce qui représente environ 30 % de tous les décès (la principale cause de décès au Canada). Selon les estimations, après avoir reçu leur diagnostic, 63 % des Canadiens atteints d'un cancer vivent 5 ans ou plus, mais les taux de survie varient en fonction du type de cancers (4).

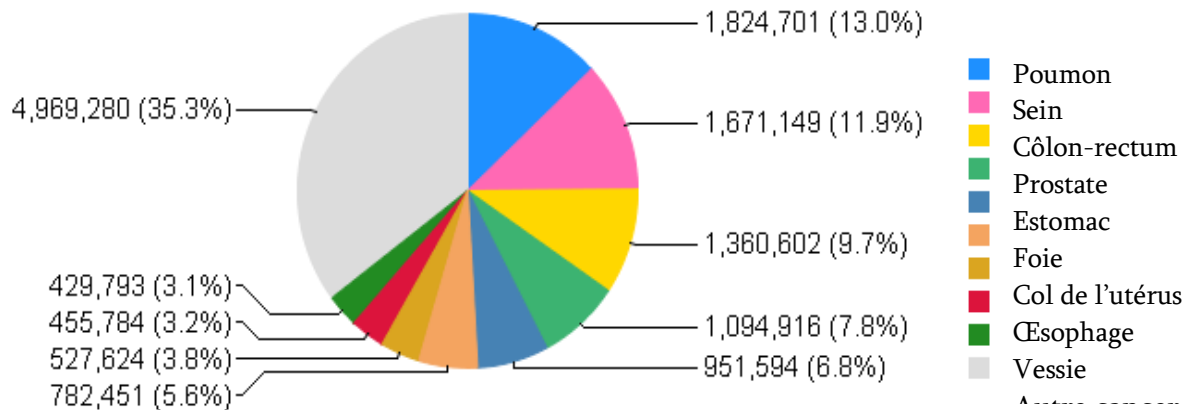


Figure 1.1 : Taux d'incidence de différents types de cancer normalisé selon l'âge. Les types de cancers les plus fréquents dans le monde, en 2012, sont le cancer : du poumon (13,0 %), du sein (11,9 %), du côlon-rectum (9,7 %) et de la prostate (7,8 %). Tirée et traduite de http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx.

1.1.2 Étiologie

Pour mieux comprendre le développement du cancer, il faut regarder l'étiologie humaine ainsi que les différentes caractéristiques acquises par les cellules normales pour se transformer en cellules cancéreuses. Notre corps humain est constitué d'un grand nombre de différents types de cellules. Ces cellules peuvent se diviser et se développer pour se substituer à d'autres qui ont été perdues lors d'une usure normale ou d'une lésion suivant un cycle de vie.

Le maintien de la normalité du génome est dû à l'équilibre entre les cellules qui se reproduisent et les cellules qui meurent dans un tissu sain, ce qui s'observe dans les différentes étapes du cycle cellulaire telles que la croissance, le fonctionnement, la reproduction ainsi que la mort cellulaire. Lorsque l'équilibre entre la division et la mort cellulaire est rompu, un cancer peut survenir. Le tissu va se développer pour former une tumeur constituée des cellules qui acquièrent de nouvelles capacités comme le potentiel de se répliquer d'une façon illimitée, l'insensibilité aux signaux anti-croissance, l'échappement à l'apoptose ainsi que la capacité d'envahir les tissus voisins. Elles vont également proliférer d'une façon incontrôlée en accumulant des modifications (mutations, anomalies ou altérations) dans le génome. La prolifération incontrôlée des cellules peut

aboutir à la formation de tumeurs qui peuvent être bénignes (non cancéreuses), en formant des cellules qui restent localisées dans la même partie du corps, ou malignes (cancéreuses) lorsque les cellules ont une capacité d'envahir les tissus voisins (5). Parfois, ces cellules se propagent dans d'autres parties du corps et c'est ce qui est appelé une métastase. Le développement et la progression tumorale ainsi que la métastase peuvent être expliqués par l'ignorance des signaux envoyés par les cellules normales étant donné que les cellules cancéreuses perdent leur polarité ainsi que la caractéristique d'adhésion entre elles selon le processus de la transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT) qui nécessite une répression d'E-cadhérine.

Selon l'emplacement et les types cellulaires où le cancer a pris naissance, il existe différents types histologiques du cancer comme le carcinome (tissu épithélial), la leucémie (tissus sanguins), les lymphomes (cellules du système immunitaire), le myélome (cellules de la moelle osseuse), le sarcome (os), et le mésothéliome (tissus du système nerveux) (6). Selon la Société de recherche sur le cancer, le type de cancer le plus fréquent est le carcinome, qui représente près de 90 % de tous les cancers. Un carcinome est qualifié comme un cancer solide qui se caractérise par la formation des cellules cancéreuses plus ou moins soudées entre elles contrairement aux cellules leucémiques qui se propagent et se déplacent librement dans le sang. Le carcinome prend naissance dans la peau ou l'épithélium qui est le tissu qui revêt les organes internes comme le poumon, le foie ainsi que le sein.

1.2 Cancer du sein

1.2.1 Épidémiologie

Le cancer du sein est le plus fréquent chez les femmes et représente 16 % de l'ensemble des cancers féminins selon l'OMS (7). Ce cancer touche aujourd'hui une femme sur neuf (8), et est donc une maladie très fréquente dans le monde occidental (9). On estime que 5 à 10 % des cas de cancer diagnostiqués dans le monde ont des origines génétiques héréditaires ce qu'on appelle un cancer du sein familial tandis que les cas de cancer restant sont identifiés comme cancers sporadiques ou non familiaux (10). Selon la Société canadienne du cancer, en 2016, 25 700 femmes et 230 hommes canadiens auront un diagnostic de cancer du sein et 4 900 femmes et 55 hommes mourront de la maladie (11).

Le cancer du sein est très souvent considéré comme une maladie des pays industrialisés due à l'évolution du mode de vie et donc l'augmentation des facteurs de risque alimentaires et hormonaux. En effet, l'incidence du cancer du sein est faible (inférieure à 20/100 000) dans la plupart des pays d'Afrique subsaharienne, en Chine et dans d'autres pays d'Asie de l'Est, à l'exception du Japon. Cependant, il faut noter que les taux les plus élevés de cancer du sein (80-90/100 000) sont enregistrés en Amérique du Nord, Amérique du Sud, surtout le Brésil et l'Argentine, en Europe du Nord et de l'Ouest et en Australie selon les statistiques de l'OMS (**Figure 1.2**). Une majorité (69 %) de l'ensemble des décès du cancer du sein se répertorie dans les pays en voie de développement (7). Le plus souvent, le cancer du sein survient chez les patientes âgées de plus de 50 ans et son incidence augmente de 1 % par an. Parmi les femmes diagnostiquées, 40 % décèdent de cette maladie. Le taux de survie à 5 ans après le diagnostic varie selon l'âge et le type histologique du cancer et le pays. Par exemple, le taux de survie le plus élevé (80 %) est remarqué dans les pays industrialisés tels qu'Amérique du Nord, la Suède et le Japon tandis qu'il diminue à 60 % dans les pays en voie de développement pour arriver à 40 % dans les pays pauvres (3). Cette différence de taux de survie dépend des choix politiques de chaque pays qui déterminent la tranche d'âge admissible à la mammographie, qui représente une radiographie à faible dose pour les seins afin de détecter la présence de tumeurs, et le délai de répétition de l'examen. Selon le CIRC, le dépistage par mammographies chez les femmes âgées de 50 à 69 ans a permis de réduire de 25 % la mortalité selon des essais randomisés et a permis également de réduire de 35 % la mortalité chez les femmes ayant accepté de participer aux programmes de dépistage (12). L'étiologie du cancer du sein de même que les principaux types histologiques peuvent à leurs tours varier le risque de développer un cancer du sein controlatéral.

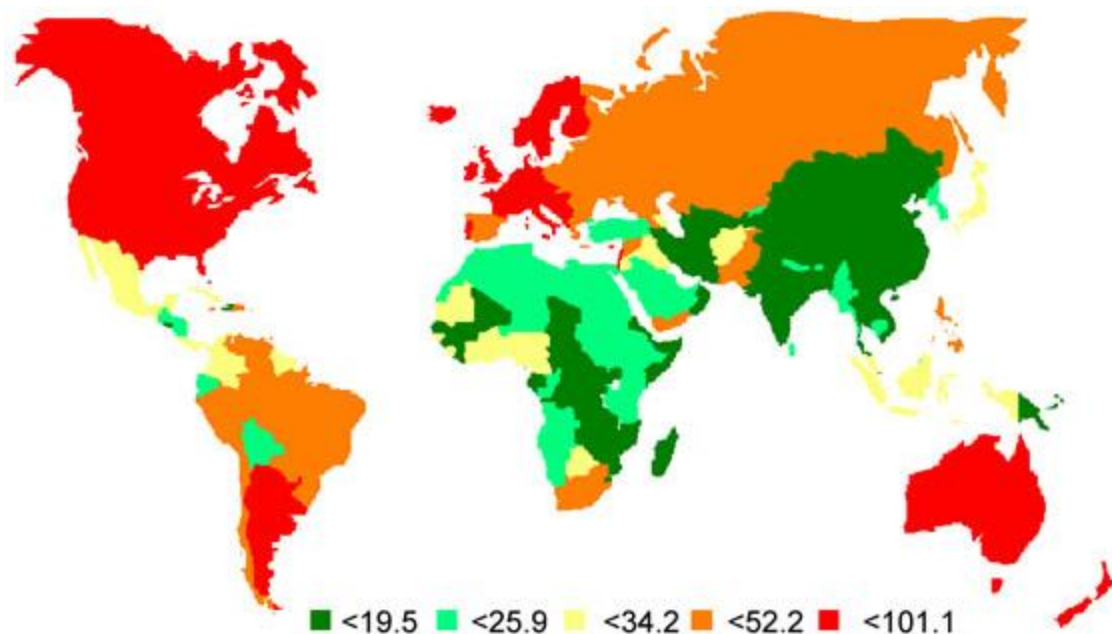


Figure 1.2 : Taux d'incidence du cancer du sein standardisé selon l'âge pour 100 000 femmes en 2012. Tirée de <http://www.news-medical.net/health/Breast-Cancer-Epidemiology.aspx>. Source originale: GLOBOCAN 02, IARC and Inas Elattar, Professor of Biostatistics and Epidemiology, National Cancer Institute, Cairo University.

1.2.2 Étiologie

1.2.2.1. L'origine du cancer du sein

Plusieurs hypothèses ont été proposées sur l'origine des cellules qui donnent naissance à la tumeur dans le sein. Certaines suggèrent que, quel que soit le type de cancer du sein, la tumeur demeure dans l'unité fonctionnelle et histopathologie de base du sein, c'est-à-dire l'unité terminale ducto-lobulaire (TDLU) (13-15), mais cette hypothèse n'est pas confirmée (**Figure 1.3**). D'autres études supposent que le type de cancer du sein le plus fréquent et qui représente 95 % des cancers du sein est l'adénocarcinome, c'est-à-dire le cancer qui se développe à partir des cellules épithéliales (carcinome) dans les glandes mammaires (adéno), et qui se caractérise par des liaisons serrées entre elles et munies de jonctions spéciales qui permettent l'échange entre les cellules dont le rôle principal est

d'assurer l'étanchéité des épithéliums (16). Il existe d'autres types rares de cancers du sein tels que la tumeur phyllode, le sarcome et le lymphome.

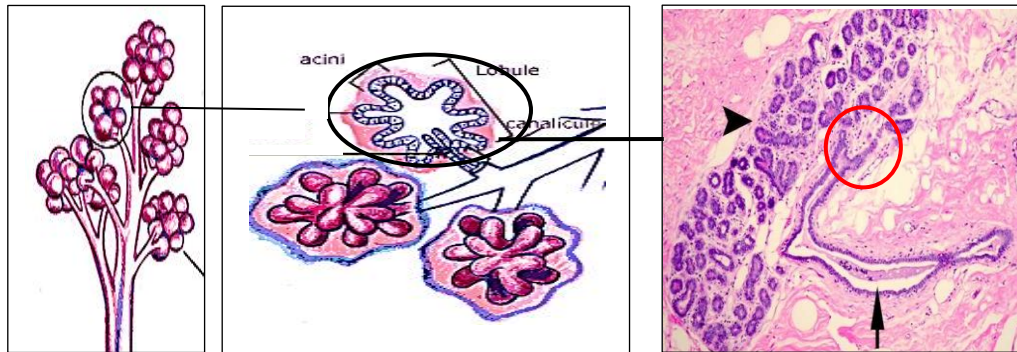


Figure 1.3 : Représentation des structures principales du sein. Le lobe est formé des lobules et des canaux qui sont reliés par l'unité terminale ducto-lobulaire (TDLU). Tirées de : <http://centre-des-coteaux.be/our-causes/comprendre-le-cancer-du-sein/>, <http://www.pathpedia.com/education/eatlas/histology/breast/Images.aspx>.

1.2.2.2 Les types histologiques de cancer du sein

Selon l'OMS (17), le cancer du sein est divisé en plusieurs types selon sa topographie, dont les deux types les plus répandus sont : le carcinome canalaire qui est originaire des cellules formant les parois des canaux galactophores tandis que le carcinome lobulaire est celui apparaissant lorsque des cellules anormales se développent à partir des glandes qui sécrètent le lait (lobules) (Figure 1.4). Si le carcinome se trouve uniquement à l'intérieur des canaux ou des lobules, sans envahissement des tissus voisins, on parle alors de carcinome *in situ*, tandis que s'il se propage dans les tissus voisins, on parle d'un cancer infiltrant ou invasif pour les deux topographies. Selon l'Institut national du cancer (Tableau 1.1), le cancer canalaire est le cancer le plus répandu, représentant de 85 à 90 % de cancers *in situ* et 76 % associé à des tumeurs invasives, tandis que le cancer lobulaire représente 10 à 15 % de cancers *in situ* et 5 à 15 % de cancers invasifs. Il existe également d'autres types de cancers invasifs rares qui représentent 1 à 5 %.

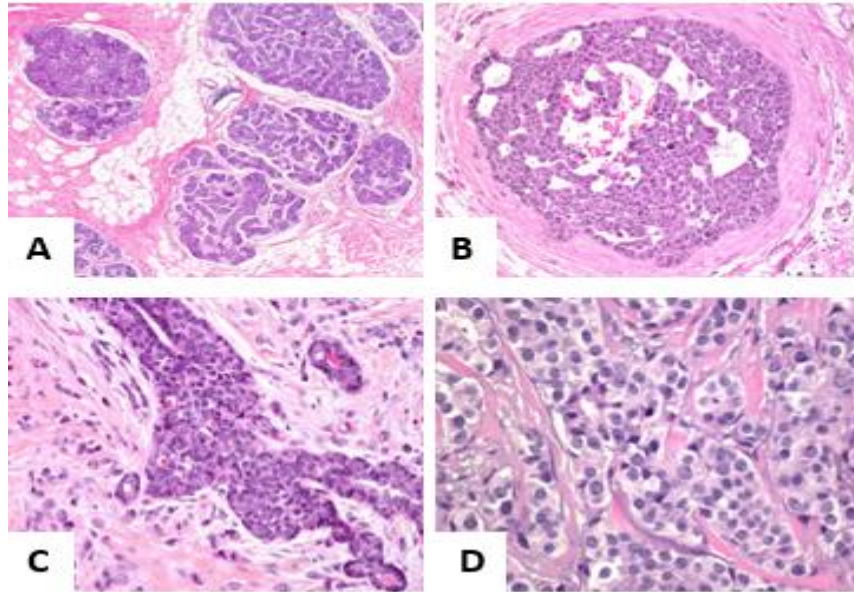


Figure 1.4 : Coupe histologique de tissus mammaires cancéreux. A) Carcinome lobulaire *in situ*, B) Carcinome canalaire *in situ*, C) Carcinome lobulaire infiltrant, D) Carcinome canalaire infiltrant. Hématoxyline et éosine (H&E). Tirée de : <http://webpathology.com/category.asp?category=52>.

Tableau 1.1 : Classification histologique des carcinomes mammaires selon l’Institut national du cancer. Les pourcentages des types histologiques les plus répandus sont présentés dans le tableau. Tiré de : <http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Les-maladies-du-sein/Cancers-du-sein>.

Tumeurs épithéliales <i>in situ</i>		Tumeurs épithéliales infiltrantes	
Types	%	Types	%
Carcinome canalaire <i>in situ</i> (CCIS)	85 à 90 %	Carcinome canalaire infiltrant (CCI)	76 %
Carcinome lobulaire <i>in situ</i> (CLIS)	10 à 15 %	Carcinome lobulaire infiltrant (CLI)	5 à 15 %
		Carcinome mucineux (colloïde)	2 %
		Carcinome médullaire	1 à 5 %
		Carcinome papillaire	1 à 2 %
		Carcinome tubuleux	1 à 2 %

1.2.2.3 Les sous-types moléculaires de carcinomes mammaires

Le carcinome mammaire infiltrant peut se diviser en quatre sous-groupes selon le profil d’expression génique (18). Ces quatre sous-types par immunohistochimie sont: récepteur épidermique humain 2 (HER2), luminal A, luminal B et basal (**Tableau 1.2**) (19).

HER2

Le type HER2 est caractérisé par une surexpression de HER2, dit positif (+) sans expression des récepteurs hormonaux (récepteur d’œstrogène ER et récepteur de la progestérone PR). Leur phénotype est HER2 (+), ER (-), PR (-), Cytokeratin (CK) 8/18/19 (+).

Luminal A et B

Les tumeurs de type luminal sont des tumeurs avec des récepteurs ER ou PR (+) et dont l'expression génique est proche de celle des cellules épithéliales lumineuses. Ces tumeurs sont de faibles grades. Elles sont divisées en deux groupes : luminal A qui se caractérise par une expression des récepteurs ER (+) et/ou (PR) (+) et l'absence de surexpression de gènes des récepteurs HER2, tandis que luminal B présente les mêmes caractéristiques hormonales que luminal A (ER+ et/ou PR+), mais il y a une surexpression du gène HER2 (+) (20).

Basal

Le cancer de type basal présente des caractéristiques génétiques similaires aux cellules myoépithéliales (trouvées dans la lame basale). Ces tumeurs représentent un phénotype particulier qui se caractérise par un « triple négatif » (HER2-, ER-, PR-) ainsi que l'expression d'au moins un marqueur de cellules basales (CK5/6, epidermal growth factor receptor (EGFR), vimentin, actine musculaire lisse, c-kit) (21).

Tableau 1.2 : Les sous-types moléculaires de cancer du sein définis de manière immunohistochimique. Traduit de (22).

Sous-type moléculaire	Marqueurs immunohistochimiques principaux		
	ER	PR	HER2
Luminal A	(+)	(+)	(-)
	(+)	(-)	(-)
	(-)	(+)	(-)
Luminal B	(+)	(+)	(+)
	(+)	(-)	(+)
	(-)	(+)	(+)
HER2	(-)	(-)	(+)
Basal	(-)	(-)	(-)

ER : récepteur d'œstrogène, PR : récepteur de la progestérone,

HER2 : Récepteur épidermique humain 2

Nous remarquons que les récepteurs hormonaux sont bien impliqués dans la division des sous-types de cancer du sein et certaines études suggèrent que les hormones telles que l'œstrogène et la progestérone auxquelles les femmes sont exposées (exogènes et endogènes) augmentent le risque de développer un cancer du sein (23). Il arrive parfois que le cancer du sein se développe chez des femmes qui ne présentent aucun facteur de risque, ou chez d'autres qui présentent plusieurs facteurs de risque.

1.2.3 Facteurs de risque du cancer du sein

Les causes d'un cancer du sein sont difficiles à déterminer. Cependant, des études scientifiques ont montré une association entre certaines caractéristiques propres à la personne ou à son environnement et le risque de développer un cancer du sein. Voici les facteurs de risque les plus importants qui jouent un rôle essentiel en augmentant le risque de développer un cancer du sein chez les femmes : l'âge, les antécédents de cancer, la taille, l'obésité, les mutations dans certains gènes, les hormones féminines et le mode de vie.

L'âge est le principal facteur ayant de l'influence sur la maladie, dans la mesure où on observe que deux cancers sur trois se déclarent après la ménopause (24). Le risque commence à augmenter après 40 ans. L'âge moyen des femmes au moment du diagnostic du cancer du sein est de 61 ans (25). **Les antécédents de cancer** (personnel et familiaux) jouent un rôle dans le développement et l'augmentation du risque de cancer du sein. Par exemple, avoir une mère et/ou une sœur atteintes d'un cancer du sein augmente le risque, particulièrement si elles ont été diagnostiquées à un âge précoce (26). Certaines **mutations**, en particulier celles des gènes *BReast Cancer 1 (BRCA1)*, *BReast Cancer 2 (BRCA2)* (gène de réparation, jouent un rôle dans la stabilité du génome) (27) et *P53* (gène suppresseur de tumeur), rendront les femmes 10 fois plus à risque de développer un cancer du sein (28). **La taille** peut modifier aussi le risque de développer un cancer du sein. Une grande taille à l'âge adulte augmente le risque de développer un cancer du sein après la ménopause. Les facteurs responsables de cette augmentation du risque sont liés à l'apport énergétique et alimentaire tôt dans la vie de la femme qui affecte la taille à l'âge adulte. En général, **l'obésité** qui se révèle par la présence d'un taux élevé de tissu adipeux, peut accroître le niveau d'hormone dans le sang et aussi augmente le risque de développer un cancer (29). Le risque de cancer du sein chez les femmes postménopausées

augmente avec l'obésité (30). Ainsi, **les hormones féminines** peuvent affecter le risque de cancer du sein, puisqu'une exposition prolongée à des œstrogènes endogènes (puberté précoce, première grossesse tardive, ménopause tardive) et à des hormones exogènes (hormonothérapie substitutive (HTS)) peut représenter un risque élevé de cancer du sein (31, 32). La période écoulée entre la puberté et le premier accouchement est une période critique de prédisposition au cancer du sein étant donné que la glande mammaire n'est pas complètement différenciée avant la première grossesse, ce qui la rend plus sensible aux carcinogènes (33). **Le mode de vie** peut aussi influencer le risque de cancer du sein, une consommation élevée d'alcool est susceptible d'élever le niveau de certaines hormones à l'intérieur du corps, et lorsque les niveaux de ces hormones sont élevés surtout après la ménopause, les cellules du sein risquent de devenir cancéreuses.

Pour finir, il faut noter que le cancer du sein est une maladie courante, qui touche une femme sur neuf dans les pays développés (8), tandis que son taux de survie varie entre 40 % et 80 % selon le pays (3), alors beaucoup de femmes vaincront ce combat. Cependant, ces femmes ont un risque plus élevé de développer une récurrence ou bien un nouveau cancer primaire dans l'autre sein. En effet, 2 % à 11 % des femmes survivantes du premier cancer développent un deuxième cancer (34). Le deuxième cancer développé par les femmes dans l'autre sein que celui du premier cancer est appelé cancer du sein controlatéral (CSC). Le cancer controlatéral n'est pas complètement élucidé. D'où l'importance d'étudier ce cancer afin de trouver une stratégie de prévention primaire étant donné l'implication des différents facteurs ou caractéristiques du premier cancer dans le développement de ce dernier.

1.2.4 Traitement du cancer du sein

Divers traitements sont proposés pour traiter le cancer du sein, et cela est divisé en cinq catégories selon la société canadienne du cancer (35, 36). La chirurgie (mastectomie) est souvent le premier traitement entrepris. La mastectomie peut être partielle (segmentaire) ou totale tout dépendant de la taille de la tumeur, son type et son emplacement dans le sein. La radiothérapie suit souvent la mastectomie partielle pour détruire les cellules cancéreuses qui pourraient être demeurées dans le sein et cela réduit le risque qu'une tumeur réapparaisse. Pourtant, ce traitement n'est pas nécessaire suite à une mastectomie

totale. De plus, la chimiothérapie est habituellement aussi administrée après la chirurgie. Elle permet de détruire les cellules cancéreuses qui se seraient échappées de la tumeur principale. Un autre type de traitement qui est jumelé est la thérapie hormonale. Si l'examen de la tumeur montre que le cancer a des récepteurs hormonaux, donc son développement est stimulé par les hormones sexuelles (les oestrogènes et la progestérone). Certains médicaments peuvent ralentir ou arrêter la progression d'un tel cancer en bloquant l'action des hormones. De même, si le cancer du sein était identifié comme un cancer HER2 positif, un traitement ciblant le récepteur est ajouté aux traitements habituels du cancer du sein.

1.3 Cancer du sein controlatéral

1.3.1 Épidémiologie

Après avoir survécu au cancer du sein, les femmes peuvent développer un second cancer dans le sein controlatéral (l'autre sein), et ce CSC peut présenter les mêmes caractéristiques du premier cancer (considéré comme une métastase ou récurrence) ou bien avec des caractéristiques différentes (considérées comme un seconde primaire), c'est-à-dire un second cancer primaire controlatéral.

De 2 à 11 % des femmes diagnostiquées avec un cancer du sein développeront un cancer du sein controlatéral au cours de leur vie (34). Les femmes ayant un premier cancer ont 3 à 5 fois plus de risque de développer un CSC par rapport au risque dans la population générale des femmes développant un premier cancer (37, 38). Le risque de développer un CSC après traitement est de 10 % à 10 ans (1 % par année de suivi, comme les récurrences locales) (39). Suite aux traitements comme l'hormonothérapie, le risque de développer un CSC diminue. Le suivi du CSC est devenu un important problème de santé publique en raison de l'incidence accrue du premier cancer du sein et l'étude de ce dernier est nécessaire pour une amélioration de la survie. Cependant, à part l'hormonothérapie adjuvante, il n'y a aucune autre intervention prouvée pouvant réduire le risque de CSC qui est offerte aux survivantes de cancer du sein.

Ainsi, nous cherchons à définir et identifier les différents facteurs de risque de CSC qui auront peut-être une grande pertinence clinique et personnelle pour les survivantes d'un cancer du sein.

Divers facteurs peuvent jouer un rôle important sur la survenue d'un second cancer. Pour le développement d'un CSC, plusieurs facteurs héréditaires ainsi que des caractéristiques du premier cancer augmentent ce risque, tel que décrit dans les paragraphes qui suivent.

1.3.2 Facteurs de risque de cancer du sein controlatéral

Un CSC est un second cancer qui dépend de nombreux facteurs jouant un rôle dans son développement. Plusieurs études se sont intéressées aux facteurs associés au risque de survenue d'un CSC. Dans la littérature jusqu'au début 2016, 34 études de cohorte ([39-72](#)) et 12 études cas-témoins ([73-84](#)) ont examiné l'association entre les différents facteurs de risque de cancer du sein et le risque de développer un CSC (**Tableaux 1.3 et 1.4 voir section annexe**). Ces études exposent les différents facteurs qui jouent un rôle sur le risque du CSC. Des évidences scientifiques suggèrent qu'une combinaison de plusieurs facteurs, plutôt qu'une cause unique, influence le développement du CSC, mais les résultats diffèrent d'une étude à l'autre tout dépendant des critères de l'étude (population, mesure de l'exposition, et l'ajustement).

Les facteurs les plus étudiés dans la littérature et qui agissent d'une façon importante sur le développement du CSC sont : l'âge, les antécédents de cancer, les mutations, les facteurs hormonaux, l'ethnie, le mode de vie, l'histologie du premier cancer du sein (PCS) et les récepteurs du PCS et les traitements reçus.

Âge

L'âge au moment du diagnostic du premier cancer du sein (PCS) est le facteur prédictif le plus important de développer un CSC. La majorité des études ont trouvé que le risque de CSC décroît d'une façon exponentielle avec l'augmentation de l'âge au moment du diagnostic du PCS ([43-47](#), [53-56](#), [58](#), [67](#), [68](#), [70](#), [71](#), [74](#), [76](#)). Pourtant, six études n'ont pas trouvé une association significative ([41](#), [49](#), [52](#), [59](#), [81](#), [82](#)). *Gao et al* ([39](#)) ont trouvé une association significative entre l'augmentation de l'âge et le risque de CSC, mais aucune association significative n'était présente entre un âge jeune et le risque de CSC. *Van der brooks et al* ([41](#)) ont trouvé une association significative entre l'augmentation de

l'âge et le risque de CSC en présence d'une histoire familiale de CS tandis qu'aucune association significative n'ait présente pour un âge jeune. *Bernstein et al.* (53) ont montré que le risque de développer un CSC est beaucoup plus élevé que celui de développer un PCS quelle que soit la tranche d'âge au moment du premier diagnostic. Quatre études confirment que l'âge joue un rôle important en fonction du temps écoulé entre le diagnostic de PCS et le CSC (44, 47, 76, 82). En effet, si la durée du développement d'un CSC est pendant les 6 premiers mois du diagnostic du PCS, on remarque une augmentation de risque avec l'âge, tandis qu'une diminution de ce dernier est obtenue si le CSC est développé après les 6 mois du diagnostic du PCS (44). D'autres ont montré qu'une courte durée (<5 ans) entre le PCS et le CSC mène à un risque plus élevé de développer un CSC (82), surtout en présence d'une mutation de *BRCA1/2* (76). Dans la même veine, *Font-Gonzalez et al.* (47) ont montré que le risque de développer un CSC ainsi que le taux de mortalité de ce dernier est plus élevé après 2 à 5 ans d'un diagnostic du PCS. Cependant, deux articles ne trouvent aucune association significative entre le temps écoulé entre les deux diagnostics et le risque de développer un CSC (55, 81). Normalement, un diagnostic de cancer du sein est suivi d'un traitement, et une étude a montré que le traitement à un âge jeune augmente le risque de développer un CSC, et plus la durée de survie de la patiente est élevée, plus le risque augmente (80). Il faut noter cependant que *De Glas et al.* (44) à la fin de leurs analyses ont supposé que le CSC (développé pendant les 6 premiers mois) n'est qu'une métastase pour les femmes récemment diagnostiquées, étant donné que le développement d'un nouveau cancer est plus tardif qu'une propagation d'un cancer qui représente une récurrence. En regardant la relation entre le type des récepteurs hormonaux (RH) et l'âge, trois études ont montré qu'un PCS à un jeune âge augmente le risque de CSC quel que soit le type de récepteur hormonal (46, 48, 50).

Antécédents

Les antécédents familiaux de cancer du sein sont associés à un risque accru de développer un CSC. L'effet positif d'une histoire familiale de cancer du sein a été noté chez les femmes avec un membre de 1^{er} et 2^e degrés touché surtout à un jeune âge (41, 43, 49, 54, 72, 74, 76, 80, 81). Des études ont précisé qu'un PCS chez les membres de 1^{er} degré représente un risque plus élevé que ceux de 2^{es} degré (54, 72, 74). Trois études (59, 78,

[81](#)) ont démontré que la présence d'une sœur avec un PCS présente plus de risque de développer un CSC que d'avoir une mère avec PCS, toutefois, cela pourrait augmenter si la mère avait un cancer du sein bilatéral ([72](#), [74](#)). *Hislop et al.* ([84](#)) ont trouvé une association significative pour un CSC développé 1 an après le PCS en présence d'une histoire familiale. Cinq études n'ont pas trouvé d'association significative entre l'histoire familiale et le risque de CSC ([63](#), [65](#), [78](#), [79](#), [83](#)).

Des antécédents personnels de maladies bénignes du sein semblent à leur tour augmenter le risque de CSC ([59](#), [84](#)). Aussi, des antécédents familiaux d'autres types de cancer, comme le cancer de l'endomètre et le cancer des ovaires, semblent également augmenter le risque de développer un CSC ([72](#), [81](#)).

Mutations

Cinq articles ([41](#), [42](#), [45](#), [52](#), [76](#)) ont montré une augmentation du risque de CSC en présence d'une mutation du gène *BRCA* c'est-à-dire *BRCA1* et *BRCA2*, surtout avec un diagnostic de PCS à un âge jeune (<41 ans) ([41](#)), mais la majorité des résultats n'étaient pas significatifs. Une femme avec une mutation du gène *BRCA1* a un risque plus élevé qu'une femme avec une mutation du gène *BRCA2* ([41](#), [42](#), [52](#), [76](#)) et selon *Malone et al.* ([76](#)), plus cette femme est jeune plus le risque est élevé.

Ethnie

L'ethnie peut à son tour modifier le risque de CSC. Chez certaines populations, la race joue un rôle important en augmentant ce dernier. En effet, les femmes noires sont plus à risque de développer un CSC par rapport aux femmes de la race Caucasienne surtout si elles sont diagnostiquées à un âge jeune ([39](#), [53](#)), mais cela n'était pas significatif dans l'étude de *Bernstein et al.* ([59](#)). On note aussi que les femmes de la race Caucasienne non hispaniques possèdent un risque plus élevé que les autres femmes de la race Caucasienne ([39](#)). Avec une mutation de *BRCA1*, les femmes hispaniques sont les femmes les plus à risque suivi des femmes noires tandis qu'avec une mutation de *BRCA2*, les femmes noires deviennent les femmes les moins à risque de développer un CSC ([76](#)). Une étude a trouvé que les femmes de la race Caucasienne représentent moins de risque que les autres femmes de développer un CSC, mais cette association n'était pas significative ([82](#)). Il faut noter aussi que d'avoir des ancêtres juifs avec une mutation de *BRCA1* diminue le risque de développer un CSC comparativement à une mutation de *BRCA2* ([76](#)).

Facteurs hormonaux

Deux (73, 79) études sur huit (49, 54, 59, 73, 78, 79, 81, 84) ont trouvé qu'un nombre élevé de grossesses est relié à une diminution de risque de CSC, dont une qui relie ce risque à l'âge de la femme à la naissance du premier enfant. En effet, si la femme a eu son bébé à un âge avancé, elle a un risque plus élevé de développer un CSC (84). Une étude propose qu'un PCS avec ER (+) suivît d'une grossesse à un âge jeune, diminue le risque de développer un CSC tandis qu'une augmentation est remarquée si le PCS présente des ER (-) (73). Pourtant, d'autres études n'ont pas trouvé une association entre la grossesse et le risque de CSC (49, 54, 59, 78, 81).

L'ovariectomie peut de la même manière diminuer le risque de CSC (78), plus particulièrement si elle a été effectuée avant l'âge de 50 ans (52). Cependant, aucune association significative n'a été observée pour l'hystérectomie (59), ainsi que pour l'oophorectomie (45). D'autres facteurs associés aux hormones ont aussi été étudiés dans la littérature. Parmi les sept études qui ont regardé la relation entre le statut de ménopause et le risque de CSC (43, 45, 49, 59, 78, 79, 81), deux études ont trouvé que le statut de préménopause au premier diagnostic augmente le risque de développer un CSC (43, 59), surtout si la ménopause survient plus tard (> 45 ans) (45). D'autres ont trouvé qu'une ménarche à un âge jeune (< 11 ans) (73) augmente le risque de CSC, mais aucune association significative n'a été noté. Néanmoins, *Sisti et al.* (73) ont trouvé que pour une femme diagnostiquée avec un PCS après la ménopause et qui avait eu une ménarche à un âge tardif (> 14 ans), son risque de développer un CSC diminue indépendamment du statut de ER. D'autres études n'ont pas trouvé une relation entre les contraceptifs oraux et le risque de développer un CSC (59).

Mode de vie

Chaque femme a ses propres habitudes de vie qui peuvent jouer un rôle important en modifiant le risque de CSC. Parmi les cinq études qui ont regardé l'effet de l'obésité, trois études ont trouvé que les femmes obèses (avec un IMC (indice de masse corporelle) ≥ 30 kg/m²) (54, 77, 79) avaient un risque plus grand de développer un CSC, pourtant une étude a montré qu'un IMC élevé (≥ 30 kg/m²) suggère un risque élevé seulement chez les femmes préménopausées tandis qu'il diminue le risque de CSC chez les femmes postménopausées (78). Une combinaison des femmes pré/postménopausées pour cette

étude a montré une diminution de risque de CSC avec un IMC élevé, cependant ces résultats ne sont pas significatifs. Une dernière étude relie l'augmentation du risque de CSC au poids élevé à l'âge adulte (54).

Une étude a montré qu'une consommation élevée d'alcool (> 7 boissons /semaine) augmente le risque de développer un CSC (77), surtout s'il est accompagné par le tabagisme (77), tandis qu'une étude n'a pas trouvé une association significative entre le risque de CSC et le tabac (59).

Des études sont allées un peu plus loin pour assembler tous les facteurs qui peuvent affecter le risque de CSC. Une étude a trouvé que les femmes avec un groupe sanguin AB sont plus à risque que les femmes avec un groupe sanguin A ou B (81). Une étude n'a pas trouvé une association entre l'éducation (59) et le risque de CSC.

Histologie du PCS

Un risque accru du CSC est associé aussi à l'histologie lobulaire du PCS (39, 43, 44, 53, 56, 59, 69, 71, 81, 82) par rapport à l'histologie canalaire, mais cela n'a pas été validé par quatre études (39, 40, 47, 49, 78). Cette association peut refléter des différences fondamentales dans le comportement et/ou l'étiologie biologique des tumeurs ayant leur origine dans les cellules qui se différencient en lobulaires plutôt qu'en canalaire. Cependant, une étude a identifié la forme médullaire comme étant l'histologie à haut risque de développer un CSC sans donner d'explications scientifiques (39). *Hislop et al.* (84) montrent que l'effet de l'histologie lobulaire dépend du moment du diagnostic d'un PCS. De ce fait, un diagnostic de moins de 1 an du PCS avec une histologie lobulaire montre une association significative.

Selon l'étendue de la maladie, *Horn et al.* (82) montrent qu'un carcinome *in situ* représente un risque plus élevé de CSC lorsqu'il est un carcinome local (carcinome invasif sans invasion ganglionnaire) ainsi qu'une tumeur multifocale. D'autres caractéristiques de la tumeur ont été aussi étudiées. En effet, *Vichapat et al.* (49) ont rapporté une augmentation du risque de CSC avec le nombre de ganglions lymphatiques atteints (≥ 10), tandis que deux articles montrent qu'une invasion ganglionnaire diminue le risque de CSC, mais ces résultats n'étaient pas significatifs (81, 82).

La taille de la tumeur n'était pas associée à un risque plus élevé de CSC que lorsqu'il n'y avait pas d'antécédents de récurrences du PCS (49). Notamment, *Font-Gonzalez et al.* (47)

ont montré qu'un CSC de taille > 5 cm est plus fréquent chez les femmes âgées de ≤ 50 ans que chez les femmes âgées de > 50 ans, mais que le risque de CSC ne varie pas selon la taille de la tumeur. Des études n'ont pas trouvé une association significative entre la taille (54), le grade (40, 49) le stade (54, 59, 81) et le risque de CSC.

Récepteurs du PCS

Les récepteurs tumoraux ont également été étudiés dans la littérature, et sont impliqués dans l'augmentation du risque de CSC. Les récepteurs tumoraux sont divisés en HER2 et en récepteurs hormonaux (RH), tels que les ER et PR. Une femme avec une tumeur ER et PR négative a un risque plus élevé de développer un CSC qu'une femme avec une tumeur ER et PR positive (46), indépendamment de l'ethnie (51), vu la disponibilité du traitement de ce dernier (48, 50). Cependant, avoir des antécédents d'utilisation des hormones de types oestrogéniques augmente le risque de développer un CSC indépendamment des statuts de récepteurs (84). *Rusner et al.* (46) montrent qu'un PCS RH (-) de type canalaire et un diagnostic à un jeune âge représentent un risque élevé de développer un CSC, ainsi qu'une augmentation du risque de CSC chez les femmes diagnostiquées à un âge jeune (< 50 ans) avec un PCS RH (+). Dans la même veine, une étude a montré qu'un PCS avec des RH négatifs présente toujours un risque plus élevé et cela est indépendant du traitement hormonal et de la durée entre les deux diagnostics (75). Une tumeur avec des récepteurs ER (-)/HER2 (+) présente le risque le plus élevé de développer un CSC suivi d'un triple négatif (ER(-), PR(-), HER2(-)) ou une surexpression de HER2 (75). D'autres études ont montré une augmentation de risque avec un récepteur en particulier, ER (-) en présence d'une récurrence antérieure (49), PR (+) (81) ainsi qu'HER2 (+) (54). Une étude a regardé l'influence de plusieurs facteurs avec les récepteurs ER sur le risque de CSC, un récepteur ER (-) au PCS avec un allaitement maternel ou une grossesse retardée diminue ce dernier, contrairement au ER(+), pourtant ces résultats n'étaient pas significatifs après l'ajustement (73). *Sandberg et al.* (48) montrent que si la femme développe un PCS ER (-) après 50 ans, elle présente davantage de risque de développer un CSC, contrairement au PCS ER (+). Cependant d'autres groupes n'ont pas trouvé une association entre les RH (43, 54, 78), RH sans récurrence antérieure (49), ER (81) et le risque de développer un CSC.

Traitements

Plusieurs traitements tels que la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie et l'hormonothérapie sont proposés pour traiter le PCS, et l'effet de ces traitements varie sur le risque de développer un CSC.

Une étude sur deux (47, 49) a montré qu'une chirurgie suivie d'un second traitement diminue le risque surtout si elle est réalisée à un âge jeune (47).

Pour la radiothérapie, on trouve une étude qui a montré une augmentation du risque de CSC pour les femmes qui ont été traitées (49) et d'autres qui n'ont pas trouvé une telle association (39, 42, 47, 78, 79, 82). À noter que pour *Horn et al.* (81), la relation entre la radiothérapie et le risque de CSC était observée juste chez les patientes qui ont développé un CSC non simultané avec le PCS. Une seule étude a observé une tendance vers une diminution de risque de CSC avec la radiothérapie en présence et en absence de mutation de BRCA, mais ces résultats n'étaient pas significatifs (52). Des études ont rapporté un risque plus élevé pour la femme traitée à un jeune âge (< 45 ans) avec une survie supérieure à une durée > 5 ans (39), tandis qu'une autre étude a montré que le risque augmente proportionnellement avec le nombre d'années de survie (80).

Quatre études ont trouvé une réduction de risque de CSC après un traitement par chimiothérapie (41, 56, 59, 81), une étude a trouvé une augmentation du risque (82), tandis que trois études n'ont pas remarqué une association significative (42, 47, 49). Parmi les cinq articles qui ont étudié le traitement hormonal (41-43, 47, 49), *Shankar et al.* (43) et *Vichapat et al.* (49) ont une tendance vers une diminution du risque ainsi qu'un traitement sans récurrence antérieure, mais ces résultats n'étaient pas significatives. Pourtant, *Vichapat et al.* (49) ont trouvé une diminution du risque sans une récurrence antérieure, mais une augmentation de ce dernier en présence d'une récurrence. *Van den Broek et al.* (41) quant à eux ont observé une association significative entre un traitement systématique pour une patiente sans mutation de BRCA. Ensuite, le traitement par tamoxifène était aussi relié à une diminution du risque de développer un CSC (57, 60-62, 64), mais une étude a rapporté une réduction significative du tamoxifène seulement pour les femmes postménopausées (66).

En résumé, une femme possédant une histoire familiale de cancer du sein avec une mutation du gène BRCA, et ayant un cancer du sein primaire de type lobulaire avec des

récepteurs tumoraux négatifs à un jeune âge a un risque accru de développer un CSC. De plus, être traité par tamoxifène et possiblement par chimiothérapie diminue le risque de CSC, contrairement à la radiothérapie qui possiblement augmente ce dernier. Les résultats des études peuvent être contradictoires suite à la présence ou pas des biais épidémiologiques. L'ajustement ou pas pour les facteurs confondants ainsi que les facteurs d'appariements non tenus en compte peuvent créer un biais de confusion. Dans la même veine, le choix de la population (nombre, choix de groupe de comparaison, origine, le pays) qui diffère d'une étude à l'autre peut générer un biais de sélection, ainsi que la méthode pour mesurer l'exposition qui peut engendrer un biais d'information. Finalement, ce qui était présenté ci-dessus résume les facteurs agissant sur le risque de développer un CSC. Les différents facteurs de risque identifiés qui influencent le risque de développer un CSC tel que l'âge, l'histoire familiale, le statut de ménopause, le type histologique et le traitement doivent être pris en considération pour l'appariement des études cas-témoins qui ont pour but d'étudier un nouveau facteur et son lien avec le risque de CSC.

D'autre part, les différents résultats observés peuvent également être dus à un ou des facteur(s) sous-jacents méconnus/peu connus, qui moduleraient la réponse de l'environnement et donc le risque du 2^e cancer, notamment les facteurs épigénétiques, tels que la méthylation de l'ADN.

1.4 Épigenétique

1.4.1 Historique

Le terme épigénétique a été introduit pour la première fois par *Conrad Waddington* en 1942 (85), même avant la découverte de la relation entre l'ADN et le maintien des informations génétiques représentées dans les chromosomes. L'épigénétique est une branche de la biologie qui étudie la nature et les mécanismes des modifications réversibles durant la division cellulaire. Ce qui permet de moduler l'expression des gènes sans changement de la séquence nucléotidique (86). L'épigénétique est désormais essentielle pour le développement normal et la maintenance des profils d'expression des gènes spécifiques de tissus chez les mammifères. Les mécanismes épigénétiques

interviennent dans les différentes phases de cycle cellulaire telles que la division, la différenciation, la survie et la mobilité des cellules (87, 88).

L'épigénétique joue un rôle important dans le maintien de la normalité du génome. Le développement et la progression des maladies observées chez les êtres humains se manifestent par la perturbation des processus épigénétiques favorisant la transformation des cellules saines en cellules cancéreuses (89, 90). De manière générale, le début et la progression du cancer se manifestent par des anomalies/altérations épigénétiques (91).

En effet, les anomalies/altérations épigénétiques induisent l'activation d'oncogènes (leur surexpression favorise la cancérogenèse) et/ou l'inhibition des gènes suppresseurs de tumeurs ou parfois peuvent toucher les enzymes responsables des marquages épigénétiques ce qui favorise le développement d'un cancer (92). Sachant que ces aberrations épigénétiques sont de nature réversible et spécifique aux types cellulaires (93), cela a conduit à l'émergence du domaine prometteur de la thérapie épigénétique.

Beaucoup de modifications dans le matériel épigénétique sont remarquées dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales (94-97). Ces modifications concernent le mécanisme d'activation/inactivation de certains gènes qui sont impliqués dans la perte de contrôle du cycle cellulaire et l'adhésion avec le tissu environnant, les modifications structurales, ainsi que le gain de mécanismes de survie. Les modifications épigénétiques sont identifiées, mais l'effet de ces modifications ainsi que les mécanismes affectés par ces modifications ne sont pas clairement étudiés. Donc le mécanisme de la transformation épigénétique des cellules saines en cellules cancéreuses impliquées dans la formation de la tumeur n'est pas encore clair.

Pourtant, la machinerie épigénétique dans le cancer touche plusieurs composantes du génome telles que les histones, les nucléosomes, les acides ribonucléiques (ARNs) non codants plus spécifiquement les micro-ARNs ainsi que l'ADN (**Figure 1.5**) (98). Les sections subséquentes abordent ces quatre modifications épigénétiques.

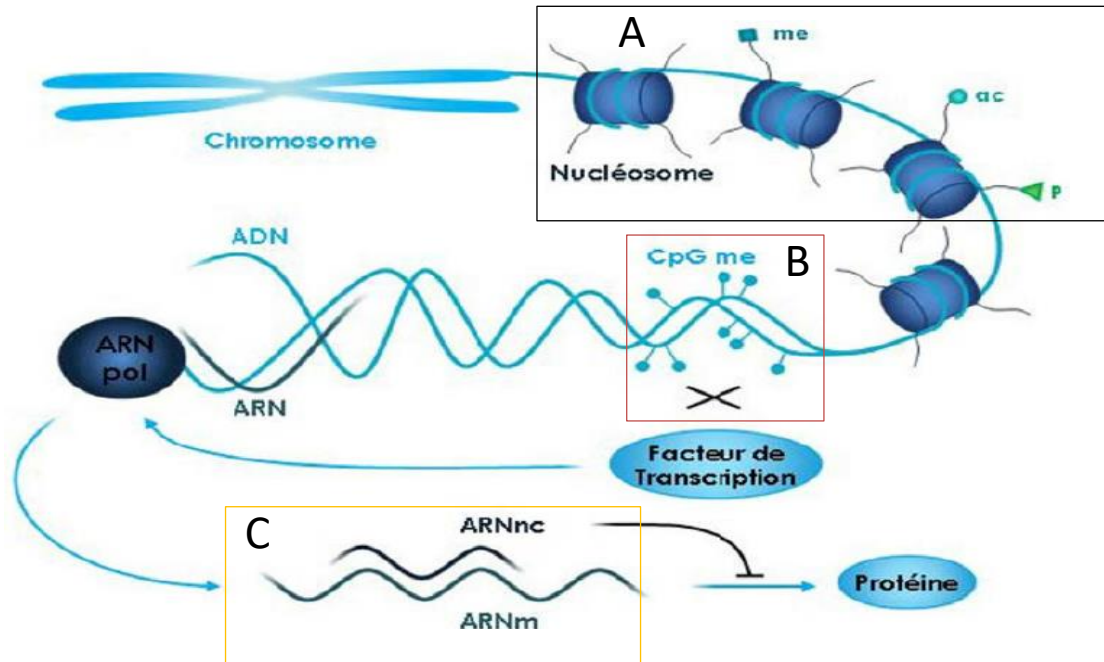


Figure 1.5 : Mécanismes de modifications épigénétiques. A) Le nucléosome, constitué de l'ADN enroulé autour d'une octamère d'histones. Les résidus des extrémités des histones sont soumis à différentes régulations post-traductionnelles telles que des acétylations (ac), des méthylations (me) ou encore des phosphorylations (P). B) L'ADN peut également être méthylé sur des séquences riches en nucléotides C et G appelées îlots CpG ce qui contribue à altérer la fixation des facteurs de transcription à l'ADN et donc le recrutement de l'ARN polymérase (ARN pol). C) Les ARN non codants (ARNnc) interviennent dans la régulation post-traductionnelle de l'expression des gènes ainsi que dans le ciblage des séquences d'ADN à méthyler. Tirée de (99).

1.4.2 Modifications covalentes des histones

L'ADN s'enroule sur les histones qui forment une bobine. Les histones sont constituées d'un domaine C-terminal globulaire et d'une queue N-terminale non structurée (100). Les protéines d'histones, constituant le noyau du nucléosome, jouent un rôle dans la régulation des processus cellulaires clés tels que la transcription, la réplication et la réparation. Diverses modifications post-traductionnelles covalentes changent la structure N-terminale des histones comme la méthylation, l'acétylation et la phosphorylation sur des résidus spécifiques (101).

Les modifications d'histones peuvent conduire soit à une activation ou une répression de la transcription, tout dépendant du positionnement des résidus modifiés et du type de modifications. Par exemple : l'acétylation de la lysine est en corrélation avec l'activation de la transcription, alors que la méthylation de la lysine conduit à l'activation de la transcription ou la répression (102).

1.4.3 Le positionnement des nucléosomes

Les nucléosomes sont les fonctions de base qui couvrent l'ADN dans une cellule. Les nucléosomes sont positionnés autour des promoteurs de gènes et dans des "Nucléosome-Free-Region (NFR)" aux extrémités 5' et 3' des gènes. Les NFR construisent des sites pour le montage et le démontage de la machinerie de transcription (103). Ils régulent l'expression génique en modifiant l'accessibilité des séquences de l'ADN régulatrices pour des facteurs de transcription (104).

La perte d'un nucléosome directement en amont du site d'initiation de la transcription est étroitement corrélée à l'activation du gène (100). En outre, la présence d'un NFR dans les promoteurs de gènes augmente la capacité d'activation de ce gène (105). L'interaction des machines de remodelage des nucléosomes avec la méthylation de l'ADN et les modifications des histones joue un rôle central dans l'établissement de profils d'expressions géniques globales et l'architecture de la chromatine, ainsi que la formation des cellules anormales (102).

1.4.4 L'expression de l'ARNs non-codants

Les micro-ARNs (mi-ARNs) sont de courts acides ribonucléiques (ARN) simple brin non codant qui régulent l'expression des gènes par le "silencing" post-transcriptionnel de gènes cibles (106). Les mi-ARNs jouent un rôle dans le maintien (contrôle) des processus biologiques, tels que la prolifération cellulaire, l'apoptose et la différenciation.

Comme gènes normaux, l'expression des mi-ARNs peut être régulée par des mécanismes épigénétiques (103). En outre, les mi-ARNs peuvent également moduler les mécanismes de régulations épigénétiques à l'intérieur d'une cellule en ciblant les enzymes responsables de la méthylation de l'ADN et les modifications des histones (107).

De même, les long ARNs non-codants (lncARNs) ont une structure et une fonction très diverses. Ces lncARNs se caractérisent par la longueur ainsi que le manque de capacité de

codage des protéines. Néanmoins, plusieurs références ont montré qu'ils sont intéressants dans le contexte de la régulation épigénomique. De plus, une considération importante est que la conservation de séquences d'IncARNs est rare, les transcrits avec des positions et directions correspondantes en référence aux gènes codant les protéines sont plus communs, indiquant que leurs fonctions peuvent être conservées (108). Les IncARNs sont souvent traités de la même manière que les ARNm et peuvent se trouver dans des fractions nucléaires ou cytosoliques (109, 110).

Cette interaction entre les différentes composantes des machines épigénétiques montre leur importance dans le maintien du profil génique dont leurs altérations jouent un rôle important dans le développement du cancer. En d'autres termes, les modifications épigénétiques sont impliquées d'une manière directe et indirecte dans le processus de développement du cancer.

1.4.5 La méthylation de l'ADN

1.4.5.1 Historique

Dans les années 70 et 80, l'implication des mécanismes de régulation de l'expression des gènes au cours du développement ainsi que le processus et le mécanisme de développement des cellules n'étaient pas clairement définis, mais quelques modifications telles que la méthylation de certaines des bases azotées de l'ADN avaient été identifiées. En 1975, deux chercheurs, *Holliday* et *Riggs*, suggèrent l'hypothèse que la méthylation inhibe l'expression des gènes au cours des divisions cellulaires, alors la méthylation de l'ADN peut être considérée comme un marqueur épigénétique. Le niveau de méthylation d'un gène dépend de son taux en îlots CpGs. La méthylation affectant l'expression des gènes (surexpression ou répression) est impliquée dans les régions promotrices et régulatrices de ceux-ci (90, 111-113).

La méthylation consiste en l'ajout d'un groupe méthyle (CH₃) à la place d'un atome d'hydrogène (H) et cette méthylation diffère d'une espèce à l'autre. Chez les procaryotes, l'adénine (A) et la cytosine (C) sont les deux bases qui peuvent être méthylées. La méthyladénine est impliquée dans les mécanismes de réparation et sert dans l'initiation de la réplication de l'ADN ainsi que dans l'activation de la transcription (114). Chez les bactéries, la méthylcytosine permet de protéger l'ADN bactérien de ses propres enzymes

de restriction (115). Chez les plantes et les êtres humains, c'est la cytosine qui sera méthylée. Chez les plantes, la méthylation de la cytosine se fait sur deux sites de reconnaissance différents : les CpGs et les CpNpGs, ce qui induit une inactivation des éléments transposables, des allèles parentaux et des transgènes (116). Pour l'être humain, seulement le site CpG est méthylé et la méthylation de ce site présente les mêmes fonctions que chez les plantes, mais en plus elle permet de réguler l'expression de nombreux gènes (113, 117).

1.4.5.2 Mécanisme de méthylation

La méthylation de l'ADN est peut-être la modification épigénétique la plus étudiée chez les mammifères. Elle a un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes et de l'architecture de la chromatine. La méthylation de l'ADN est la substitution d'un hydrogène (H) par un groupe méthyle (CH₃) sur une des bases azotées constituant l'ADN. La cytosine est la base azotée la plus fréquemment méthylée dans les dinucléotides CpGs. Les îlots CpGs (de 0,2 à 2 kilobases) sont des séquences riches en teneur C (cytosine) située à côté d'un résidu G (guanine) et répartie d'une manière homogène dans le génome humain (118). Les îlots CpGs sont situés en majorité à l'extrémité 5' des gènes (119). La plupart des sites CpGs ayant une teneur en GC supérieure à 50 % (120) sont méthylés dans le génome tandis que les îlots CpGs non méthylés se trouvent habituellement au cours du développement et dans des tissus différenciés (111). L'ajout d'un groupement méthyle sur une cytosine est catalysé par des enzymes spécifiques appelées ADN méthyle-transférases (DNMTs) (121) pour donner le 5-méthyl-Cytosine. Cette conversion est réalisée par la présence du donneur universel de groupement méthyle: la S-adénosyl- méthionine (SAM). La SAM est synthétisée à partir de la méthionine, de la choline et d'autres cofacteurs (acide folique ou vitamine B12). Après la perte de méthyle, la SAM devient le S-adénosyl-homocysteine (SAH) (**Figure 1.6**). Chez l'humain il existe 5 différentes DNMTs, dont DNMT1 qui est une méthyle-transférase de maintien qui joue un rôle principal pour maintenir la méthylation sur les deux brins de l'ADN lors de la réplication (122), et DNMT2 dont le rôle est encore incertain. DNMT3A et 3B sont des homologues et jouent un rôle principal qui est l'ajout de groupe méthyle sur l'ADN (c'est la méthylation *de novo*) (123), et DNMT3L qui est

enzymatiquement inactif, s'associe physiquement avec DNMT3A et DNMT3B, et stimule leurs activités catalytiques ([124-126](#)).

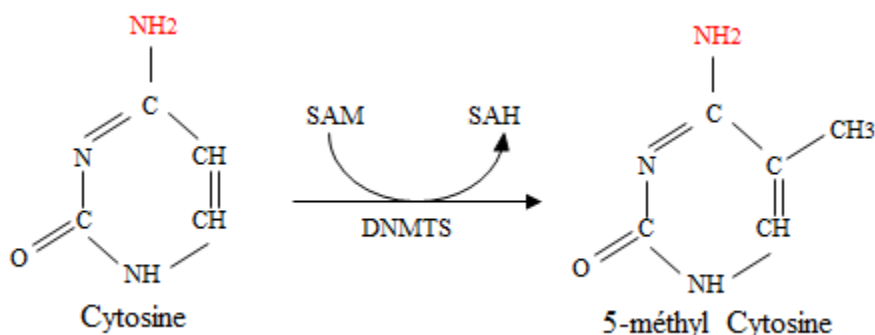


Figure 1.6 : Représentation des voies de méthylation de la cytosine. L'ADN méthyltransférase (DNMT) catalyse la conversion de cytosine en 5-méthylcytosine.

1.4.5.3 Rôle de la méthylation dans le développement cellulaire

Sachant que toutes les cellules de la même personne possèdent le même génome alors la même séquence d'ADN, mais que les profils de la méthylation de ces séquences sont différents d'une cellule à l'autre, cette diversité des motifs de méthylation est expliquée par trois processus. Quelques heures après la fécondation, les profils de méthylation hérités des parents sont activement déméthylés. Le profil paternel est déméthylé au complet tandis que le profil maternel est déméthylé progressivement : c'est la déméthylation globale. Une fois que les différents types de cellules embryonnaires sont formés, un nouveau profil de méthylation est mis en place, c'est la méthylation *de novo*. Selon le sexe, la méthylation sera rétablie sur un locus maternel ou paternel, c'est ce qu'on appelle l'empreinte parentale ([127](#)). Enfin, ces profils de méthylation se reproduisent dans les cellules filles lors de la réplication, on parle alors de la méthylation de maintenance. La méthylation, qu'elle soit *de novo* ou de maintenance, est contrôlée par les DNMTs ([111](#)).

Les cellules embryonnaires se différencient en des cellules de types histologiques et fonctions distincts. Le développement de fonctions spécialisées est validé par les

modifications épigénétiques affectant l'expression et l'extinction de certains gènes. D'où l'hypothèse que des profils variables de méthylation pourraient être responsables d'une expression génétique spécifique dans les tissus. Par exemple, certains tissus n'expriment pas certains gènes tandis que d'autres oui et cette différence d'expression est due à leur méthylation dans ces tissus. Par exemple chez les mammifères femelles, un des deux chromosomes X est actif tandis que l'autre est inactivé par la méthylation. Un autre exemple, l'inactivation par méthylation d'ARNm antisens du gène DNMT1 induit une activation génique générale (128). L'inhibition de DNMT1 induit une inhibition de la méthylation, ce qui permet l'activation de certains gènes prématurés qui étaient supposés restés inactifs sous l'influence de la méthylation (122). D'ailleurs, la méthylation des sites de liaison peut inhiber la reconnaissance des facteurs de transcription et par la suite une inhibition de la transcription, ou bien cette méthylation peut fournir des sites de liaison pour des protéines de domaine de liaisons méthyliques (129) qui peut ainsi médier la répression génique par des interactions avec les histones désacétylases (104).

1.4.5.4 Implication de la méthylation de l'ADN dans le cancer

L'initiation et la progression du cancer sont accompagnées par de profonds changements dans la méthylation de l'ADN qui ont été les premières altérations épigénétiques identifiées dans le cancer (123, 130-132). Depuis longtemps, une différence de profil de méthylation entre cellules normales et cellules cancéreuses était soulignée (130, 131).

Un épigénome du cancer est marqué par l'échelle de l'hypométhylation globale du génome et l'hyperméthylation régionale (**Figure 1.7**) (133). L'hypométhylation est un événement qui arrive au stade précoce de la tumorigénèse, induit une augmentation de l'instabilité génomique, et plus précisément l'activation transcriptionnelle des oncogènes (128), tandis que l'hyperméthylation régionale au niveau des îlots CpGs du promoteur de certains gènes est responsable de l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs tels que *O-6-Methylguanine ADN-méthyltransférase (MGMT)* et *Ras association domain family 1 isoform A (RASSF1A)* (134).

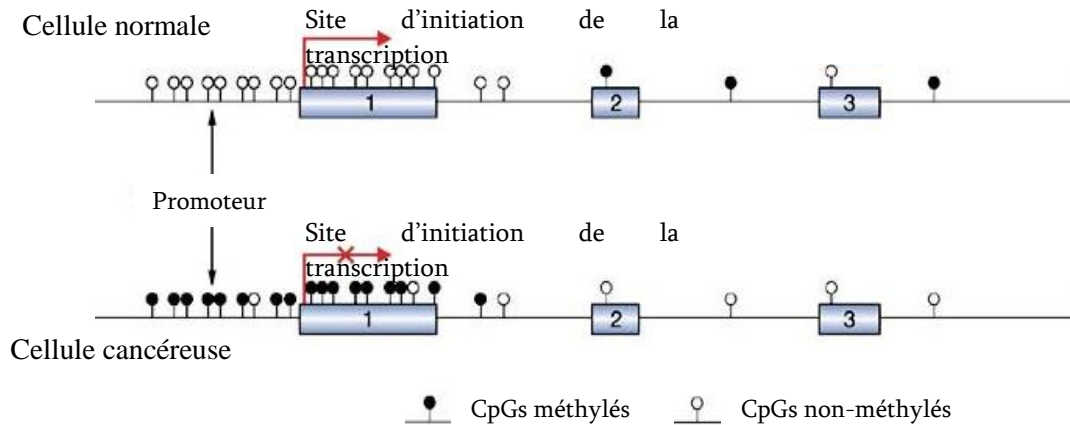


Figure 1.7 : État de méthylation des cellules normales versus cellules cancéreuses. Les cellules cancéreuses présentent une hyperméthylation des îlots CpGs au niveau des promoteurs qui induisent l'inactivation de la transcription ainsi qu'une hypométhylation globale au niveau du gène. Figure traduite de ([134](#)).

Hypométhylation globale de l'ADN

Le génome de cellules cancéreuses présente une diminution de 20 à 60 % de 5-méthylcytosine par rapport à des cellules normales ([112](#)). C'est ce qu'on appelle une hypométhylation. L'hypométhylation de l'ADN est souvent observée pendant les premières étapes de la tumorigénèse ou dans un tissu non néoplasique anormal comme l'hyperplasie ([135](#)), et se produit dans différentes séquences génomiques comprenant des éléments répétitifs (LINE, SINE, etc.), rétrotransposons, promoteurs pauvres en CpGs et les introns des gènes ([136](#)). L'hypométhylation de l'ADN à des séquences répétées favorise les réarrangements chromosomiques tandis que l'hypométhylation de rétrotransposons peut conduire à leur activation et la translocation vers d'autres régions génomiques ([137](#)). L'hypométhylation de certaines régions promotrices permet aussi l'activation des proto-oncogènes comme HRas Proto-Oncogene, GTPase (*H-ras*) et MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor (*c-myc*) ([138](#)), alors que l'hypométhylation de l'ADN augmente l'instabilité génomique ([128](#)). Une perte de méthylation de l'ADN et de l'instabilité génomique est remarquée dans une variété de cancers humains.

Hyperméthylation régionale de l'ADN

Dans certains cancers, une hyperméthylation régionale au niveau des îlots CpGs inactive les gènes suppresseurs de tumeurs. L'hyperméthylation de la région promotrice de certains gènes induit leur inactivation dans différents types de cancers tels que le gène : *Rétinoblastome (Rb)* dans les formes familiales de rétinoblastome ([135](#)), *Von Hippel-Lindau (VHL)* dans les cancers rénaux ([133](#)), *BRCA* dans le cancer du sein ([139](#), [140](#)) et *Serine/Thréonine Kinase 11 (STK11)* dans le cancer du côlon ([134](#)).

L'hyperméthylation des gènes dans les tumeurs est un phénomène largement répandu. Le niveau de cette méthylation varie selon le type de tumeurs. L'hyperméthylation spécifique des gènes suppresseurs de tumeurs est une cause principale de développement du cancer surtout que la majorité de ces gènes sont impliqués dans le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN (*MGMT*, *MutL homolog 1 (MLH1)*, *Death-associated protein kinase (DAPK)*), la régulation du cycle cellulaire (*Cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A (CDKN2A)*), l'apoptose (*RASSF1A*, *Cysteine-aspartic acid protease 8 (CASP8)*), le métabolisme des carcinogènes, la réponse hormonale et l'adhérence cellulaire ([134](#), [141](#), [142](#)). En plus de l'inactivation directe de gènes suppresseurs de tumeurs, l'hyperméthylation de l'ADN peut également réduire indirectement des classes supplémentaires de gènes en réduisant les facteurs de transcription et les gènes de réparation de l'ADN. L'inhibition de ces gènes de réparation (par exemple *MLH1*, *BRCA1* etc.) permet aux cellules d'accumuler de nouvelles lésions génétiques conduisant à la progression rapide du cancer.

1.4.5.5 Thérapie épigénétique

La nature réversible des changements épigénétiques profonds qui se produisent dans le cancer a conduit à la possibilité de la "thérapie épigénétique" comme une option de traitement. Le but de la thérapie épigénétique est d'inverser les événements épigénétiques qui se produisent dans le cancer, conduisant ainsi à la restauration d'un « épigénome normal ». Ceci est intéressant étant donné que la réversibilité de cette réaction serait sous la dépendance d'une déméthylase récemment découverte ([143](#)). De nombreux

médicaments épigénétiques ont été découverts récemment, dont les inhibiteurs de DNMTs qui peuvent efficacement inverser la méthylation de l'ADN et les inhibiteurs de la déacétylation des histones (HDACi) qui inhibent la production des aberrations dans le cancer. Les inhibiteurs de méthylation de l'ADN ont été parmi les premiers médicaments épigénétiques proposés pour être utilisés comme agents thérapeutiques contre le cancer ([144](#)) (**Tableaux 1.5**).

Parmi les inhibiteurs de DNMTs, deux médicaments ont été découverts et approuvés par la « Food and Drug Administration (FDA) », il s'agit de la 5-azacytidine (5-aza-CR) et de la 5-aza-2'-désoxycytidine (5-aza-CdR) ([145](#)). Le mode d'action de ces analogues nucléotidiques intervient dans la phase S du cycle cellulaire, en s'incorporant dans l'ADN et en inhibant d'une manière covalente les DNMTs. Ces deux agents inhibent la méthylation de l'ADN favorisant ainsi la réexpression de gènes suppresseurs de tumeurs. Ces médicaments sont également utilisés pour traiter les patientes atteintes de la myélodysplasie ([146](#), [147](#)) et de la leucémie myéloïde aiguë ([148](#), [149](#)). Cette réduction de la méthylation de l'ADN induite par le médicament provoque une inhibition de la croissance des cellules cancéreuses en activant les gènes suppresseurs de tumeurs qui étaient silencieux dans le cancer ([119](#)). Il faut cependant noter que ces analogues ont des effets cytotoxiques dans certaines cellules suite à leur incorporation directe dans l'ADN ([144](#), [150](#)). Récemment des inhibiteurs non nucléotidiques de DNMTs avec des effets toxiques réduits ont été développés. Ce genre d'inhibiteurs se lie sur le site catalytique de DNMTs sans être incorporés dans l'ADN ([151](#)).

Les modifications touchant la méthylation de l'ADN sont bien documentées dans la littérature, pourtant la façon dont les gènes sont ciblés par cette méthylation est encore peu claire. Sachant que la méthylation de l'ADN joue un rôle important et essentiel dans le développement d'un cancer, et puisque nous nous intéressons au cancer du sein, il devient important de regarder l'implication de la méthylation de l'ADN dans le développement du cancer du sein ainsi que son effet sur le risque de développer un cancer du sein.

Tableau 1.5 : Les inhibiteurs des ADN méthyltransférases (DNMTs) en oncologie.

Tiré de (152).

Cibles	Nature chimique	Drogues	Statut clinique
DNMTs	Analogues des nucléosides	Azacitidine (5- azacytidine)	Phase I/II/III (approuvée, FDA)
		Decitabine (5-aza- 2- deoxycytidine)	Phase I/II/III (approuvée, FDA)
		Zebularine	Préclinique
		5-Fluoro-2- deoxycytidine	Phase I
DNMTs	Non-analogues des nucléosides	RG108	Préclinique
		MG98	Phase I/II
		Hydralazine	Phase I/II/III

FDA : Food and Drug Administration

1.4.6 La méthylation de l'ADN dans le cancer du sein

La relation entre l'état de méthylation de certains gènes et le risque de développer un cancer du sein a été bien illustrée dans certaines études, mais le taux global de méthylation de l'ADN n'est pas bien défini. Des résultats montrent l'importance du niveau de méthylation sur la progression et le développement de cancer du sein (153, 154).

Hyperméthylation des gènes suppresseurs de tumeurs

Des études ont montré qu'une hyperméthylation directe de certains gènes suppresseurs de tumeurs joue un rôle assez important dans le développement du cancer. La possibilité d'une détection précoce de certaines de ces modifications épigénétiques les rend attrayants comme moyen de prévention potentiel pour les patientes.

La liste des gènes reliés au risque de cancer du sein est assez élevée et ne cesse de s'agrandir. Parmi cette liste, plusieurs gènes ont été identifiés hyperméthylés dans le sang et/ou le plasma des patientes de cancer du sein. Une hyperméthylation de *BRCA* dans le sang, ainsi qu'une hyperméthylation de *RASSF1A* et d'*Adenomatous polyposis coli (APC)* dans le sérum et le plasma semblent d'être associée au risque de développer un cancer du sein. Un ensemble de cinq études (155-159) sur sept (155-161) ont montré une hyperméthylation de (*APC*) dans le sérum ou le plasma des cas par rapport aux témoins tandis qu'aucune association n'a été signalée dans le sang (160, 162). De plus, trois études (155, 159, 163) sur quatre (155, 159, 161, 163) ont trouvé une hyperméthylation de *Retinoic acid receptor B2 (RARβ)* dans le sérum ou le plasma des cas par rapport aux témoins qui est reliée au cancer du sein, tandis que deux études (162, 164) n'ont pas trouvé une association significative dans le sang. Pour ce qui concerne le gène *BRCA1*, sept études ont montré une hyperméthylation dans le sang (162, 164-169) ou le sérum (156, 170) des patientes avec un cancer de sein par rapport aux femmes saines. Plusieurs études ont regardé le niveau de méthylation de *RASSF1A* dans le sérum ou le plasma dont huit (155, 157, 158, 163, 171-174) ont trouvé une hyperméthylation chez les patientes avec un cancer du sein, pourtant d'autres n'ont pas trouvé cette association dans le sérum (160, 161) ni dans le sang (160, 162). Pour le gène *Glutathione S-Transferase Pi 1 (GSTP1)*, deux études (155, 156) ont rapporté une hyperméthylation dans le plasma des cas par rapport aux témoins tandis que selon *Brooks et al.* (161) aucune association n'est présente dans le sérum. Une hyperméthylation des promoteurs d'*Ataxia telangiectasia mutated (ATM)* dans le sang (175, 176), *Septin-9 (SEPT9_v2)* dans le plasma (177), *Secretoglobin family 3A member 1 (HIN1)* et *Twist-related protein 1 (TWIST1)* dans les globules blancs (162), *Stratifin (SFN)* (178, 179) et *DAPK* (157, 172) dans le sérum et *Cystatin E/M (CST6)* (156, 180) dans le plasma semble impliquée dans le développement du cancer du sein. Dans la même veine, *Zmetakova et al.* (160) ont trouvé une hyperméthylation de *TIMP Metallopeptidase Inhibitor 3 (TIMP3)* et *Estrogen Receptor 1 (ERS1)* dans le sang des cas par rapport aux témoins, mais aucune association n'a été trouvée dans le plasma. Pourtant, deux études (156, 178) ont observé respectivement une hyperméthylation de *TIMP3* et de *ERS1* dans le plasma des patientes avec un cancer du sein. *Widschwendter et al.* (181) n'ont pas trouvé une association significative pour

TIMP3 et *ESR1* dans le sang. Dans la même veine, deux études ([158](#), [179](#)) n'ont pas observé une association significative entre la méthylation de *ESR1* et le risque de cancer du sein dans le sérum. D'autres études ont regardé les niveaux de méthylation de certains gènes tels que *Insulin Like Growth Factor 2 (IGF2)* ([182](#), [183](#)), *Cadherin 1 (CDH1)* ([160](#), [162](#), [164](#)) et *Spleen Associated Tyrosine Kinase (SYK)* ([160](#), [181](#)), mais aucune association significative n'a été trouvée dans le sang. La plupart de ces gènes jouent un rôle dans la prolifération, l'apoptose, l'adhésion cellulaire, ainsi que l'arrêt du cycle cellulaire présentent une hyperméthylation dans le cancer du sein.

Une hyperméthylation indirecte peut aussi induire le développement du cancer du sein. En effet, une surexpression des protéines arginines méthyltransférases (PRMTs), surtout les PRMT1v1 et PRMT1v2 responsables de la méthylation de l'arginine dans l'ADN a été rapportée dans les cellules cancéreuses. PRMT1v2 favorise spécifiquement la survie des cellules de cancer du sein et de l'invasion ([184](#)).

Hypométhylation des oncogènes

Une hypométhylation des oncogènes (gènes qui commandent la synthèse des protéines stimulant la division) augmente aussi le risque de développer un cancer du sein. Ainsi, une étude a montré qu'une hypométhylation de sites CpGs spécifiques pour les gènes *Regulatory-associated protein of mTOR (RAPTOR)*, *Mahogunin Ring Finger 1 (MGRN1)* et *Receptor Associated Protein Of The Synapse (RAPSN)* dans le sang est associée à l'augmentation du risque de développer un cancer du sein ([185](#)).

1.4.6.1 Méthylation des gènes spécifiques dans les tissus mammaires normaux

Plusieurs études ont rapporté que l'hyperméthylation des promoteurs dans le sang et/ou les tissus mammaires des femmes sans cancer sont des modifications fréquentes et précoces, d'où l'importance de regarder la méthylation dans les tissus normaux pour ainsi trouver un moyen de prédiction et de prévention de cancer pour les femmes atteintes de cancer ([186-188](#)).

Une étude a montré une différence de la méthylation de certains gènes dans les tissus mammaires normaux chez les femmes saines (Européens-Américains (EAs) vs les Afro-Américains (AAs)) dont les AAs présentent plus des sites CpGs hyperméthylés. Pour ce

qui concerne les promoteurs, les EAs présentent un niveau de méthylation plus élevé que les AAs tandis que c'est l'inverse pour les sites dans le corps des gènes et les régions intergéniques (189). Dumitrescu et al. (186) ont trouvé que les femmes avec une hyperméthylation de *BRCA1* dans les tissus mammaires normaux ont un risque 8 fois plus élevé d'avoir une hyperméthylation d'*Estrogen receptor alpha (ERα)*, d'où l'hyperméthylation d'*ERα* est associée à l'histoire familiale de cancer du sein. Les femmes avec des antécédents familiaux de cancer ont une probabilité accrue d'hyperméthylation de *Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor (p16INK4)* ou *BRCA1* (186, 190). En effet, après une stratification par race, l'hyperméthylation de *p16INK4* chez les Américaines d'origine européenne et de *BRCA1* chez les Afro-Américaines dans les tissus mammaires normaux était associée à des antécédents familiaux de cancer. La race et les antécédents familiaux de cancer augmentent donc la probabilité de ces événements précoces (186).

De plus, une hyperméthylation des promoteurs de *Paired Like Homeodomain 2 (PITX2)* (191) et du Phosphatase and tensin homolog (*PTEN*) (192, 193), *Septin-9 (SEPT9_v2)* (177), *Secretoglobin family 3A member 1 (HIN1)*, *Twist-related protein 1 (TWIST1)* (162) et de *Runt Related Transcription Factor 3 (RUNX3)* (194) dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus normaux semblent impliqué dans le développement du cancer du sein. Une autre étude a montré une hyperméthylation du gène *Hyaluronoglucosaminidase 2 (HYAL2)* dans les tumeurs malignes du cancer du sein comparativement à des tissus mammaires bénins (195). Une hyperméthylation du promoteur de *RASSF1A* a aussi été démontrée dans les tissus normaux adjacents à la tumeur par rapport aux tissus tumoraux (187, 196, 197).

Le niveau de méthylation du gène *Interleukin-10 (IL-10)* dans les tissus cancéreux est plus faible que dans les tissus normaux et bénins du sein, ce qui influence l'activité d'*IL-10*. L'hypométhylation d'*IL-10* est impliquée dans le processus de cancérogenèse mammaire (198).

De plus, un des proto-oncogènes les plus importants dans le mécanisme de développement du cancer du sein est *C-myc*. Une hypométhylation de motifs régulateurs de *c-myc* aboutit à sa surexpression (199), qui stimule l'amplification génique (200). Des études ont montré qu'une hypométhylation des gènes *Notch homolog 1 (Notch1)* et

Jagged 1 (JAG1) induit une surexpression des protéines qui jouent un rôle dans le développement du cancer du sein (201, 202).

Dans la littérature, on trouve peu d'études qui regardent la différence de méthylation de l'ADN dans les cellules normales. Par exemple, une étude a montré que la méthylation du promoteur des gènes *APC* et *RASSF1A* est fréquente dans les tissus normaux chez les femmes à risque élevé que chez les femmes à risque faible ou intermédiaire tel que déterminé par le modèle de Gail (187). *Lewis et al.* (187) ont rapporté que le gène *RARβ2* est méthylé dans 32 % des tissus normaux provenant de lésions mammaires bénignes, mais seulement dans 9 % des tissus normaux provenant des femmes sans ce type de lésions. *Widschwendter et al.* (203) quant à eux ont montré que l'expression du gène *RARβ* était absente dans 93 % des tumeurs et des tissus normaux adjacents, mais qu'elle était présente dans un tissu normal localisé à distance de la tumeur. La méthylation du promoteur des gènes *RARβ*, *RASSF1A* et *APC* dans les tissus mammaires bénins était associé à des marqueurs épidémiologiques reliés à un risque accru de cancer du sein tels que l'antécédent personnel de cancer du sein ou la probabilité du modèle de Gail (187). *Di Vinci et al.* ont trouvé que le gène *p16INK4A* est méthylé dans le tissu normal adjacent à la tumeur et ont soulevé la possibilité que l'hyperméthylation du promoteur *p16INK4A* puisse être un événement courant et précoce dans la carcinogenèse mammaire (204). D'autres types de protéines comme H-cadhérine, qui fait partie de la famille des protéines de la surface cellulaire, dont le gène est méthylé dans 6 % à 28 % des tissus mammaires normaux est associé au risque de développer un cancer du sein (187, 205).

En résumé, cette section a dressé le portrait de certains gènes différentiellement méthylés dans les tissus mammaires normaux et reliés de façon directe ou indirecte au développement d'un cancer du sein. La section suivante traitera de la méthylation globale de l'ADN dans les tissus et/ou les cellules normales et son influence sur le risque de développer un cancer du sein.

1.4.6.2 Méthylation globale de l'ADN

Plusieurs études (n=11) (162, 176, 206-214) dans la littérature ont regardé l'effet de la méthylation globale de l'ADN sur le risque de développer un cancer du sein (**Tableau 1.6 section annexe**).

En utilisant différentes techniques décrites à la section 1.5, les études de ce tableau ont mesuré la méthylation globale soit en étudiant le niveau de méthylation dans plusieurs éléments répétitifs (Long interspersed nuclear elements (LINE1), Satellite DNA sequence 2 (Sat2), et *Arthrobacter luteus* (Alu)), le niveau de 5-methyl-deoxy-cytidine (5-mdc) ou bien une simple estimation de l'intensité moyenne de la méthylation globale de l'ADN (valeur β : le rapport entre le signal de la sonde méthylée et l'intensité totale du signal du locus) comme taux global de la méthylation.

Cinq études ont regardé l'influence du niveau de méthylation globale de l'ADN dans le sang sur le risque de cancer du sein ([206-209](#), [214](#)). La plupart des études ont montré qu'une faible méthylation de l'ADN globale du génome était reliée à un risque accru de cancer du sein. *Veldhoven et al.* ([206](#)) ainsi que *Severi et al.* ([207](#)), ont trouvé une hypométhylation de l'ADN chez les cas comparés aux témoins en regardant la valeur β en utilisant l'Illumina Infinium human Methylation BeadChip 450 array, mais *Veldhoven et al.* ont trouvé que cette association n'est significative que dans une de leurs deux cohortes. Dans la même veine, *Severi et al.* ont trouvé une hyperméthylation de l'ADN dans les régions promotrices chez les cas en comparaison avec les témoins. Parmi les trois autres études qui ont mesuré le pourcentage de méthylation de l'ADN en utilisant LUMA, une étude a trouvé une hypométhylation de l'ADN chez les cas comparés aux témoins ([208](#)), tandis que *Xu et al.* ([209](#)), ont montré une hyperméthylation des régions promotrices chez les cas comparés aux témoins, et une dernière qui n'a pas trouvé une telle association significative ([214](#)).

Le niveau de méthylation dans l'élément répétitif LINE1 a été évalué dans sept articles ([162](#), [176](#), [209-213](#)). En utilisant plusieurs techniques pour étudier la méthylation de LINE-1 telle que le « Pyrosequencing », le « MethyLight » et le COBRA, aucun article n'a montré une association significative entre le niveau de méthylation de LINE-1 et le risque de cancer du sein. Ces études ont utilisé le sang comme échantillons dont la majorité a comparé la méthylation (moyenne, médiane et pourcentage) de LINE-1 entre les cas et les témoins ([162](#), [176](#), [212](#), [213](#)) tandis que d'autres ont comparé le niveau de méthylation selon les quartiles ([209-211](#)).

Pour les deux autres éléments répétitifs Sat2 et Alu, deux études ont regardé l'association entre la méthylation dans le sang et le risque de cancer du sein ([162](#), [210](#)). *Cho et al.*

(162) ont trouvé une hypométhylation pour Sat2 dans les globules blancs (GB) des cas par rapport aux témoins qui était associés à l'augmentation du risque de cancer du sein. Tandis qu'aucune association n'a été observée pour Alu (162), et *Wu et al.* (210) n'ont pas trouvé une association significative pour les deux éléments étudiés.

Finalement, une hypométhylation de 5-methyl-deoxy-cytidine (5-mdC) par spectrométrie de masse a été montrée chez les cas en comparaison des témoins par *Choi et al.* (213). De plus, une hypométhylation de [3 H]-methyl a été observée chez les cas par rapport aux témoins par *Delgado et al.* (214).

La relation entre l'hypo- ou l'hyperméthylation globale de l'ADN dans le sang et le risque de cancer du sein reste limitée et non concluante. Presque la moitié des études représentées ci-dessus ont montré une association significative entre l'hypométhylation de l'ADN leucocytaire chez les cas (avec un cancer du sein) et le risque de cancer du sein tout en comparant aux témoins (sans cancer du sein) ainsi qu'une association significative entre l'hyperméthylation de promoteurs de certains gènes et l'augmentation du risque de cancer du sein. Cette différence des résultats obtenue de la littérature pourrait être due à l'hétérogénéité de l'ADN isolé à partir du sang étant donné que le sang contient différents composants (types cellulaires) dont la méthylation est différente. De plus, il existe une variabilité élevée entre les méthodes quantitatives de détection de la méthylation de l'ADN. Le choix de la technique appropriée aux analyses aide en grande partie à bien valider les résultats. Ces différentes techniques utilisées pour la quantification de la méthylation sont détaillées à la **Section 1.5**.

1.5 Techniques pour étudier la méthylation

Tel que mentionné précédemment, le profil de méthylation du génome peut être étudié par des techniques enzymatiques et d'autres non enzymatiques ainsi que par des techniques combinées.

1.5.1 Les techniques enzymatiques

1.5.1.1 Enzymes de restriction

L'utilisation des enzymes de restriction est l'une des premières techniques utilisées afin d'étudier l'état de méthylation de l'ADN (trouver le 5 méthyl-cytosine). Son principe consiste à utiliser deux groupes d'endonucléases de restriction. Le premier groupe est représenté par les enzymes qui ont une capacité de fractionner l'ADN dans la séquence CCGG comme *MspI* et l'autre groupe qui reconnaît les cytosines non méthylées, tel que l'enzyme de restriction sensible à la méthylation- méthyltransférase (*HpaII*) (215). Par la suite, différents fragments selon l'état de méthylation seront visibles sur gel. Si le site est méthylé, deux fragments de différentes tailles seront observés par une électrophorèse en gel d'agarose, et si le site n'est pas méthylé, les fragments de la même taille seront observés. Cette technique permet de montrer s'il existe des sites CG déméthylés ou d'autres méthylés dans le génome à faible densité de CpGs. L'avantage de cette technique est qu'elle permet d'étudier un grand nombre d'échantillons, à moindre coût et avec une facilité d'interprétation des résultats. L'inconvénient de cette technique est de ne pouvoir étudier qu'un seul CG à la fois et d'être limité à l'analyse des CG inclus dans un site de restriction.

1.5.1.2 LUMA : « LUMinometric Methylation Assay »

La technique LUMA est basée sur la digestion de l'ADN génomique par des enzymes de restriction sensibles et non sensibles à la méthylation, suivie d'une quantification du nombre résultant de sites de coupure à l'aide d'une plateforme d'extension par polymérase luminométrique. En principe, un équipement muni d'un détecteur de lumière, tel qu'un luminomètre, doit être utilisé afin de détecter les modifications (216). Les avantages de cette technique est qu'elle permet d'utiliser une enzyme de digestion *EcoRI* qui n'est pas sensible à la méthylation ce qui permet d'avoir des quantités légèrement variables de l'ADN (217). Ainsi, c'est une technique qui étudie la méthylation globale de l'ADN, et elle ne nécessite pas un génome de référence (218). Cependant, cette technique comporte des biais selon plusieurs études (217) étant donné que le dosage ne détecte que les

différences de méthylation dans les sites CCGG qui ne sont pas répartis de manière uniforme dans le génome.

1.5.2 Les techniques non enzymatiques

La majorité des techniques non enzymatiques débutent par un traitement de l'ADN par le bisulfite de sodium. Les technologies actuelles permettent soit d'analyser un seul site de méthylation à la fois, soit d'analyser plusieurs CG d'un coup, mais elles sont extrêmement lourdes à mettre en œuvre.

Traitement par le bisulfite de sodium

Les protocoles de conversion par le bisulfite ont été mis sur pied en 1992 par *Frommer* et développés plus tard par *Clark* en 1994 (219). Cette méthode chimique permet de montrer l'état de méthylation de l'ADN, et elle se manifeste par une désamination des cytosines en uraciles (U), surtout les cytosines non méthylées étant donné que la cinétique de transformation des cytosines méthylées est beaucoup plus lente que celle des cytosines non méthylées (**Figure 1.8**) (220). Une fois la séquence de l'ADN traité, on remarque que seules les cytosines présentes sont celles qui étaient méthylées à l'origine tandis que les autres sont transformées par la Taq polymérase d'uracile en thymidine (T) lors de l'amplification.

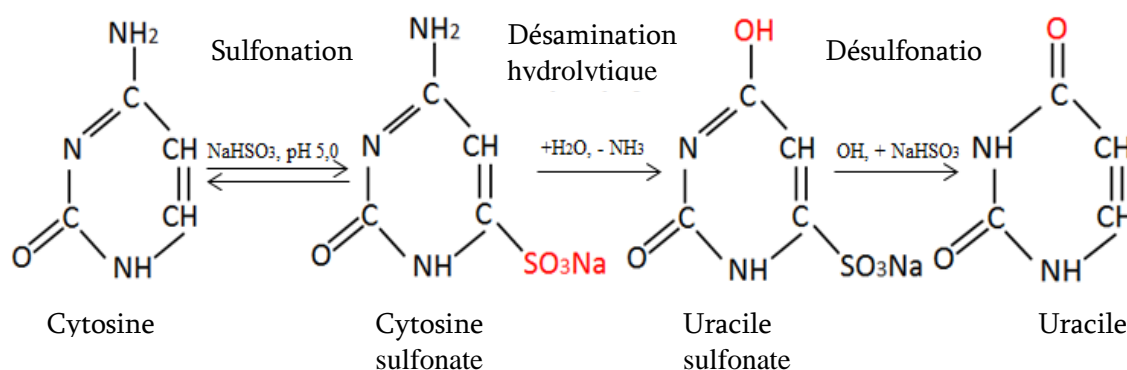


Figure 1.8 : Réaction de conversion de cytosine en uracile par le bisulfite.

1.5.2.1 Immunoprécipitation de l'ADN méthylé (MeDIP)

MeDIP est une approche qui détecte l'ADN méthylé sur les cytosines. Son principe est de traiter l'ADN génomique d'une manière aléatoire par sonication et par la suite immunoprécipiter les fractions avec un anticorps qui reconnaît spécifiquement la 5-méthyl-deoxy-cytidine (5-mdc). Cette technique peut être suivie par une PCR ou une analyse à haut débit (microarrays, séquençage profond). Cette méthode d'affinité fournit un outil important pour des résultats rapides et non biaisés de la méthylation de l'ADN à des coûts plus limités. Le MeDIP est plus rapide que les approches traditionnelles qui nécessitent un traitement aux bisulfites et ne se limite pas à l'analyse de séquences spécifiques. La précision des mesures de MeDIP diminue dans les régions très pauvres en CpG ([221](#), [222](#)).

1.5.2.2 Polymerase chain reaction (PCR)

Une fois l'ADN traité par le bisulfite de sodium, la méthode la plus simple est d'utiliser la PCR qui peut identifier la présence d'un C ou d'un T facilement ([223](#)). Cette technique nécessite l'utilisation d'amorces soit pour amplifier l'ADN méthylé ou au contraire l'ADN non méthylé ([224](#)). La technique la plus sensible de la PCR spécifique à la méthylation est le Methy Light, qui se base sur une PCR quantitative en temps réel. La PCR spécifique à la méthylation est une technique rapide et permet d'analyser un grand nombre d'échantillons. Cependant, un seul CG est examiné à chaque fois. Cette technique apporte donc une vue globale de la méthylation d'une petite région, tout en distinguant entre deux allèles différenciellement méthylés. Les deux méthodes PCR les plus utilisées sont la *methylation-specific PCR* (MSP) et le *bisulfite-sequencing PCR* (BSP). Le MSP peut évaluer rapidement l'état de méthylation de pratiquement n'importe quel groupe de sites CpG dans un îlot CpG, indépendamment de l'utilisation d'enzymes de restriction sensibles à la méthylation ([224](#)). Tandis que le BSP couple le traitement au bisulfite de l'ADN génomique (qui convertit les bases de cytosine non méthylées en uracile) avec l'amplification par PCR de la région d'intérêt dans l'ADN modifié ([225](#)). Ceci est ensuite suivi par un séquençage classique du produit amplifié pour évaluer spécifiquement la méthylation de l'ADN dans une séquence d'ADN particulière. Ces deux techniques peuvent être utilisés pour valider les résultats obtenus par illumina 450K.

1.5.2.3 Chromatographie liquide à haute performance sur gel dénaturant (DHPLC)

La DHPLC est une méthode qui se base sur le principe d'affinité des séquences séparées en condition dénaturante de la PCR obtenue après le traitement par bisulfite de sodium. Cette technique donne un aperçu global de la méthylation d'une région ([226](#)).

1.5.2.4 Clonage et séquençage

La technique de clonage et séquençage est la plus fréquemment utilisée et la première qui a permis d'étudier en détail l'état de la méthylation de tous les îlots CpGs de la région d'intérêt d'un gène connu au sein de l'ADN modifié ([227](#)).

Par comparaison avec une séquence d'origine, on vérifie au niveau des doublets CG si le brin examiné a conservé une C (méthylée à la base) ou une T (cytosine non méthylée convertie). L'inconvénient de cette technique est son coût surtout que l'ADN amplifié après traitement est généralement cloné dans des cellules bactériennes.

1.5.2.5 Pyroséquençage

Le pyroséquençage est une technique de séquençage direct qui permet de visualiser le profil de méthylation de tous les doublets CG d'une région donnée (4 à 25 dinucléotides CpGs) ([228](#), [229](#)). Cette technique a été développée en 2002 pour diminuer les problèmes de faux positifs ([230](#), [231](#)). L'avantage de cette technique est la rapidité à analyser de grandes séries d'individus et à envisager une cartographie des sites méthylés et non méthylés dans le génome humain.

1.5.2.6 *Illumina Infinium HumanMethylation 450 Assay*

Illumina Infinium 450K quantifie les niveaux de méthylation à des loci spécifiques dans le génome, permet d'interroger plus de 485 000 sites de méthylation par échantillon à une résolution de nucléotide unique. Le réseau couvre 99 % des gènes RefSeq, avec une moyenne de 17 sites CpGs par région du gène distribué à travers le promoteur, 5'UTR, premier exon, le corps du gène, et 3'UTR. De plus, cette technique couvre 96 % des îlots CpGs. Illumina Infinium HumanMethylation 450K est une technique qui offre une alternative à haut débit et à faible coût comparé à des méthodologies plus complètes

basées sur le séquençage. Elle détecte une méthylation différentielle avec une sensibilité élevée et des données de haute qualité (232). Cette technique est la plus utilisée pour la comparaison entre les échantillons, et non la quantification de la méthylation dans un seul échantillon. HumanMethylation450 BeadChip est la technique la plus développée et la plus utilisée qui nécessite une application des technologies de la chimie analytique Infinium I et II (Figure 1.9).

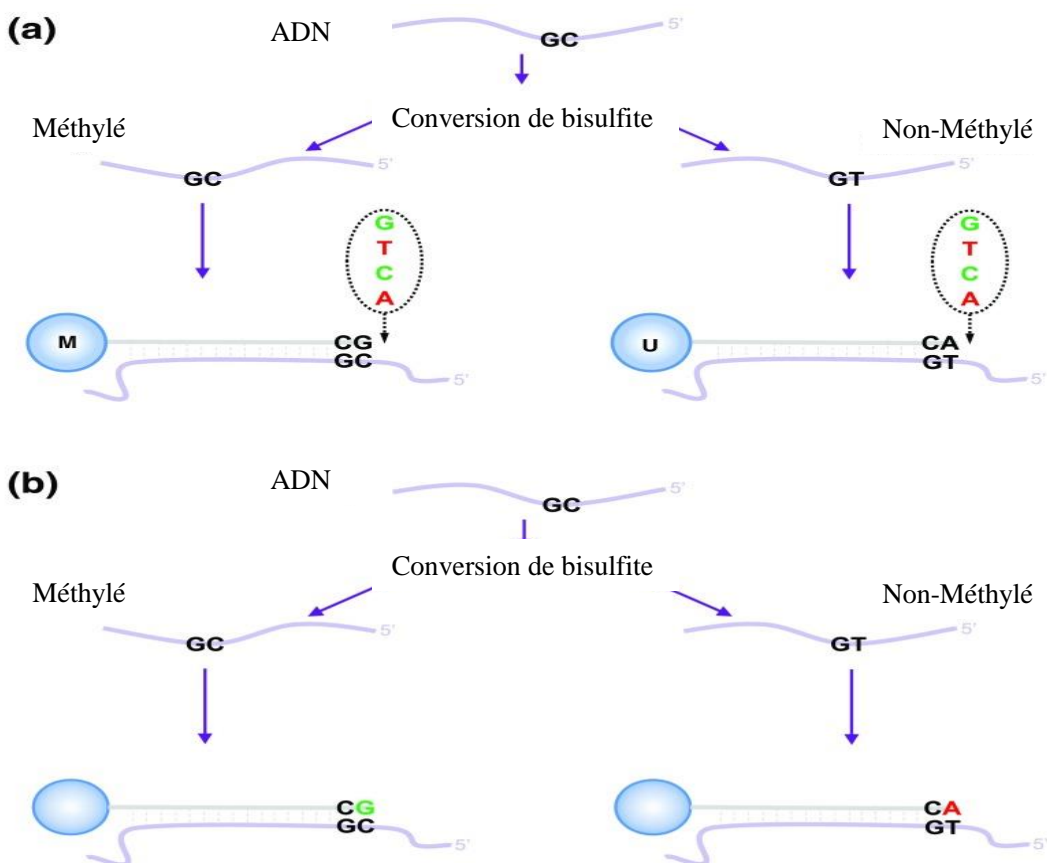


Figure 1.9 : Illumina Infinium HumanMethylation 450 assay. (a) Infinium I assay **(b)** Infinium II assay. Traduit de (233).

Tel qu'illustré (Figure 1.9), la technologie Infinium I utilise la fluorescence de deux sondes différentes, non méthylées (converties) et méthylées (non converties), pour évaluer le niveau de méthylation d'une cible CpG. Si un site CpG a été méthylé dans l'échantillon (représente une cytosine non convertie après traitement au bisulfite), l'ADN

s'hybride à la sonde complémentaire (méthylée), qui se termine à l'extrémité 3' avec une cytosine. Si le site CpG est non méthylé, alors la liaison se produit à la sonde complémentaire (non méthylée), qui se termine à l'extrémité 3' par une thymine. Chaque sonde est suivie par l'extension de base unique qui se traduit par l'ajout d'un nucléotide marqué par fluorescence. Il est supposé que l'état de méthylation des CpGs sous-jacents du corps de sonde de 50 pb est corrélé à celui de la cible CpG.

La technologie Infinium II utilise une seule sonde par site CpG, qui incorpore une base dégénérée à tous les sites CpGs sous-jacents dans le corps de la sonde. L'extrémité 3' de chaque sonde se termine par une C et l'ajout d'autres nucléotides dépend de l'état de méthylation de la cytosine dans le site CpG. Dans un site méthylé (non converti), la sonde se suit par un G complémentaire au C. Si le site CpG est non méthylé alors la C est déjà convertie en T (après amplification) et la sonde se poursuit par complémentarité par un A (adénine). À noter que les 2 nucléotides G et A ont des couleurs fluorescentes différentes : vert et rouge respectivement.

La technique illumina peut se réaliser en utilisant 2 types d'Infinium, dont la gamme des essais de type II est plus petite que celle de type I ; par conséquent, les valeurs-p sont vraisemblablement plus élevées pour le type II par rapport au type I. Alors, les essais de type II tendraient à atteindre des rangs inférieurs aux essais de type I et ainsi un biais et une puissance réduite dans l'étude ([234](#)).

À noter que toutes les techniques citées ci-dessus peuvent être appliquées sur l'ADN extrait de différents types d'échantillons. Les différences au niveau des divers types d'échantillons sont expliquées ci-dessous.

1.6 Différents types d'échantillons pour la recherche

Plusieurs types d'échantillons peuvent être utilisés pour la recherche dans le domaine de la santé. Un tissu est formé de cellules et de substances qu'elles synthétisent, c'est-à-dire ce qui forme la matrice extracellulaire (MEC) ([235](#)). Le diagnostic de nombreuses pathologies repose sur l'examen de tissus (l'histologie) afin de détecter la présence de la maladie. L'histologie est donc la science des tissus. Elle s'intéresse à l'histo chimie qui

représente la morphologie des cellules, et à l'histophysiologie qui rassemble les fonctions et les conceptions des tissus.

Il existe plusieurs formes de tissus utilisés afin de diagnostiquer une maladie ou de faire des analyses médicales, dont les tissus frais, congelés et fixés. Chaque forme de tissu a ses avantages ainsi que ses inconvénients ([236](#)). Les tissus frais et congelés représentent l'état exact des molécules à étudier, le matériel est généralement de bonne qualité et permet tout type d'analyse. Comme ils sont stables à -80 °C, plusieurs analyses peuvent être effectuées avec un même prélèvement. Cependant cette forme de tissu peut être sujette à l'ischémie en raison de l'attente très longue entre le début de l'opération, le prélèvement et la congélation. Les tissus frais et congelés peuvent être contaminés par d'autres tissus difficilement décelables. La possibilité de transmission de pathogènes avant la digestion du tissu est fréquente donc une fixation des tissus sera importante pour l'immobilisation des constituants tissulaires/cellulaires. Cette forme de tissu est donc la plus commune en pathologie étant donné que les matériels sont très stables à 25 °C. Un des inconvénients de ce type de tissu est que le type de fixatif peut jouer un rôle important en modifiant les liaisons covalentes qui lient les molécules entre elles, donc une modification de la structure. En plus, l'extraction de l'ADN à partir de ces tissus est extrêmement difficile, ce qui aboutit à une mauvaise qualité de matériel (très dégradé), et une impossibilité de réaliser de nombreuses analyses comme Southern, Northern et Western blot. Le sang est l'échantillon le plus utilisé dans la majorité des études étant donné la facilité à l'obtenir, mais il contient divers types cellulaires qui varient d'une personne à l'autre et est possiblement non représentatif des cellules qui donnent naissance à un cancer. Il est donc pertinent d'étudier la méthylation de l'ADN, qui est spécifique à chaque tissu, directement dans le tissu mammaire normal si on s'intéresse au risque de développer un cancer du sein.

Chapitre 2. Problématique, hypothèse et objectifs

2.1 Problématique

La méthylation de l'ADN, comme modification épigénétique, a été peu étudiée dans la littérature, malgré l'importance de cette dernière sur le développement et la progression du cancer. En ce qui concerne le risque du cancer du sein, seulement un petit nombre d'études ont examiné la méthylation de l'ADN surtout dans le sang, et elles ont montré que le profil de méthylation est différent chez les patientes atteintes d'un cancer du sein comparé à celui des femmes non atteintes ([206](#), [237](#)), mais sans identifier un marqueur spécifique. Donc, la relation entre la méthylation de l'ADN et le risque de développer un cancer du sein n'est pas encore claire.

La méthylation de l'ADN est un phénomène spécifique aux tissus étudiés. La meilleure façon d'étudier le risque de développer un CSC est de comparer les tissus normaux des femmes qui ont développé un CSC à des femmes qui n'en ont pas développé. Une disponibilité des tissus normaux suite à la chirurgie pour un CS peut être accessible et ces tissus seront possiblement affectés de la même façon par la présence de la tumeur ce qu'on appelle l'effet de champ (**voir section 4.2.1**). Alors, la différence de méthylation de l'ADN entre les tissus normaux adjacents à la tumeur provenant de patientes qui ont développé un CSC pendant le suivi et celles qui n'ont pas développé permet d'étudier un vrai risque de développer un cancer du sein soit celui controlatéral en minimisant l'effet champ s'il existe.

Nous proposons d'utiliser une approche génomique globale et spécifique de la méthylation de l'ADN dans une étude cas-témoins (1:1) appariée pour les facteurs identifiés comme facteurs de risques à la **Section 1.3.2**. Cette étude est nichée dans une cohorte de 1242 femmes avec un premier diagnostic de cancer du sein invasif non métastatique et des récepteurs œstrogènes positifs (ER+), diagnostiqués entre 2000 et 2007. Étant donné que le cancer du sein présente plusieurs sous-types, nous avons choisi pour nos analyses les femmes ayant des tumeurs ER+, car c'est le sous-type le plus répandu. Ainsi, nos résultats serviront de preuve de principe pour les autres sous-types. Cette approche permet d'identifier tous les changements dans la méthylation de l'ADN

des gènes dans les tissus mammaires normaux adjacents à la tumeur associés au risque de développer un CSC.

À ce jour, toutes les études qui ont évalué l'association entre la méthylation de l'ADN et le risque de cancer du sein ont été réalisées dans le sang ce qui ne reflète pas l'état exact de la méthylation dans le sein. Les études de méthylation de l'ADN dans les tissus fixés sont rares, et c'est pour cela qu'on ne trouve pas dans la littérature un protocole standard et validé pour l'extraction de l'ADN de ce type de tissu. Donc, le premier défi de notre projet était de récolter une quantité d'ADN suffisante et de qualité provenant des tissus mammaires épithéliaux normaux ayant été fixés au formol et enrobés en paraffine.

2.2 Hypothèse

L'hypothèse générale de mon projet est que les tissus mammaires épithéliaux normaux adjacents à la tumeur se caractérisent par plusieurs altérations épigénétiques et qu'ils contiennent des gènes hyper- et hypo-méthylés associés au risque de développer un CSC.

2.3 Objectifs

L'objectif général de mon projet est de regarder l'effet de la méthylation globale de l'ADN sur le risque de développer un CSC dans une étude cas-témoins nichée dans une cohorte de 1242 femmes avec cancer du sein. La différence de méthylation entre les cas et les témoins nous permettra d'identifier les gènes ainsi que les voies de signalisations affectées par ce changement de méthylation, qui sont impliqués dans l'augmentation du risque de développer un CSC.

Les objectifs spécifiques de l'étude sont :

- 1- L'identification des changements dans la méthylation globale de l'ADN dans les tissus mammaires normaux adjacents à la tumeur au moment du PCS entre les femmes qui ont développé un CSC (cas) et les femmes qui ne l'ont pas développé (témoins), en utilisant une approche du génome pangénomique.
- 2- L'identification des sites spécifiques différentiellement méthylés dans les tissus mammaires normaux adjacents à la tumeur au moment du PCS entre les femmes qui ont développé un CSC (cas) et les femmes qui ne l'ont pas développé (témoins).

Afin de procéder à ces objectifs, nous avons besoin d'une quantité suffisante d'ADN. Étant donné qu'il n'existe aucune méthode standard pour extraire de l'ADN des tissus normaux fixés au formol et enrobés en paraffine, la mise au point d'une méthode d'extraction est nécessaire pour identifier la meilleure méthode pour isoler de l'ADN de qualité et en quantité suffisante provenant d'échantillons fixés et inclus en paraffine. Cette mise au point est présentée dans le prochain chapitre.

Chapitre 3. Mise au point de la méthode d'extraction de l'ADN

3.1 Introduction

Notre question de recherche consiste à étudier l'effet de la méthylation sur le risque de développer un CSC. Afin de procéder, avec ceci, une quantité suffisante d'ADN de qualité est nécessaire. Dans la littérature, on trouve peu de protocoles d'extraction de l'ADN de tissus normaux fixés au formol et enrobés en paraffine. La majorité des protocoles existants sont efficaces pour une extraction d'ADN du sang ou bien des tissus tumoraux qui contiennent beaucoup de matériel. Alors, nous évaluerons plusieurs kits avec quelques petits changements pour trouver celui que conviendra le mieux pour nos besoins en utilisant des TMAs « tissu microarray » qui assemblent et concentrent les tissus mammaires épithéliaux normaux adjacents à la tumeur de chaque patiente.

3.2 Méthode

Construction des TMAs "tissue microarray"

L'identification des blocs de paraffine contenant des tissus épithéliaux normaux à une distance de 1 cm de la tumeur pour chaque patiente, avec une vérification microscopique des lames colorées à l'hématoxyline et l'éosine (H&E) de chaque bloc, sont réalisées pour identifier les lobules à poinçonner afin de construire les TMAs (**Figure 3.1**). Un TMA est réalisé avec 10 à 15 carottes de 1,5 mm pour chaque patiente prélevées de plusieurs blocs en paraffine et insérées toutes ensemble dans un nouveau bloc vierge pour avoir un bloc ou un TMA par patiente. Le TMA permet de concentrer les lobules normaux riches en épithéliums sur un même bloc. Une fois que le TMA est fait, on l'incube toute une nuit à 37 °C puis des coupes à l'aide d'un microtome sont réalisées et colorées par H&E pour valider la composition de chaque carotte. Tout TMA utilisé pour l'extraction était validé par un pathologiste.

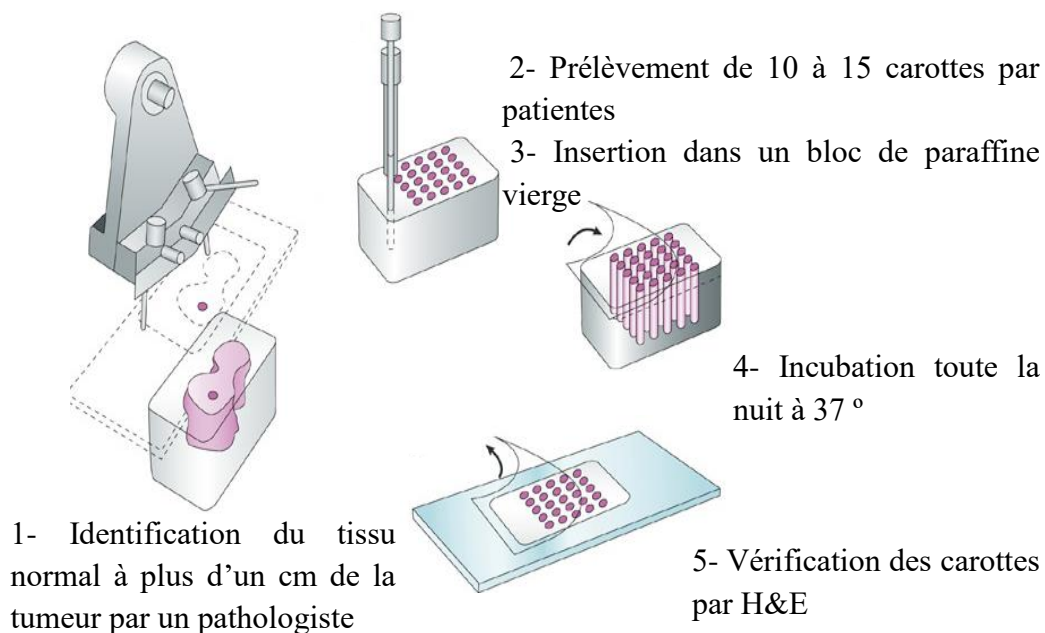


Figure 3.1 : Construction des matrices tissulaires (TMAs) (238).

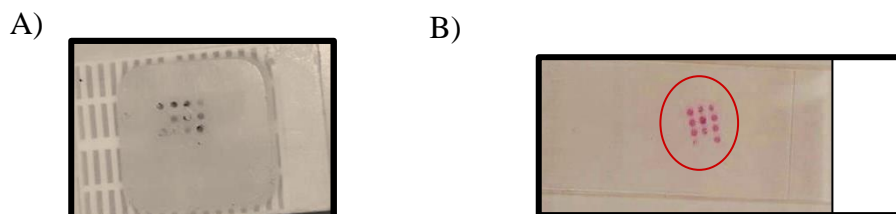


Figure 3.2 : Une démonstration de la construction du TMA. A) Représente un TMA avec 11 carottes. B) Représente la lame TMA après coloration à l'H&E.

3.3 Résultats

3.3.1 Préparation des échantillons

La première étape à suivre pour la mise au point du protocole pour l'extraction d'ADN est l'étape de déparaffinage des tissus parce qu'il existe plusieurs techniques, mais aucune validée pour une extraction sur de petits échantillons fixés en paraffine. La deuxième étape était la digestion par la protéinase K, parce qu'avec une extraction de

faible quantité de l'ADN on peut assembler beaucoup de matériels (acide ribonucléique, protéine) qui biaiseraient la qualité. Alors, nous avons essayé les différents kits proposés dans la littérature pour l'extraction de l'ADN des tissus tumoraux/normaux pour trouver celui qui génère le rendement le plus élevé et qui nous permettra de procéder à nos analyses de méthylation (**Tableau 3.1**).

Nous avons avant tout, estimé le nombre de coupes de tissus et de tubes à préparer pour chaque patiente. On a donc essayé de réaliser l'extraction pour des tubes contenant 10, 20 ou 30 coupes de TMA. L'épaisseur des coupes était de 10 μm , ce qui représente l'épaisseur idéale selon la littérature ([239](#)). Après la préparation des tubes, on a remarqué que les tubes qui contiennent 20 et 30 coupes nous donnent une quantité presque nulle d'ADN, et cela peut être dû à la grande quantité de paraffine qui bouche le tube (filtre). On a essayé aussi de préparer plusieurs tubes pour chaque patiente afin de collecter la quantité la plus élevée d'ADN. Après chaque tube, une coupe avec coloration à l'H&E est réalisée afin de vérifier la composition de chaque carotte. On a remarqué qu'après le 2^e tube, le pourcentage des lobules devient trop faible. Alors on a procédé à l'extraction avec 2 tubes contenant chacun 10 coupes de 10 μm pour TMA.

Tableau 3.1 : La mise au point pour l'extraction de l'ADN.

Nom de Kit	Compagnie	Déparaffinage	Quantité rendement	Qualité		Commentaires
				Ratio 260/280	Ratio 260/230	
1-GeneJet FFPE DNA purification	Thermo Scientific	Solution de déparaffinage	10 ng/μl	1,70	0,80	Protocole réalisé selon les instructions de fabricant
1-GeneJet FFPE DNA purification	Thermo Scientific	Solution de déparaffinage	15 ng/μl	1,75	1,00	Protocole modifié : -digestion à 90°C de 3 min à 6 min -incubation de protéinase K à 56°C de 50 min à 90 min
2-GeneRead DNA FFPE	Qiagen	Solution de déparaffinage	20 ng/μl	1,75	1,20	Protocole réalisé selon les instructions de fabricant
2-GeneRead DNA FFPE	Qiagen	Xylène	12 ng/μl	1,70	1,00	Protocole modifié : -étapes de déparaffinage (xylène à la place de solution de déparaffinage)
3-QIAamp DNA FFPE tissue	Qiagen	Xylène	25 ng/μl	1,85	1,00	Protocole réalisé selon les instructions de fabricant
3-QIAamp DNA FFPE tissue	Qiagen	Solution de déparaffinage	45 ng/μl	1,70	1,20	-incubation de protéinase K à 56°C pour 3h Protocole modifié : -étapes de déparaffinage (solution de déparaffinage à la place de xylène)
3-QIAamp DNA FFPE tissue	Qiagen	Solution de déparaffinage	40ng/μl	1,80	1,40	Protocole modifié : -étapes de déparaffinage (solution de déparaffinage à la place de xylène) -incubation de protéinase K à 56°C

						pour 24h
3-QIAamp DNA FFPE tissue	Qiagen	Solution de déparaffinage	35 ng/μl	1,85	1,60	Protocole modifié : -étapes de déparaffinage (solution de déparaffinage à la place de xylène) -incubation de protéinase K à 56°C pour 48h
3-QIAamp DNA FFPE tissue	Qiagen	Solution de déparaffinage	40 ng/μl	1,85	1,70	Protocole modifié : -étapes de déparaffinage (solution de déparaffinage à la place de xylène) -incubation de protéinase K à 56°C pour 72h

3.3.2 Choix de kit

Le premier kit essayé est le GeneJet FFPE DNA purification kit de Thermo Scientific. Plusieurs essais de ce kit selon les instructions du fabricant ont été réalisés (5 essais). Comme dans tout kit d'extraction, l'échantillon est mélangé avec un tampon de lyse qui permet de rompre les membranes des cellules, puis ce mélange est déposé dans une colonne contenant une membrane de silicate qui permet de fixer l'ADN. Seul l'ADN se lie à cette membrane, les protéines et autres impuretés sont éliminées grâce à deux lavages. L'ADN est ensuite récupéré par centrifugation, grâce à un tampon d'élution de pH basique et de faible concentration ionique, dans un tube stérile. Le rendement des purifications avec GeneJet FFPE DNA purification kit était assez faible de 10 ng/μl dans 60 μl tandis que nous visions 30 ng/μl pour le même volume. Des essais d'augmentation du nombre des carottes dans le TMA pour arriver à 30 carottes/TMA ont été réalisés, mais le rendement n'a pas vraiment augmenté. Nous avons dû faire quelques petites modifications au protocole pour essayer d'augmenter le rendement. Par exemple, nous avons donc augmenté la durée de déparaffinage à 90 °C de 3 min à 6 min (pour bien déparaffiner) ainsi que la durée de digestion (incubation de protéinase

K) à 56 °C de 50 min à 90 min (en supposant que la membrane soit bouchée), mais le rendement était toujours faible, donc nous n'avons pas réussi à avoir plus que 15ng/μl dans 60 μl. Alors, nous avons essayé un autre kit. Pour tenter d'améliorer l'extraction et le rendement, nous avons cherché dans la littérature et on a trouvé deux kits : le GeneRead DNA FFPE de Qiagen pour l'extraction de l'ADN du sang/ tissus et le kit QIAamp DNA FFPE tissue de Qiagen pour l'extraction de l'ADN des tissus. Ces deux kits diffèrent par une simple solution, la solution AL (lysis buffer) du kit GeneRead DNA FFPE de Qiagen qui est remplacée par la solution ATL (tissu lysis buffer), car selon Qiagen : « Le tissu est plus difficile à lyser que les cellules dans un échantillon ». Par conséquent, une étape d'incubation supplémentaire dans le tampon ATL contenant de la protéinase K est incluse dans le protocole pour tissus afin d'obtenir une lyse complète des échantillons. Alors, nous avons procédé à la mise au point avec ces deux kits, pour arriver à obtenir l'ADN nécessaire pour notre étude de méthylation.

3.3.3 Déparaffinage des tissus

Pour commencer la mise au point du protocole d'extraction, plusieurs techniques pour le déparaffinage sont proposées dans la littérature. Un déparaffinage par xylène/toluène est une technique qui permet l'élimination de paraffine suivie d'une réhydratation des tissus avec l'éthanol. Cette technique est la technique la plus utilisée pour l'extraction de l'ADN des tissus tumoraux, car elle permet d'avoir une quantité suffisante d'ADN avec un rendement élevé. La deuxième technique était un simple déparaffinage avec la solution de déparaffinage. Nous travaillons avec des tissus mammaires normaux adjacents à la tumeur qui présentent un petit nombre de lobules et on ne s'attend pas à extraire une grande quantité d'ADN. Nous avons essayé les deux types de déparaffinage, et après plusieurs essais, un déparaffinage par le xylène en utilisant le kit GeneRead DNA FFPE nous a donné 12 ng/μl dans 50 μl tandis qu'une quantité de 20 ng/μl était obtenue avec la solution de déparaffinage. Pour le kit QIAamp DNA FFPE tissus, un déparaffinage par le xylène donne un rendement de 25 ng/μl dans 50 μl tandis qu'un rendement de 45 ng/μl était obtenu pour le même kit avec la solution de déparaffinage selon les instructions du fabricant. Donc, le déparaffinage avec le xylène nous fait perdre presque la moitié de nos ADN et la meilleure quantité était

obtenue par le kit QIAamp DNA FFPE tissus. En ce qui concerne la qualité des échantillons déparaffinés, le ratio de 260/230 (qui doit être entre 1,50 et 2,00 pour un état pur de l'ADN) était de 1,00 pour un déparaffinage avec le xylène en utilisant le kit GeneRead DNA FFPE, ce qui représente un faible état de pureté. Cependant, l'incubation avec la solution de déparaffinage à 56 °C pour 3 minutes nous a donné une qualité plus élevée avec un ratio de 1,20 pour le même kit et ces résultats étaient similaires pour le kit QIAamp DNA FFPE tissus (un ratio de 1,00 pour le xylène et 1,20 pour la solution de déparaffinage). Malgré que la pureté de l'ADN (ratio 260/230) n'était pas parfaite pour les deux types de déparaffinage, la solution de déparaffinage nous a tout de même donné une quantité suffisante de matériel et un niveau de pureté plus élevé.

3.3.4 Digestion par protéinase K

Après plusieurs essais de déparaffinage de l'ADN soit avec la solution de déparaffinage ou avec le xylène (environ 20 échantillons), la pureté des échantillons n'était pas optimale donc nous avons dû modifier le protocole pour améliorer la digestion afin d'augmenter la pureté (ratio 260/230) de nos échantillons. La digestion des échantillons est faite en utilisant la protéinase K. Le rôle de la protéine K est de digérer les cellules et les nucléases. Nous avons essayé d'augmenter le temps d'incubation avec la protéinase K pour les 2 types de déparaffinage, afin d'augmenter la pureté de nos échantillons. En ce qui concerne le déparaffinage par xylène, aucune amélioration de la pureté n'a été remarquée contrairement aux résultats obtenus avec la solution de déparaffinage. En approfondissant nos recherches, nous avons trouvé des études récentes qui ont testé l'effet de l'incubation de la protéinase K à différents intervalles de temps (3h, 24h, 48h et 72h) sur la pureté de l'ADN des échantillons extrait ([240-242](#)), tout en ajoutant la protéinase K à chaque 24h lorsque possible. Nous avons testé ces différents temps sur plusieurs échantillons (5 patientes avec 4 tubes chacune) et chacun de ces tubes était incubé à un de ces intervalles de temps avec la solution de déparaffinage. Après ces essais nous avons trouvé qu'une incubation de 3 h donne un ratio 260/230 de 1,20. Pour celles de 24h et 48h le ratio monte à 1,40 et 1,60 respectivement, mais la meilleure qualité a été obtenue avec une incubation de 72h

dont le ratio de 260/230 est de 1,70. Alors, nous avons remarqué que la pureté des échantillons est proportionnelle au temps d'incubation avec la protéinase K.

3.4 Conclusion

Protocole d'extraction

Après avoir mis au point toutes les différentes étapes de l'extraction de l'ADN, nous avons choisi d'alterner entre les 2 kits de Qiagen. Dans un premier temps, le kit GeneRead DNA FFPE pour le déparaffinage avec la solution de déparaffinage, puis ensuite le kit QIAamp DNA FFPE tissue pour l'incubation de la protéinase K pendant 3 jours dans la solution ATL, avec lequel nous avons poursuivi le reste du protocole en suivant les instructions du fabricant.

Nos échantillons ont par la suite été envoyés à Génome Québec pour étudier la méthylation de l'ADN, qui a été réalisée selon le protocole suivant :

En utilisant les TMAs de chaque patiente, deux tubes contenant 10 coupes de 10 µm ont été préparés. Des coupes colorées à l'H&E entre chaque tube ont été faites et les composantes cellulaires des carottes étaient vérifiées par une pathologiste (éligibilité selon nos critères et l'absence de la tumeur). L'extraction de l'ADN a débuté par le déparaffinage de tissus avec 160 µl de solution de déparaffinage (Qiagen) et les tubes incubés à 56 degrés pour 3 min (GeneRead DNA FFPE). Ce processus a été répété deux fois afin d'éliminer toute la paraffine. Ensuite, nous avons ajouté 180 µl du tampon ATL (Qiagen) avec 20 µl de la protéinase K (Qiagen) ajoutée toutes les 24h (240), les tubes ont été incubés avec ce mélange pendant 3 jours à 56 degrés (afin d'augmenter la digestion des protéines et d'avoir une qualité plus élevée de l'ADN). Une fois cette première étape réalisée, nous avons incubé les tubes à 90 degrés pour 1h, ensuite, nous avons séparé les deux phases obtenues, déposé la phase claire (ADN+ ATL+ Protéinase K) dans un nouveau tube et nous avons jeté la phase bleue (paraffine et solution de déparaffinage). Par la suite, nous avons poursuivi le protocole du kit QiAamp DNA FFPE tissus de Qiagen selon les instructions du fabricant, en réalisant toutes les étapes, y compris les deux lavages. Nous avons élué les échantillons d'ADN deux fois avec 50 µl d'eau exempte de nucléase pour atteindre un volume d'élué final de 100 µl/ tube. Une concentration des échantillons d'ADN de 60 ng/µl pour 20

μ l était nécessaire afin de réaliser l'analyse de méthylation. Pour cela, quelques ADN extraits ont été concentrés par speedVac et ensuite suspendus dans l'eau exempte de nucléase pour obtenir la quantité minimale nécessaire de 1200 ng totaux d'ADN mesuré par nanodrop 2000.

Chapitre 4. Matériels et Méthodes

4.1 Sélection des groupes

Selon *Kenneth Rothman*, pour pouvoir étudier un risque dans une étude cas-témoins, il faut comparer entre deux groupes dont le premier représente les cas et le deuxième groupe représente la population qui donne naissance au cas (243). Dans notre étude, ce qui nous intéresse c'est le développement du CSC, alors nous devons comparer les femmes qui ont développé un CSC (les cas) à celles qui n'ont pas développé un CSC (les témoins qui ont donné naissance au cas). Pour ces deux groupes, on a une disponibilité des tissus suite à la chirurgie subite pour le premier cancer du sein via une banque de tissus subventionnée par le Fonds de Recherche du Québec-Santé (FRQS) et la Fondation du cancer du sein du Québec.

4.1.1 Collecte d'échantillons

Notre première étude que je nomme « l'étude principale » est une étude de type cas-témoins dits controlatéraux et primaires (1 :1) nichée dans une cohorte de 1242 femmes avec un premier diagnostic de cancer du sein invasif non métastatique, avec des récepteurs d'estrogènes positifs diagnostiqués entre 2000 et 2007 pour étudier le risque de CSC. Pour que ces femmes soient éligibles (1) elles ne devaient pas avoir été traitées avant la mastectomie (2) ne présentaient pas des antécédents de cancers et (3) qu'elles aient été suivies au Centre des maladies du sein (CMS). Toutes les femmes incluses dans notre cohorte ont déjà fourni des consentements écrits pour participer à la banque de tissus. Les cas dits controlatéraux (n = 22) sont des femmes qui étaient diagnostiquées avec un CSC (*in situ* ou invasif) au moins 1 an après le premier diagnostic (le temps nécessaire pour valider qu'il s'agisse d'un second cancer et non pas d'une récurrence). Les témoins dits primaires (n=22) sont des femmes qui ont été diagnostiquées avec un cancer du sein au moment du cas et qui sont restées vivantes jusqu'au développement du CSC par leurs cas appariés, selon les différents facteurs de risque identifiés dans la **Section 1.3.2**. Les 22 paires ont été appariées pour (1) l'année de chirurgie (+/- 24 mois), (2) l'âge (+/- 5 ans), (3) l'histoire familiale du cancer du sein (oui/non), (4) l'histologie tumorale du premier cancer (canalaire/lobulaire), (5) le traitement d'hormonothérapie (oui/non), (6)

le statut ménopause (oui/non) et (7) le statut HER2 au diagnostic du premier cancer du sein (+/-). Tous les facteurs de risque ainsi que les informations clinicopathologiques provenant dans les dossiers médicaux au moment du premier diagnostic étaient disponibles via la base de données du Centre des maladies du sein. Les données servant à l'appariement étaient validées par une infirmière de recherche.

Dans la même veine, dans une étude que je nomme « étude secondaire », nous avons choisi dans la même banque de tissus des femmes avec des maladies bénignes représentant les témoins dits bénins (n=4) qui ont été appariés à des cas dits primaires (n=4) identifiés déjà dans l'étude principale. Cette étude secondaire a été réalisée pour identifier les sites qui sont impliqués dans l'augmentation du risque de développer un CSC et dans l'augmentation du risque de développer un cancer du sein. Les cas dits bénins étaient des patientes qui ont subi une biopsie pour des maladies bénignes (pas de cancer), mais qui ont développé un cancer du sein plus tard. Les tissus choisis chez ces témoins dits bénins sont des tissus mammaires normaux prélevés sur les blocs de la chirurgie. Les quatre paires (primaires-bénins) ont été appariées pour (1) l'âge (+/- 5 ans) et (2) la date de chirurgie (+/- 2 ans). Ainsi, nous remarquons que quatre échantillons dits primaires sont des cas pour l'étude secondaire, mais des témoins pour l'étude principale. Les données servant à l'appariement étaient validées par une infirmière de recherche.

4.2 Sélection des tissus

Après avoir choisi les groupes de comparaison pour notre étude, nous nous sommes intéressés à étudier la relation entre la méthylation de l'ADN et le risque de développer un CSC. Sachant que la méthylation est un phénomène spécifique aux tissus, alors l'échantillon à étudier sera le tissu mammaire. Le tissu contient différents types cellulaires dont le profil de méthylation est différent, donc nous avons choisi d'étudier la méthylation dans les cellules qui sont impliquées dans le développement du cancer du sein. Ainsi, les meilleurs échantillons pour valider cette relation sont les lobules des tissus mammaires qui rassemblent les cellules épithéliales et les cellules myoépithéliales (vu la difficulté de les séparer). Les tissus fixés en paraffine rassemblent plusieurs compositions cellulaires qui biaiseraient les résultats de méthylation étant donné que chaque type cellulaire possède son propre profil de méthylation, pour cela nous avons essayé de

concentrer notre matériel en choisissant des zones qui contenaient les cellules épithéliales en majorité. Les zones choisies ont été utilisées pour construire un TMA pour chaque patiente. Le critère idéal de compositions cellulaires à respecter pour le choix des zones (carottes) des tissus à étudier est d'avoir toujours une quantité élevée de cellules épithéliales (>75%) par rapport aux autres composantes telles que les fibroblastes et les lymphocytes. Dans notre étude, on avait 40 échantillons dont la quantité des cellules épithéliales était > 75 % tandis que quatre échantillons avaient un pourcentage des cellules épithéliales > 50 % avec du stroma et du gras. La tumeur peut affecter les tissus adjacents par ce qu'on appelle « Field effect » ou « effet de champ » (**voir section suivante**), mais dans notre étude principale les tissus adjacents à la tumeur chez les cas (controlatéraux) et les témoins (primaires) étaient affectés de la même façon si un effet de champ existe étant donné que tous les tissus utilisés étaient proches de la tumeur. Ainsi, ces tissus vont être affectés similairement par l'effet de champ s'il existe, et donc les résultats de méthylation ne seront pas biaisés par un biais de mesure dû à l'effet de champ de la tumeur sur les tissus normaux.

4.2.1 Effet de champ

L'effet de champ est un processus biologique dont les cellules dans un tissu ou un organe sont touchées par les modifications cancérigènes. On parle de mutations génétiques ainsi que des modifications épigénétiques qui se produisent dans une zone proche de la tumeur (239). Les tissus adjacents à la tumeur représentent des états histologiques parfaitement normaux, mais contenant implicitement des anomalies moléculaires. Une des hypothèses concernant l'effet de champ se concentre sur des modifications épigénétiques, qui comprennent une hyperméthylation du promoteur de l'ADN de certains gènes suppresseurs de tumeurs, et qui conduisent à une régulation négative de ces gènes. En d'autres termes, la méthylation peut être affectée par la présence ou pas de la tumeur, et pour résoudre cette problématique, nous avons choisi d'étudier la différence entre deux groupes de tissus normaux qui présentaient (ou pas) le même effet de champ et dont les tissus étaient disponibles.

Pour des résultats de méthylation fiables et qui reflètent le vrai risque de développer un cancer du sein, nous avons choisi des femmes ayant développé un CSC comme cas et

comme témoin des femmes n'ayant pas développé de CSC. Pour les deux groupes, nous étudions la méthylation dans les tissus épithéliaux normaux adjacents au premier cancer et situés à plus de 1 cm de la tumeur pour éliminer ou minimiser l'effet de champ. Nous avons également choisi quelques tissus épithéliaux normaux provenant de femmes qui avaient subi une chirurgie pour des maladies bénignes pour représenter les témoins de notre étude secondaire. Les blocs de paraffine choisis pour chaque patiente ont été validés par un pathologiste.

4.3 Extraction de l'ADN

L'ADN a été extrait en alternant entre 2 kits de Qiagen. Dans un premier temps, le kit GeneRead DNA FFPE pour le déparaffinage avec la solution de déparaffinage, puis le kit QIAamp DNA FFPE tissue pour l'incubation de la protéinase K pendant 3 jours dans la solution ATL en ajoutant 20 µl de protéinase K tous les 24h, avec lequel nous avons continué le reste du protocole en suivant les instructions du fabricant jusqu'à l'élution de l'ADN dans 50 µl d'eau exempte de nucléase. Une concentration des échantillons de l'ADN de 60 ng/µl pour 20 µl était nécessaire afin de réaliser l'analyse de méthylation. Pour cela, quelques échantillons ont été concentrés par speedVac et ensuite suspendus dans l'eau exempte de nucléase pour obtenir la quantité minimale nécessaire de 1200 ng d'ADN de qualité mesurée par nanodrop 2000. Les échantillons étaient envoyés séparément dans 2 plaques à Génome Québec, pour étudier la méthylation. La première plaque contenait 6 paires et la deuxième plaque contenait 16 paires dont on a répliqué 2 paires, 1 paire inter-plaque (une paire de la première plaque était dupliquée dans la 2^e plaque) et 1 paire intra-plaque (la même paire déposée deux fois dans la même plaque dans des emplacements différents), et sans oublier les 4 témoins dits bénins additionnels. Suite à une dernière validation des échantillons après l'envoi, un échantillon a été enlevé à cause de la présence de tumeur entre les tubes 1 et 2 lors de l'extraction de l'ADN, et un autre échantillon ne contenait pas la quantité suffisante d'ADN pour Génome Québec, alors ces 2 échantillons avec leurs 2 appariés qui représentent 2 paires ont été enlevés pour réduire le nombre total de paires à 20 paires plus les 4 témoins additionnels.

4.4 Contrôle de qualité

Comme toute analyse de méthylation, les échantillons ont subi une étape de contrôle de qualité qui se manifeste par une PCR en temps réel et selon la norme de contrôle qualité (QC), en utilisant des amorces fournies dans le kit QC QCF Illumina Infinium HD (protocole d'essai Infinium HD FFPE QC, Illumina). Illumina recommande d'utiliser une valeur de « Quality Control Template » ($QCT \leq 5$) pour une performance d'essai optimale. Tous nos échantillons ont passé l'étape de contrôle de qualité et nos analyses se sont poursuivies avec les 20 paires restant plus les 4 témoins additionnels ([244](#)).

4.5 Conversion de bisulfite

La conversion de bisulfite a été réalisée afin de faciliter la détection de la méthylation, une cytosine non méthylée se convertit en uracile par l'effet de bisulfite qui par la suite se transforme en thymine suite à l'amplification par PCR. Une quantité de 500 ng d'ADN a été distribuée au hasard sur une plaque à 96 puits et ces ADN ont été traités à l'aide du kit de méthylation EZ DNA (D5001, Zymo Research, Orange, CA) selon les instructions du fabricant. La conversion réalisée a été vérifiée par des réactions de PCR de contrôle avec un ensemble d'amorces spécifiques pour l'ADN converti par bisulfite et un ensemble d'amorces pour l'ADN non converti. L'étape d'élution a été effectuée avec 10 µl de tampon M-Elution.

4.6 Restauration de l'ADN

Notre ADN était extrait des échantillons fixés en paraffine, dont la fixation à la formaline provoque un « cross-linking » et une fragmentation de l'ADN, ce qui donne un ADN dégradé de mauvaise qualité ([245](#)). Cette dégradation rend l'ADN inadapté à l'amplification du génome entier qui représente une étape essentielle pour étudier la méthylation en utilisant Illumina. Une quantité de 8 µl d'ADN converti par bisulfite à partir d'échantillons FFPE a été traitée comme décrit dans le guide de restauration Infinium FFPE (Illumina, Inc.) en utilisant le protocole de restauration Infinium HD FFPE fourni par le fabricant. L'ADN (> 100 ng) a été dénaturé avec 4 µl de NaOH 0,1 N pendant 10 minutes à température ambiante. Une réaction de 1 h à 37 °C a ensuite été

effectuée avec « Primer Pre Restore Reagent » (PPR) et « Amp Mix Restore Reagent » (AMR) fournis par le fabricant du kit, dans lequel la réparation de l'ADN est effectuée. Par la suite, l'ADN a été nettoyé avec un kit ZR-96 DNA Clean and Concentrator-5 (Zymo Research) en mélangeant la réaction précédente avec 560 µl de tampon de liaison et en distribuant le mélange dans une colonne Zymo-Spin. Ensuite, la colonne a été centrifugée pendant 2 min à 2250 g, et l'éluat a été jeté. Une étape de lavage avec 600 µl de tampon Zymo-Wash a été effectuée suivie d'une étape de centrifugation pendant 2 minutes à 2250 g. Des colonnes Zymo-Spin ont été placées sur des tubes, et 13 µl d'« Elution Restore Buffer Reagent » (ERB) ont été ajoutés à chaque colonne. Après une incubation à température ambiante pendant 5 minutes, les colonnes ont été centrifugées pendant 1 min à 2250 g, et l'éluat a été incubé pendant 2 min à 95 °C. Immédiatement après l'incubation à 95 °C, les échantillons ont été incubés sur de la glace pendant 5 min. En maintenant l'éluat sur de la glace, la réaction de ligation a été effectuée en distribuant 10 µl de « Convert Master Mix Reagent » (CMM) à chaque réaction et en incubant la réaction pendant 1 h à 37 °C. Suite à la réaction de ligation, l'éluat a été nettoyé avec le kit ZR-96 DNA Clean et Concentrator-5 (Zymo Research), comme décrit précédemment, et élué dans 10 µl de « Deionized Water » (DiH₂O). L'éluat final obtenu a été utilisé pour l'hybridation sur l'Infinium HumanMethylation450 BeadChip ([246](#), [247](#)).

4.7 Illumina Infinium 450k

Après le traitement au bisulfite et la restauration, 200 ng d'ADN ont été soumis à l'amplification complète du génome (WGA) et à la digestion enzymatique avec des réactifs fournis dans le kit Infinium HumanMethylation450 (Illumina). L'hybridation des échantillons sur BeadChips et les procédures de lavage ont suivi les procédures standards d'Illumina. Le scanner iScan (Illumina) a été utilisé pour lire la plaque BeadChips et la collecte de données a été importée dans le logiciel bioconducteur R. Pour qu'un échantillon soit accepté, le « call rate » de la sonde devait être > 98 %, et la valeur-p de détection pour les sondes devaient être < 0,01, sinon elles ont été exclues. La valeur β générée pour chaque locus CpG mesure l'intensité des sondes méthylées ($\beta = 1$) et non-méthylées ($\beta = 0$). Il est calculé comme suit $\beta = M / (M + U + 100)$, où M = intensité de l'allèle méthylé et U = intensité de l'allèle non méthylé. La valeur β varie entre 0 et 1, ou

les valeurs proches de 1 représentent des niveaux élevés de méthylation et celles proches de 0 représentent de faibles niveaux de méthylation (248). L'étape de contrôle de qualité, la conversion de bisulfite, la restauration et toutes les étapes d'illumina étaient réalisées au Centre d'Innovation Génome Québec et Université McGill.

4.8 Analyse bio-informatique et statistique

Les données de méthylation importées dans R ont été traitées pour le contrôle qualité en utilisant *Minfi*, suivie d'une normalisation selon la méthode *preprocessFunnorm* de *minfi*. Les valeurs β ont ensuite été extraites et corrigées pour l'effet de lot en utilisant la fonction *ComBat* de *sva*, d'où les répliques techniques étaient enlevés. Pour identifier les sondes ayant un mauvais seuil de détection, la fonction *detectionP* de *minfi* a été utilisée. Cette fonction retourne une valeur-p selon l'hypothèse nulle que le signal observé correspond uniquement au bruit de fond. Les sondes pour lesquelles ces valeur-p sont supérieures à 0,01 dans un échantillon ou plus sont supprimées. Un total de 21 893 sondes ont été rejetées basées sur une mauvaise qualité de détection dans des échantillons (incluant 330 des 416 sites situés sur le chromosome Y). Pour le choix des sondes contenant un polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP, *single-nucleotide polymorphism*) au milieu de CpG ou à l'extension, les sondes reconnues comme problématiques par *minfi* ont été supprimées (17 541 sondes) de même que les sondes répertoriées dans *Chen et al.* (249) où la fréquence de l'allèle mineure pour les populations de descendance européenne est supérieure à 0 selon les données de 1 000 génomes (28 352 sondes). Au total, 33 153 sondes ont été retirées à cause de polymorphismes. Les 416 sites situés sur le chromosome Y ont été rejetés. Au total, 78 602 sites ont été supprimés.

Nous avons étudié la méthylation globale d'ADN incluant tous les sites CpGs par patiente pour avoir une idée globale du niveau de la méthylation. On a calculé le risque estimé par le rapport de cotes (RC) de développer un CSC avec SAS en utilisant une régression logistique conditionnelle, dont les exposées sont les femmes avec une valeur $\beta >$ à la médiane des témoins. L'intervalle de confiance fixé à 95% a aussi été calculé. Pour l'étude secondaire, il n'a pas été possible de calculer le RC, car la taille d'échantillon était trop petite. La différence de méthylation par localisation des CpGs dans les régions génomiques a été ensuite examinée (5'UTR, premier exon, 3'UTR, corps du gène,

TSS200 qui assemble les sites CpGs à 200 paires de bases (pbs) du 5'UTR, TSS1500 qui représente les sites GpG à 1500 (pbs) du 5'UTR sans le TSS200 et promoteur qui assemble le TSS200, TS1500 et le 5'UTR). La différence de la méthylation a aussi été étudiée par régions des îlots CpGs, soit les îlots CpGs, les « shores » qui représentent les sites CpGs à 2 kpbs des îlots et les « shelves » qui assemblent les CpGs à 2 kpbs des « shores », donc à 4 kpbs des îlots CpGs (**Figure 4.1**).

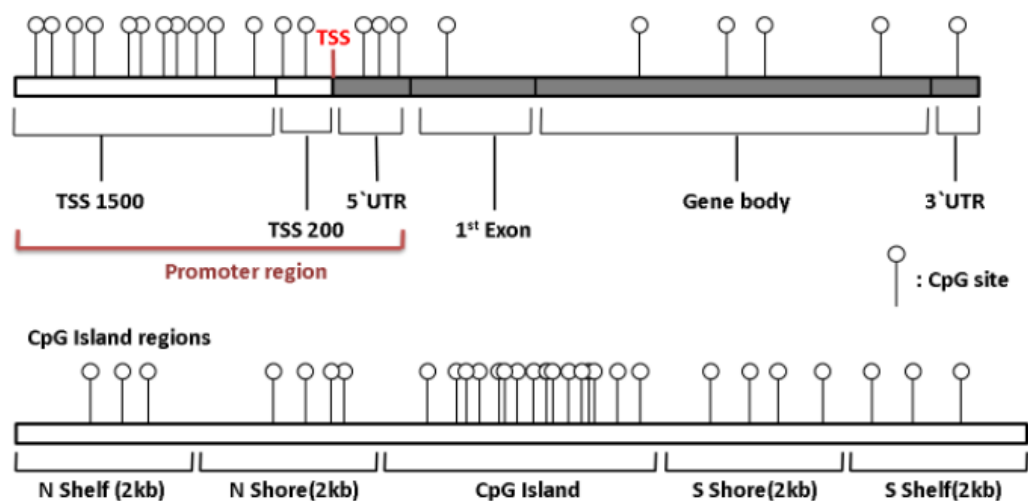


Figure 4.1 : Diagramme schématisé des régions géniques et des régions de l'île CpG. Tirée de (250)

L'analyse différentielle de la méthylation entre les groupes de comparaison a été réalisée en comparant les valeurs médianes β à l'aide du test signé des rangs de Wilcoxon qui est un test statistique non paramétrique pour données appariées, car nos données ne suivaient pas une distribution normale. L'identification des voies de signalisation affectées pour chaque étude a été réalisée avec les sites différentiellement méthylés avec un seuil de valeur-p non ajusté (c'est-à-dire sans tenir compte des comparaisons multiples) $< 0,001$ en utilisant le logiciel « Ingenuity Pathway Analysis » (IPA). Un site CpG est considéré comme hyperméthylé lorsque son « logFC » (ratio qui mesure la variation de l'expression d'un gène entre 2 conditions) est positif tandis qu'un « logFC » négatif représente un site de méthylation hypométhylé dans le tissu normal des contrôles par rapport aux primaires (ou des primaires par rapport aux bénins). Les régions différentiellement

méthylées ont été étudiées en utilisant la fonction *bumphunter*, avec des régions différentiellement méthylées (DMR) potentielles identifiées avec une valeur- $p < 0,05$ et un taux d'erreur familial (FWER) $< 0,5$ ([251](#), [252](#)). Tous les résultats entre les deux études ont été comparés. Les sites CpGs différentiellement méthylés chevauchés entre les sites associés au risque de développer un CSC et un cancer du sein (entre l'étude primaire et l'étude secondaire), avec un seuil de valeur- p non ajusté $< 0,005$ ont été identifiés afin d'identifier les gènes impliqués dans l'augmentation du risque de CSC et de PCS en se référant sur leur logFC pour identifier les gènes hypo-hyperméthylés.

Chapitre 5 : Résultats

5.1 Méthylation de l'ADN et cancer du sein controlatéral

5.1.1 Caractéristiques de la population pour l'étude principale

Les tableaux 5.1 et 5.2 présentent les caractéristiques des femmes et de leurs tumeurs ou traitements reçus dans notre population étudiée.

Tel qu'attendu selon l'appariement, les femmes étaient en majorité, autant pour les controlatéraux (femmes ayant développé un CSC) que pour les primaires (femmes n'ayant pas développé un CSC), âgées de plus de 50 ans (55 %) et ménopausées (65 %). Un grand nombre de femmes possédaient une histoire familiale de cancer du sein (75 %) (**Tableau 5.1**). Le premier cancer du sein était de type canalaire (95 %) avec des récepteurs HER2 négatifs (75 %). Les femmes étaient souvent traitées par chimiothérapie (70 %) ou hormonothérapie (100 %). Pour la radiothérapie, 90 % des controlatéraux ont eu ce traitement par rapport à 80 % chez les primaires. Les paires n'étaient pas appariées pour l'envahissement ganglionnaire, mais 60 % des paires n'avaient pas de ganglions envahis. De même pour le grade, 40 % des controlatéraux avaient un grade I, 45 % avec un grade II, 5 % avec un grade III et 10 % avec un grade inconnu comparé aux 15 %, 50 %, 30 % et 5 % respectivement chez les primaires. (**Tableau 5.2**).

Tableau 5.1 : Caractéristiques des femmes de l'étude principale.

Facteurs	Controlatéral		Primaire	
	N	%	N	%
Âge (ans)				
≤ 50	9	45	9	45
>50	11	55	11	55
Statut de ménopause				
Oui	13	65	13	65
Non	7	35	7	35
Histoire familiale de cancer du sein				
Oui	15	75	15	75
Non	5	25	5	25

Tableau 5.2 : Caractéristiques de la tumeur et des traitements de l'étude principale.

Facteurs	Controlatéral		Primaire	
	N	%	N	%
Histologie de la tumeur				
Canalaire infiltrant	19	95	19	95
Lobulaire infiltrant	1	5	1	5
Envahissement ganglionnaire				
Ganglions négatifs	12	60	12	60
1-3 Ganglions positifs	6	30	6	30
≥ 4 Ganglions positifs	2	10	2	10
Grade				
I	8	40	3	15
II	9	45	10	50
III	1	5	6	30
*SR	2	10	1	5
Récepteur HER2				
Non fait	4	20	4	20
Négatif	15	75	15	75
Positif	1	5	1	5
Radiothérapie				
Oui	18	90	16	80
Non	2	10	4	20
Chimiothérapie				
Oui	14	70	14	70
Non	6	30	6	30
Hormonothérapie				
Oui	20	100	20	100
Non	0	0	0	0

*SR : sans renseignement

5.1.2 Méthylation globale de l'ADN et le risque de cancer du sein controlatéral

Pour étudier la relation entre la méthylation globale de l'ADN et le risque de cancer du sein controlatéral, on a comparé les valeurs de la médiane β pour les controlatéraux et les primaires en tenant compte de l'appariement. La méthylation globale chez les controlatéraux qui assemble les différents sites de CpGs après le filtrage est de 0,476 qui représente une hypométhylation par rapport à la méthylation globale détectée chez les primaires qui est de 0,480. L'hypométhylation globale est associée à une diminution non significative du risque de développer un CSC (RC=0,714 et IC à 95 % de 0,227 à 2,251). Cependant, cette hypométhylation des controlatéraux par rapport aux primaires n'était pas associée significativement étant donné que la valeur-p obtenue du test signé des rangs de Wilcoxon est de 0,368 et que l'intervalle de confiance du RC inclut la valeur 1 (**Tableau 5.3**).

Tableau 5.3 : La méthylation globale de l'ADN et le risque de cancer du sein controlatéral.

# CpG loci	Médiane β Controlatéral	Médiane β Primaire	Test signé des rangs de Wilcoxon (valeur-p)	*RC (*IC à 95%)
406 910	0,476	0,480	0,368	0,714 (0,227; 2,251)

*RC : rapport de cotes

*IC : intervalle de confiance

5.1.3 Différence de la méthylation globale de l'ADN selon la localisation des CpGs

Par région CpG

La méthylation de l'ADN est étudiée selon les différentes régions CpGs (**Tabelau 5.4**). On a trouvé une hyperméthylation des CpGs chez les controlatéraux dans les « S-shelves » avec une médiane β de 0,724 par rapport à la médiane β obtenue pour les primaires qui est de 0,721. Au contraire, une hypométhylation a été signalée chez les controlatéraux par rapport aux primaires pour les sites CpGs qui rassemblent les régions « N-shelves », les « shores » ainsi que dans les CpGs en dehors des îlots qui représentent la région « OpenSea ». Cependant, aucune différence de méthylation n'a été

observée dans les îlots CpGs « islands » entre les controlatéraux et les primaires. Malgré ces différences de méthylation observées entre les controlatéraux et les primaires, aucune n'était statistiquement significative.

Tableau 5.4 : La méthylation globale de l'ADN par région CpG et le cancer du sein controlatéral.

Région CpG	# CpG loci	Médiane β Controlatéral	Médiane β Primaire	Test signé des rangs de Wilcoxon (valeur-p)
Island	137 226	0,073	0,073	0,728
N-shelf	19 466	0,720	0,723	0,430
N-shore	53 674	0,425	0,429	0,430
S-shelf	17 263	0,724	0,721	0,546
S-shore	42 104	0,396	0,399	0,571
Open Sea	137 177	0,693	0,698	0,388

Par localisation des régions génomiques

La méthylation de l'ADN a aussi été étudiée selon la localisation des régions génomiques (**Tableau 5.5**). Une hypométhylation dans le corps du gène avec une médiane β de 0,663, dans les régions intergéniques de 0,604 et dans les régions 3'UTR de 0,714 a été observée chez les controlatéraux par rapport aux primaires (médianes β de 0,667 ; 0,609 et 0,719 respectivement) tandis qu'aucune différence de méthylation n'a été observée dans les autres régions génomiques. Toutes ces différences de méthylation entre les controlatéraux et les primaires ne sont pas significatives.

Tableau 5.5 : La méthylation globale de l'ADN par localisation des régions génomiques et le cancer du sein controlatéral.

Régions génomiques	# CpG loci	Médiane β Controlatéral	Médiane β Primaire	Test signé des rangs de Wilcoxon (valeur-p)
Premier exon	35 711	0,068	0,068	0,728
3'UTR	16 278	0,714	0,719	0,430
5'UTR	58 237	0,110	0,109	0,927
Corps du gène	146 995	0,663	0,667	0,475
TSS200	57 213	0,069	0,068	0,571
TSS1500	73 252	0,155	0,155	0,841
Promoteur	85 163	0,059	0,059	0,570
Intergénique	92 391	0,604	0,609	0,452

5.1.4 Identification des sites différenciellement méthylés reliés au développement du cancer du sein controlatéral

Pour identifier les sites différenciellement méthylés impliqués dans le développement du CSC, nous nous sommes référés à la valeur-p obtenue pour la différence de méthylation entre les controlatéraux et les primaires. Avec un seuil de valeur-p < 0,001, nous avons identifié les voies de signalisation affectées ainsi que les fonctions et les maladies reliées à ces sites tout en séparant entre les sites hypométhylés et hyperméthylés selon le logFC (**Tableau 5.6**). En annexe, on retrouve un tableau plus détaillé avec les gènes impliqués dans les différentes voies, fonctions et maladies (**Tableau 5.6.1**). Après le filtrage pour la valeur-p < 0,001, on a identifié 53 sites dans des gènes hypométhylés et 79 sites dans des gènes hyperméthylés chez les cas (controlatéraux) comparés aux témoins (primaires). La voie de signalisation D1/AMPC/PKA/DARPP-32 était parmi les voies de signalisation les plus affectées par l'hypométhylation des gènes (valeur-p= 0,0062). De plus, on remarque que la voie de signalisation du gène suppresseur de tumeur p53 a été aussi affectée (valeur-p= 0,0271) ainsi que la voie de signalisation d'ATM (valeur-p= 0,0147). Il était intéressant de constater que les gènes hypométhylés étaient impliqués dans le fonctionnement et la maintenance des cellules (valeur-p= 0,0496), la morphologie cellulaire (valeur-p= 0,0496) ainsi que dans la croissance et la prolifération cellulaire

(valeur-p= 0,0451). Plusieurs maladies semblent affecter par les gènes hypométhylés, dont le cancer (valeur-p= 0,0479), les lésions organiques et anomalies (valeur-p= 0,0496), les maladies cardiovasculaires et neurologiques (valeur-p= 0,0475 et 0,0480 respectivement) ainsi que les troubles héréditaires avec une valeur-p= 0,0451.

Pour les gènes hyperméthylés, la voie de signalisation du diabète de type 2 (valeur-p= 0,00853) ainsi que celle du MAPK (valeur-p= 0,00846) étaient en majorité affectées. En outre, l'expression des gènes, l'interaction cellule-cellule ainsi que la mort et la survie cellulaire (valeur-p=0,00658, 0,0228 et 0,0228 respectivement) représentent les fonctions les plus surreprésentées associées aux gènes hyperméthylés. De même, les lésions organiques et anomalies (valeur-p= 0,0254), le cancer (valeur-p= 0,0240), les maladies neurologiques (valeur-p= 0,0230) et les maladies gastro-intestinales (valeur-p= 0,0228) représentent les maladies les plus affectées par les gènes hyperméthylés.

Pour l'ensemble des gènes, l'hypométhylation et l'hyperméthylation des gènes identifiés entre les controlatéraux et les primaires ont été associées à plusieurs maladies, telles que le cancer, les lésions organiques et les anomalies. Pour ce qui concerne les voies de signalisation identifiées par la totalité des gènes, on trouve la voie de signalisation d'ATM avec une valeur-p de 0,00983 ainsi que la voie de signalisation D1/AMPC/PKA/DARPP-32 (valeur-p= 0,0124). L'ensemble de ces gènes sont aussi impliqués dans la morphologie cellulaire (valeur-p= 0,0164), la survie et la mort cellulaire (0,0164), l'interaction cellule-cellule (valeur-p= 0,0164), le fonctionnement et la maintenance cellulaire (valeur-p= 0,0152). En plus de ces fonctions, les gènes identifiés sont impliqués dans le développement de plusieurs maladies telles que les lésions organiques et anomalies (valeur-p= 0,0164), les maladies gastro-intestinales (0,0164) et le cancer (valeur-p= 0,0164).

Tableau 5.6 : Diverses voies de signalisation, fonctions et maladies affectées par les sites hypométhylés et les sites hyperméthylés entre les controlatéraux et les primaires.

Gènes hypométhylés		Gènes hyperméthylés		Gènes hypo et hyperméthyles ensemble	
Voie de signalisation	Valeur-p	Voie de signalisation	Valeur-p	Voie de signalisation	Valeur-p
Voie de signalisation D1/AMPC/PKA/DARPP-32 (3)	0,0062	Voie de signalisation du diabète type 2 (3)	0,00853	Voie de signalisation d'ATM (3)	0,00983
Potentialisation synaptique à long terme (3)	0,00268	Voie de signalisation de MAPK induite par UVC (2)	0,00846	Biosynthèse de Cofacteur à molybdène (1)	0,00551
Voie de signalisation de NGF (2)	0,0299	Biosynthèse de Cofacteur à molybdène (1)	0,00329	Potentialisation synaptique à long terme (4)	0,00439
Voie de signalisation de p53 (2)	0,0271	Cycle de l'urée (1)	0,0196	Production d'oxyde nitrique et d'espèces d'oxygène réactives dans les macrophages (5)	0,00433
Voie de signalisation d'ATM (2)	0,0147	Dégradation de l'arginine I (voie d'Arginase) (1)	0,0131	Voie de signalisation D1/AMPC/PKA/DARPP-32 (4)	0,0124
Fonction	Valeur-p*	Fonction	Valeur-p*	Fonction	Valeur-p*
Morphologie cellulaire (18)	0,0496	Expression du gène (9)	0,0065	Morphologie cellulaire (39)	0,0164
Cycle cellulaire (9)	0,0496	Assemblément et organisation cellulaire (21)	0,0256	Mort et survie cellulaire (26)	0,0164
Fonctionnement et maintenance cellulaire (15)	0,0496	Interactions cellule-cellule (18)	0,0228	Expression du gène (13)	0,0164
Transport moléculaire (17)	0,0474	Mort et survie cellulaire (19)	0,0228	Interactions cellule-cellule (22)	0,0164
Croissance et prolifération cellulaire (9)	0,0451	Métabolisme des acides aminés (3)	0,0228	Fonctionnement et maintenance cellulaire (13)	0,0152
Maladies	Valeur-p*	Maladie	Valeur-p*	Maladie	Valeur-p*
Lésions organiques et anomalies (45)	0,0496	Lésions organiques et anomalies (67)	0,0254	Lésions organiques et anomalies (111)	0,0164
Maladie neurologique (23)	0,0480	Cancer (65)	0,0240	Maladie gastro-intestinale (65)	0,0164
Cancer (43)	0,0479	Maladie neurologique (24)	0,0230	Cancer (106)	0,0164
Maladie cardiovasculaire (10)	0,0475	Maladie gastro-intestinale (61)	0,0228	Maladie du tissu conjonctif (33)	0,0164
Trouble héréditaire (18)	0,0451	Maladies et affections dermatologiques (45)	0,0131	Maladie immunologique (20)	0,0152

* La valeur-p la plus élevée

() Nombre de gènes impliqués de nos analyses

5.1.5 Identification des régions différentiellement méthylées reliées au développement du cancer du sein controlatéral

Pour l'identification des régions différentiellement méthylées qui sont reliées au développement du CSC, on se réfère à la valeur FWER < 0,5. Trois régions

différentiellement méthylées ont été identifiées, ces régions sont présentées sur les chromosomes 2 (FWER= 0,178), 6 (FWER= 0,432) et 19 (FWER= 0,461). *CCDC108* (Cilia and flagella associated protein 65) et *HLA-DPB2* (Major Histocompatibility Complex, Class II, DP Beta 2) représentent les gènes affectés par les régions différenciellement méthylées du chromosome 2 et 6 respectivement, mais aucun gène n'est identifié dans la région différenciellement méthylée du chromosome 19. *CCDC108* est un gène de cancer du sein qui joue un rôle dans la liaison à l'ARN, la croissance et l'invasion tumoral ainsi que dans la motilité des spermatozoïdes (253), tandis que *HLA-DPB2* représente un pseudogène qui est relié à l'augmentation du risque de cancer cervical ainsi qu'à la voie de signalisation de la régulation de N-RAS (Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog) par les protéines G et dans la réponse immunitaire NFAT (Facteur nucléaire des lymphocytes T activés) (254, 255) .

5.2 Méthylation de l'ADN et cancer du sein

5.2.1 Caractéristiques de la population pour l'étude secondaire

Les femmes de la population étudiée pour l'étude secondaire étaient majoritairement âgées de > 50 ans (75%) autant pour les cas (primaire) que les témoins (bénin) et avec un statut post-ménopausé (100 % pour les témoins par rapport à 75 % pour les cas). D'autre part, les témoins (bénins) comparativement aux cas (primaire) étaient plus nombreux avec une histoire familiale de cancer du sein.

Nous remarquons que les femmes des deux études (principales et secondaires) sont en majorité âgées de > 50 ans et avec un statut post-ménopausé. De plus, les femmes de l'étude principale et l'étude secondaire sont comparables pour l'histoire familiale de cancer du sein sauf chez les cas de l'étude secondaire (les primaires).

Tableau 5.7 : Caractéristiques des femmes de l'étude secondaire.

Facteurs	Primaire		Bénin	
	N	%	N	%
Âge (ans)				
≤ 50	1	25	1	25
>50	3	75	3	75
Statut de ménopause				
Oui	3	75	4	100
Non	1	25	0	0
Histoire familiale de cancer du sein				
Oui	1	25	4	100
Non	3	75	0	0

5.2.2 Méthylation globale de l'ADN et le risque de cancer du sein

Pour étudier le développement du cancer du sein, les mêmes analyses ont été réalisées, et la valeur de la médiane β a été calculée pour les primaires et les bénins en tenant compte de l'appariement. Une hyperméthylation globale de l'ADN pour les 4 primaires avec une médiane β de 0,488 a été observée par rapport aux bénins avec une médiane β égale à 0,478. Le RC n'a pas été calculé, car le nombre d'échantillons est trop petit. Alors, l'association entre la méthylation globale de l'ADN et le risque ne peut pas être illustrée (**Tableau 5.8**).

Aucune concordance n'a été remarquée entre les résultats de l'étude principale et ceux de l'étude secondaire concernant la méthylation globale de l'ADN.

Tableau 5.8 : La méthylation globale de l'ADN et le risque de cancer du sein.

# CpG loci	Médiane β Primaire	Médiane β Bénin	Test signé des rangs de Wilcoxon (valeur-p)	*RC (*IC à 95%)
406 910	0,488	0,478	1,000	NA

*RC : rapport de cotes

*IC : intervalle de confiance

NA : non applicable

5.2.3 Différence de la méthylation globale de l'ADN selon la localisation des CpGs

Par région CpG

La différence de la méthylation globale a été également étudiée selon les régions CpGs (**Tableau 5.9**). Pour les îlots « Island », une hypométhylation des primaires avec une valeur de médiane β de 0,069 a été observée par rapport aux bénins dont la médiane β égale à 0,072. Pour les autres régions CpGs, une hyperméthylation de l'ADN a dominé dans les « shelves, » les « shores » et les régions « OpenSea » chez les primaires par rapport aux bénins. Malgré la différence du niveau de méthylation tel que l'hypométhylation dans les îlots et l'hyperméthylation dans les autres régions CpGs, aucune association significative n'a été observée.

On remarque que les cas des deux études (principale et secondaire) présentent une hyperméthylation dans la région « S-shelf » ou une hypométhylation dans la région « S-shores » en comparaison des témoins.

Tableau 5.9 : La méthylation globale de l'ADN par région CpG et le cancer du sein.

Région CpG	# CpG loci	Médiane β Primaire	Médiane β Bénin	Test signé des rangs de Wilcoxon (valeur-p)
Island	137 226	0,069	0,072	0,625
N-shelf	19 466	0,732	0,730	0,875
N-shore	53 674	0,438	0,435	0,875
S-shelf	17 263	0,732	0,731	0,875
S-shore	42 104	0,409	0,404	0,625
Open Sea	137 177	0,706	0,703	0,625

Par localisation des régions génomiques

La différence de la méthylation globale entre les primaires et les bénins par localisation des régions génomiques a également été étudiée (**Tableau 5.10**). Une hypométhylation des CpGS du premier exon, 5'UTR, TSS200 ainsi que dans le promoteur a été observée chez les primaires en comparaison des bénins. D'autre part, une hyperméthylation de l'ADN globale a été observée dans les 3'UTR, corps du gène, TSS1500 et les régions intergéniques des primaires par rapport aux bénins. Les valeurs-p obtenues pour les différentes régions avec un test signé des rangs de Wilcoxon étaient $> 0,05$, et donc pas significatives.

On ne trouve aucune similarité entre les résultats de l'étude principale et l'étude secondaire pour la localisation des régions génomiques.

Tableau 5.10 : La méthylation globale de l'ADN par localisation des régions génomiques et le cancer du sein.

Régions Génomiques	# CpG loci	Médiane β Primaire	Médiane β Bénin	Test signé des rangs de Wilcoxon (valeur-p)
Premier exon	35 711	0,064	0,066	0,625
3'UTR	16 278	0,727	0,724	0,875
5'UTR	58 237	0,103	0,105	0,625
Corps du gène	146 995	0,677	0,674	0,875
TSS200	57 213	0,064	0,066	0,625
TSS1500	73 252	0,152	0,150	0,875
Promoteur	85 163	0,056	0,057	0,875
Intergénique	92 391	0,618	0,616	1,000

5.2.4 Identification des sites différenciellement méthylés reliés au développement du cancer du sein

En se référant à la valeur-p non ajustée et avec un seuil $< 0,001$, nous avons identifié les voies de signalisation, les fonctions et les maladies affectées par les gènes hypométhylés et hyperméthylés entre les cas (primaires) et les témoins (bénins). Après le filtrage, on a observé 67 gènes hypométhylés et 83 gènes hyperméthylés (**Tableau 5.11**) entre les primaires et les bénins. En annexe, on retrouve un tableau plus détaillé avec les gènes impliqués dans les différentes voies, fonctions et maladies (**Tableau 5.11.1**). Il est important de souligner que les gènes hypométhylés ont montré une forte association avec la voie de signalisation du cancer de la vessie, la communication entre les cellules immunitaires innées et adaptées ainsi que la voie de signalisation de carcinome basocellulaire (valeur-p= 0,021 ; 0,022 ; 0,015) respectivement. De plus, ces gènes ont été fortement impliqués dans la biochimie des petites molécules (valeur-p= 0,033) et l'interaction cellulaire (0,031) ainsi que dans le développement du cancer (valeur-p= 0,033), et les lésions organiques et anomalies (valeur-p= 0,033).

Dans la même veine, la dégradation de 4-aminobutyrate I (0,01) et d'alanine (0,007), la voie de présentation des antigènes (0,007) et la voie de développement de cellule B (0,006) représentent les voies de signalisation les plus affectées par les gènes

hyperméthylés. Ces gènes étaient impliqués dans plusieurs fonctions telles que la morphologie (valeur-p= 0,03) et l'interaction entre les cellules (valeur-p= 0,03) ainsi que dans le développement de plusieurs maladies tel que le cancer (valeur-p= 0,03) et la maladie neurologique (valeur-p= 0,026).

En plus, l'ensemble des gènes hypo-hyperméthylés se trouvent impliqués dans la maladie auto-immune de la thyroïde (valeur-p= 0,003) et la voie de signalisation du cancer de la vessie (valeur-p= 0,002). Plusieurs fonctions sont référées à ces gènes telles que l'interaction cellule-cellule (valeur-p= 0,018), la survie et la mort cellulaire (valeur-p= 0,017), de même que la maintenance et le fonctionnement cellulaire (valeur-p= 0,012). Tous ces gènes sont fortement impliqués dans le développement des lésions organiques et anomalies (valeur-p= 0,017), des maladies neurologiques (valeur-p= 0,017), des maladies gastro-intestinales (valeur-p= 0,017) et le développement du cancer (valeur-p= 0,017).

En comparant entre l'étude principale et l'étude secondaire, on ne trouve aucune voie de signalisation en commun. Cependant, on trouve que l'interaction cellulaire, la survie et la mort cellulaire ainsi que la maintenance et le fonctionnement cellulaire étaient parmi les fonctions affectées par l'ensemble des gènes dans nos deux études. Les deux études ont montré que les gènes affectés sont impliqués dans le développement de certaines maladies dont le cancer, les lésions organiques et anomalies et les maladies gastro-intestinales.

Tableau 5.11 : Diverses voies de signalisation, fonctions et maladies affectées par les gènes différentiellement méthylés entre les primaires et les bénins.

Gènes hypométhylés		Gènes hyperméthylés		Gènes hypo et hyperméthylés ensemble	
Voie de signalisation	Valeur-p	Voie de signalisation	Valeur-p	Voie de signalisation	Valeur-p
Communication entre les cellules immunitaires innées et adaptées (2)	0,0223	Dégradation de 4-aminobutyrate I (1)	0,00985	Pathologie de la phototransduction (3)	0,00376
Signalisation du cancer de la vessie (2)	0,0214	Voie de présentation des antigènes (2)	0,00697	Signalisation de la maladie de greffe vs hôte (3)	0,00283
Signalisation de carcinome basocellulaire (2)	0,0150	Dégradation d'alanine (1)	0,00658	Voie auto-immune de la maladie de thyroïde (3)	0,00267
Régulation de la voie de transition épithéliale-mésenchymateuse (3)	0,0130	Développement de cellule B (2)	0,00593	Signalisation du cancer de la vessie (4)	0,00174
Dégradation de la phényléthylamine I (1)	0,0103	Rôle de l'Oct4 dans les cellules souches pluripotentes embryonnaires de mammifères (2)	0,0101	Voie de présentation des antigènes (3)	0,00144
Fonction	Valeur-p*	Fonction	Valeur-p*	Fonction	Valeur-p*
Biochimie des petites molécules (16)	0,0331	Morphologie cellulaire (13)	0,0293	Interactions cellule-cellule (31)	0,0175
Interactions cellule-cellule (16)	0,0306	Interactions cellule-cellule (21)	0,0293	Règlement cellulaire (10)	0,0171
Métabolisme médicamenteux (7)	0,0306	Assemblage et organisation cellulaire (11)	0,0293	Survie et mort cellulaire (13)	0,0166
Présentation de l'antigène (CD8A)	0,00259	Biochimie des petites molécules (17)	0,0287	Modification post-traductionnelle (19)	0,0121
Mouvement cellulaire (16)	0,0258	Métabolisme médicamenteux (6)	0,0261	Maintenance et fonctionnement cellulaire (17)	0,0117
Maladies	Valeur-p*	Maladies	Valeur-p*	Maladies	Valeur-p*
Lésions organiques et anomalies (55)	0,0331	Maladie immunologique (6)	0,0293	Lésions organiques et anomalies (123)	0,0175
Cancer (54)	0,0331	Cancer (67)	0,0289	Maladie neurologique (34)	0,0175
Trouble du développement (13)	0,0331	Maladie hématologique (5)	0,0261	Cancer (121)	0,0169
Maladie gastro-intestinale (49)	0,0331	Maladie neurologique (20)	0,0261	Maladie gastro-intestinale (103)	0,0169
Maladie du système reproducteur (15)	0,0298	Maladie psychologique (11)	0,0198	Maladie psychologique (12)	0,0152

* La valeur-p le plus élevée

() Nombre des gènes impliqués de nos analyses

5.2.5 Identification des régions différentiellement méthylées liées au développement du cancer du sein

Pour identifier les régions différentiellement méthylées liées au développement du cancer du sein, on s'est référé à la valeur $FWER < 0,5$, dont six régions différentiellement

méthylées ont été observées. Ces régions étaient présentes sur les chromosomes 2, 6, 7, 8, 17 et 19. Parmi les gènes identifiés : *LCLAT1* (Lysocardiolipin Acyltransferase 1) sur le chromosome 2, *HLA-DPA1* (Major Histocompatibility Complex, Class II, DP Alpha 1) sur le chromosome 6, *JRK* (Jrk Helix-Turn-Helix Protein) sur le chromosome 8, *SLFN12* (Schlafen Family Member 12) sur le chromosome 17 et *HOOK2* (Hook Microtubule Tethering Protein 2) sur le chromosome 19 avec des FWER= 0,466; 0,484; 0,224; 0,353 et 0,409 respectivement. Il s'agit de gènes impliqués dans l'activité enzymatique (*LCLAT1*) (256), dans le système immunitaire (*HLA-DPA1*) (257), dans la liaison de l'ARNm (*JRK*) (258), la différenciation (*SLFN12*) (259), tandis que pour *HOOK2*, ce gène peut former le complexe FHF (*FTS/Hook/FHIP*) qui joue un rôle important dans la maintenance de la fonction du centrosome (260). Aucun gène sur le chromosome 7 n'a été identifié.

Aucune région différentiellement méthylée identique n'a été trouvée entre l'étude principale et l'étude secondaire, et donc aucun gène en commun.

5.3 Identification des gènes impliqués dans le développement d'un cancer du sein primaire et controlatéral par chevauchement des résultats entre les deux études.

Pour identifier s'il existe des gènes qui sont impliqués à la fois dans le développement d'un cancer du sein controlatéral et un cancer du sein primaire, nous avons regardé le chevauchement des résultats concernant les sites spécifiques différentiellement méthylés impliqués dans le développement d'un CSC et d'un cancer du sein. Étant donné qu'on n'a pas eu de chevauchement des résultats entre les deux études (Sections 5.1.4 et 5.2.4) avec une valeur-p < 0,001, on a relaxé le critère de la valeur-p afin de voir si on obtient un chevauchement de résultats entre les deux études avec une valeur-p < 0,005. Nous avons aussi identifié 9 sites qui ont été différentiellement méthylés avec un seuil de valeur-p non ajusté < 0,005 pour les deux études (Tableau 5.12). Parmi ces 9 sites, il y a deux sites hors gènes. Pour les 7 sites restants, le site cg20347665 se présente dans 2 gènes différents (*NHSL2* (NHS like 2) et *RGAG4* (Retrotransposon Gag Domain Containing 4)), alors au total nous avons identifié 8 gènes : *ELOVL6* (Fatty Acid Elongase 6), *DACT2* (Dapper Antagonist Of Catenin 2), *CARS2* (cysteinyl-tRNA synthetase 2), *LHX2* (LIM

Homeobox 2), *GABRA5* (gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit alpha 5), *RGAG4*, *NHSL2* et *ORP4/OSBP2* (Oxysterol Binding Protein 2). Tous les gènes identifiés sont des gènes hyperméthylés chez les controlatéraux par rapport aux primaires ou chez les primaires par rapport aux bénins avec un logFC positif. Cependant, une différence de niveau de méthylation a été remarquée entre les deux études. Ces gènes étaient plus hyperméthylés chez les primaires par rapport aux bénins que chez les controlatéraux par rapport aux primaires. Ces gènes sont impliqués dans diverses voies de signalisation. Parmi ces voies de signalisation affectées, on note le métabolisme des acides gras (*ELOVL6*) ([261](#)), la voie de Wnt/ β -catenin, le développement cellulaire (*DACT2*) ([262](#)), l'aminocyclation de l'ARNt, l'expression génique (*CARS2*) ([263](#)), la différenciation de la crête neurale (*LHX2*) ([264](#)), le transport par voie ionique et la transmission à travers les synapses chimiques (*GABRA5*) ([265](#)), la régulation de la dynamique de l'actine (*NHSL2*) ([266](#)) et la synthèse des acides biliaires et des sels biliaires (*ORP4/OSBP2*) ([267](#)).

Tableau 5.12 : Chevauchement des sites différentiellement méthylés entre les gènes impliqués dans le développement d'un cancer du sein controlatéral et d'un cancer du sein primaire.

Site CpG	Gène	Chr	log FC étude primaire	Valeur-p étude primaire	log FC étude secondaire	Valeur-p étude secondaire
cg03835987	<i>ELOVL6</i>	4	0,6121	0,00356	1,2968	0,00056
cg11238048	<i>DACT2</i>	6	0,4986	0,00132	1,0356	0,00085
cg00767116	<i>CARS2</i>	13	0,6478	0,00308	1,2296	0,00096
cg14425564	<i>LHX2</i>	9	1,0111	0,00005	1,1588	0,00102
cg03462380	<i>GABRA5</i>	15	0,5365	0,00211	0,9107	0,00177
cg20347665	<i>NHSL2</i>	X	0,5095	0,00251	0,7127	0,00194
cg00607058	<i>ORP4/OSBP2</i>	22	0,5873	0,00442	0,8033	0,00391

Chr : chromosome

Chapitre 6. Discussion et conclusion

6.1 Discussion

Dans cette étude, nous avons étudié la relation entre la méthylation globale de l'ADN et le risque de développer un cancer du sein controlatéral. Les analyses de méthylation ont été réalisées sur des tissus mammaires normaux fixés au formol et enrobés en paraffine majoritairement composée d'épithélium à bonne distance de la tumeur en utilisant la technique Illumina Infinium 450K. Nous avons observé une faible hypométhylation dans les tissus des femmes qui ont développé un CSC par rapport aux femmes qui ne l'ont pas développé bien que cette association n'était pas significative. Ce résultat est toutefois cohérent avec la littérature montrant qu'une hypométhylation globale de l'ADN circulant est impliquée dans l'augmentation du risque de développer un cancer du sein lorsque la même technologie pour mesurer la méthylation est utilisée (206). Des études montrent que la perte de méthylation de l'ADN peut favoriser l'instabilité chromosomique (268) ainsi que l'augmentation de la prolifération cellulaire par l'altération de l'expression des proto-oncogènes (269). Cette différenciation permet par la suite le développement d'un cancer. Cependant, notre étude secondaire qui a étudié l'effet de la méthylation globale de l'ADN dans le tissu mammaire normal sur le développement d'un cancer du sein a montré une hyperméthylation non significative dans les tissus des femmes avec un cancer du sein par rapport aux femmes sans cancer du sein, mais cette analyse était exploratoire, car nous ne disposions que de 4 paires d'échantillons.

La majorité des études qui ont étudié le niveau de la méthylation globale de l'ADN et son effet sur le risque de développer un cancer du sein étaient réalisées dans le sang (206-208, 213), étant donné que la perte de méthylation de l'ADN peut favoriser l'instabilité chromosomique ainsi qu'augmenter la prolifération cellulaire en altérant l'expression des proto-oncogènes (268, 269). Les études de la méthylation globale de l'ADN dans le sang reflètent l'état de méthylation globale du génome. Des études indiquent que l'hypométhylation génomique globale de l'ADN des leucocytes peut être un facteur de risque indépendant pour les types de cancer multiples tels que le cancer colorectal, de la tête et du cou et de la vessie, probablement en raison de l'instabilité génomique qui en résulte (270-273). Une hypométhylation globale de l'ADN chez les cas par rapport aux

témoins a été reliée à un risque élevé de développer un cancer du sein avec une association significative (206-208). D'autres études ont trouvé qu'une hyperméthylation globale des promoteurs est reliée à l'augmentation du risque de cancer du sein (207, 209), tandis que d'autres n'ont trouvé aucune association entre le niveau de la méthylation de l'ADN et le risque de cancer du sein (162, 210, 213, 214). Cependant, ces études sont réalisées sur des populations différentes ce qui peut expliquer la différence des résultats, car la race (ethnie) qui représente un facteur de risque de cancer du sein, et le niveau de la méthylation diffère aussi d'une population à l'autre. De plus, la plupart de ces études évaluent la "méthylation globale" comme étant la méthylation dans divers éléments répétitifs (tels que LINE-1, ALU et Sat2) et en utilisant différents types d'analyses et de techniques, ce qui rend difficile la comparaison des résultats entre les études (162, 176, 209, 210). Tel que mentionné à la **Section 1.6**, le sang contient différents types cellulaires pouvant aussi biaiser la mesure d'association.

Dans les analyses de l'étude principale qui étudie le risque de CSC, une hypométhylation dans les « shores » et les « N-shelves » des ilots CpGs et dans les régions « OpenSea » a été observée contrairement à l'hyperméthylation observée dans les « S-shelves » chez les femmes qui ont développé un CSC comparativement aux femmes qui ne l'ont pas développé (**Tableau 5.4**). À ce jour aucune étude n'a examiné la relation de la méthylation de l'ADN et le risque de CSC, mais nos résultats concordent avec l'hypométhylation des « shores » et des « shelves » observés dans le sang par *Veldhoven et al.* (206) dans le cancer du sein ainsi que par *Irizarry et al.* (274) dans le cancer colorectal. De plus, les « shores » semblent associés à l'hypométhylation et la surexpression des gènes reliés au cycle cellulaire dans le cancer (275). Toutefois, une autre étude n'a pas trouvé une association significative pour la méthylation des « islands » et des « shores » dans le sang et le cancer du sein (207) et cela peut être expliqué par hétérogénéité des biospécimens d'où l'ADN a été extrait. Dans nos données, l'état ou le niveau de méthylation pour les 3 catégories (controlatérales, primaires et bénins) était similaire pour les mêmes régions étudiées, par exemple les « islands » ont une faible méthylation (valeur β de 0,07) et les « N-shelves » une forte méthylation (valeur β de 0,7), ce qui signifie que nos mesures de méthylation sont valides.

Pour les régions génomiques, bien que non significatives, nous avons observé une hyperméthylation dans les TSS200 et les 5'UTR ainsi qu'une hypométhylation importante de 3'UTR, le corps du gène, et dans la région intergénique chez les femmes avec un CSC comparées aux femmes sans CSC. Nos résultats concordent avec ceux obtenus par *Van veldhoven et al.* (206) qui montrent une hypométhylation significative des CpGs présents dans le 3'UTR, le corps du gène, et dans la région intergénique et qui sont reliés à une augmentation du risque de cancer du sein.

Cette différence de méthylation supporte l'hypothèse que l'hypométhylation ne se limite pas aux éléments répétitifs, mais inclut toutes les zones du génome (275, 276). Alors, les régions hypométhylées telles que les « shores », les « S-shelves », les intergéniques et les 3'UTR constituent ces zones du génome qui sont riches en proto-oncogènes (206, 277, 278), dont l'activation de ces oncogènes par hypométhylation est associée au développement du cancer.

La méthylation des sites spécifiques selon leur localisation dans le gène est liée à l'activation ou l'inactivation de ces gènes ce qui affecte plusieurs voies de signalisation. En comparant les controlatéraux aux primaires, on a trouvé que les sites hypométhylés partagent plus de voies communes avec l'ensemble des sites (hypométhylés et hyperméthylés), telles que la voie de signalisation D1/AMPC/PKA/DARPP-32 et ATM qui sont reliés au développement d'un CSC. La voie de signalisation D1/AMPC/PKA/DARPP-32 affecte l'expression du gène *DARPP-32* (par phosphorylation) qui est surexprimée dans différents adénocarcinomes (du sein, de la prostate, du côlon et de l'estomac) (279-282). De plus, *DARPP-32* a été signalé comme jouant un rôle important dans la résistance des cellules tumorales au trastuzumab dans le cancer du sein (279, 283, 284). *Vangamudi B et al.*(285) ont aussi démontré que la surexpression de *DARPP-32* favorise la prolifération des cellules cancéreuses dans le cancer du sein. Dans la même veine, plusieurs études ont rapporté les fonctions pro-survie, pro-invasion et proangiogéniques de *DARPP-32* dans le cancer (286-289). En ce qui concerne la voie de signalisation ATM, celle-ci joue un rôle dans l'activation du gène suppresseur de tumeur *P53* et *BRCA1*. Cette voie est impliquée dans la réparation de l'ADN ainsi que dans le cycle cellulaire et l'apoptose (290). Une sous-expression du gène

ATM inhibe l'arrêt du cycle cellulaire qui assure la réparation de l'ADN, alors une croissance incontrôlée des cellules cancéreuses se produit (291, 292). Les mutations dans le gène *ATM* sont fréquentes dans plusieurs types de cancer tel que le cancer du sein, et deux études (175, 176) ont montré que l'hyperméthylation d'*ATM* dans le sang est associée à une augmentation du risque de CS.

En ce qui concerne les fonctions, les sites hyperméthylés sont les sites qui partagent plus de fonctions avec l'ensemble des sites différentiellement méthylés associés au développement du CSC, dont l'expression du gène, l'interaction cellulaire ainsi que la mort et la survie des cellules. Ces fonctions ont été mises en évidence lors de l'analyse des sites méthylés impliqués dans le développement du cancer du sein. Parmi celles-ci l'interaction cellulaire est importante pour la communication entre les cellules surtout qu'une des premières caractéristiques des cellules cancéreuses est qu'elles perdent l'interaction (293). De même, les fonctions telles que la mort et la survie des cellules ainsi que le fonctionnement et la maintenance cellulaire, sont essentielles pour le développement d'un cancer (294).

En plus des voies et des fonctions, les sites hypométhylés et/ou hyperméthylés associés au développement d'un CSC et d'un cancer du sein étaient impliqués dans le développement de plusieurs maladies telles que le cancer et les lésions organiques et anomalies, ce qui suggère que les sites identifiés (hypométhylés et hyperméthylés) sont situés dans des gènes qui sont importants dans le développement d'un CSC. Dans d'autres termes, la méthylation de l'ADN affecte différents gènes qui se trouvent impliqués dans le développement de diverse maladie. Donc, la méthylation de l'ADN est un phénomène assez important qui doit être étudié dans le cancer ainsi que dans d'autre maladie.

Bien qu'aucune région différentiellement méthylée n'a été observée à la fois dans l'étude primaire et l'étude secondaire, nous avons observé certaines régions méthylées associées au développement du CSC avec $FWER < 0,5$. Parmi celles-ci, nous avons trouvé des régions méthylées dans les gènes *CCDC108* et *HLA-DPB2*. *CCDC108* est un gène de cancer du sein dont son rôle est d'inhiber l'effet du *facteur de transcription mitochondrial humain A (TFAM)* qui favorise la croissance et l'invasion de la tumeur (295) *CCDC108* a une fonction inconnue, selon la base de données UNIPROT

(<http://www.uniprot.org/uniprot/Q6ZU64>), il s'agit d'une protéine membranaire composée de 1925 acides aminés, contenant un domaine MSP (protéine majeure du sperme). *CCDC108* est un gène exprimé dans les testicules et montre une expression différentielle au cours de la progression de la spermatogenèse (296). Cependant, *HLA-DPB2* représente un gène du système immunitaire qui code pour la chaîne β du récepteur peptide-antigène HLA-DP. C'est un gène de susceptibilité qui semble être impliqué dans l'augmentation du risque de développer un cancer cervical (255, 297, 298).

Dans nos analyses, aucune association significative après ajustement pour les comparaisons multiples n'a été observée entre les cas et les témoins. Cependant, 5 gènes (*ELOVL6*, *DACT2*, *LHX2*, *GABRA5* et *OSBP2*) ont été trouvés hyperméthylés dans les analyses de chevauchement des sites différentiellement méthylés reliés au développement d'un cancer du sein et d'un CSC. Les résultats sont appuyés par les données de la littérature. *ELOVL6* est un gène impliqué dans la résistance à l'insuline, obésité et lipogenèse (299, 300). Ce gène active la synthèse des acides gras qui est nécessaire pour la survie des tumeurs et la carcinogenèse (301). Dans la littérature, une étude a montré une surexpression d'*ELOVL6* dans le carcinome hépatocellulaire humain et l'implication de ce gène dans la carcinogenèse hépatique (302). La relation entre l'expression de *ELOVL6* et le cancer du sein est encore incertaine, mais son expression positive pourrait être un facteur pronostique chez les patientes atteintes de cancer du sein (303), dont l'expression positive d'*ELOVL6* est corrélée à une atteinte positive des ganglions lymphatiques et à une survie sans récurrence plus courte chez les patientes avec un CS. D'autre part, Wang S et al. (304) ont montré que *DACT2* est hyperméthylé dans 43,3% (29/67) des tissus de cancer du côlon, mais aucune méthylation n'était présente chez les tissus normaux. *DACT2* joue un rôle de suppresseur de tumeur dans le cancer du côlon par l'inhibition de la signalisation Wnt / β -caténine, mais l'hyperméthylation du promoteur de *DACT2* le rend inactif et par la suite diminue son expression (305). De même, une hyperméthylation de *DACT2* est présente dans le cancer du sein, cette méthylation active la voie de signalisation Wnt/ β -caténine, donc *DACT2* joue un rôle dans la répression de la croissance des cellules tumorales en induisant une apoptose cellulaire et en inhibant la prolifération cellulaire (306, 307). Dans la même veine, *LHX2* est un gène qui est impliqué dans le contrôle de la différenciation et de la prolifération des

cellules humaines (308) ainsi que dans l'embryogenèse chez les souris (309). *Kim MS. et al.* (310) ont montré une diminution de l'expression de *LHX2* suite à son hyperméthylation dans le tissu tumoral du cancer du sein par rapport au tissu normal chez les femmes. Plus précisément, *Rauscher et al.* (242) ont trouvé une hyperméthylation des introns en aval du promoteur du gène *LHX2* dans les tissus cancéreux du sein. De même, *Kuzmanov A et al.* (311) ont montré que *LHX2* favorise la croissance tumorale et la métastase dans les cellules cancéreuses du sein chez les femmes ainsi que chez les souris. Pour *GABRA5*, *Lambert MP et al.* (312) ont montré une hypométhylation de promoteur de *GABRA5* dans les carcinomes hépatocellulaires par rapport aux tissus adjacents, et proposent que l'augmentation de l'expression de *GABRA5* puisse favoriser le développement de ce dernier. Et finalement *OSBP2*, un gène qui fait partie d'une large famille impliquée dans le transport des stéroïdes et des lipides (313). *OSBP2* est aussi impliqué dans la différenciation des cellules cancéreuses (314, 315). Aucune information concernant l'état de méthylation d'*OSBP2* n'a été observé, mais *Henriques Silva et al.* (316) ont montré une forte expression chez les patients atteints de leucémie myéloïde chronique.

Notre étude possède des forces et des faiblesses. L'une des forces repose sur la sélection des tissus. Dans notre étude, nous avons choisi des femmes atteintes d'un cancer du sein avec et sans développement d'un CSC pour avoir des tissus mammaires normaux comparables par rapport à l'effet de champs. Ainsi, les tissus choisis sont affectés de la même manière par la présence de la tumeur, alors toute méthylation identifiée sera en relation avec le risque de CSC et non pas l'effet de la tumeur. De plus, notre étude cas-témoins était appariée pour les facteurs de risque importants tels que l'âge, l'histoire familiale de cancer du sein, l'histologie tumorale du PCS, le traitement d'hormonothérapie, le statut de ménopause, le statut HER2 au diagnostic du PCS pour éviter la confondance qui peut influencer ou biaiser nos résultats. De plus, on a apparié pour la date de chirurgie pour s'assurer que les tissus ont été traités de la même manière ainsi qu'enrobés dans la même paraffine. Sachant que la méthylation de l'ADN est un phénomène spécifique aux tissus, alors ce qui reflète la relation entre l'état de la méthylation de l'ADN et le risque d'un cancer c'est le niveau de la méthylation dans les cellules des tissus qui donnent naissance au cancer. Pour cela nous avons choisi d'étudier

le risque de cancer du sein dans les tissus mammaires normaux, en choisissant des zones constituant les cellules impliquées dans le développement du cancer du sein pour éviter d'avoir plusieurs constituants qui biaisent nos résultats sachant que chaque cellule possède son propre profil de méthylation. L'un des points forts de notre analyse est que nous avons construit des TMAs pour chaque patiente afin de rassembler toutes les zones constituées de cellules mammaires épithéliales normales. Cette technique nous permet d'assembler la quantité de cellules épithéliales désirées.

Nous avons choisi de regarder le niveau de la méthylation en utilisant la technique illumina 450K. Illumina 450K s'est avérée être la technique la plus valide et précise pour l'étude des variations de méthylation de l'ADN à l'échelle du génome dans les cancers humains ([206](#), [317-321](#)). Cette technique nous permet d'étudier le niveau de la méthylation de l'ADN extrait des tissus fixés au formol et enrobés en paraffine. L'utilisation de ces tissus a été validée pour étudier le niveau de la méthylation de l'ADN par illumina 450K suite à une réparation ou restauration de l'ADN par les kits de restauration et tel que présenté dans nos analyses ([244](#), [247](#), [322](#), [323](#)). Dans notre étude, nous avons travaillé avec des échantillons répliqués entre les plaques ainsi que dans la même plaque afin de valider la présence ou pas de l'effet « batch ». Suite aux analyses obtenues, nous avons trouvé que la disposition des échantillons dans les plaques ainsi que la différence de temps entre les envois n'avaient aucun effet sur les résultats ainsi que sur le niveau de la méthylation. Donc, dans notre étude nous avons essayé de minimiser tout effet ou risque d'effet qui pourra biaiser nos résultats.

Dans notre étude, nous ne pouvons pas définir totalement l'association entre la méthylation de l'ADN et le risque de CSC vu la petite taille d'échantillons, ce qui peut avoir induit un biais de sélection étant donné que les 20 patientes de CSC choisies ne sont pas en tous points comparables aux autres patientes avec CSC. En plus, la petite taille d'échantillons réduit la puissance de l'étude et augmente la variabilité technique et biologique, donc la différence de la méthylation globale observée ainsi que l'identification des différentes régions et gènes doivent être répliqués.

Notre étude est une étude unique qui étudie l'effet de la méthylation globale et spécifique de l'ADN dans les tissus mammaires normaux sur le risque de développer un CSC. Alors il n'existe pas d'études avec lesquelles on peut comparer nos résultats. Cependant, ce que

nous avons trouvé dans notre étude comme l'hypométhylation globale de l'ADN et la différence de la méthylation selon la localisation des CpGs associés au CSC concordent largement avec la littérature. Alors, la réalisation d'une étude avec une taille d'échantillons plus élevée est recommandée afin de valider si cette différence de méthylation globale et les gènes identifiés comme méthylés peuvent être utilisés comme cible de prévention pour les femmes avec un cancer du sein.

6.2 Conclusion

L'hypométhylation à l'échelle de l'épigénome de l'ADN à partir des tissus adjacents à la tumeur peut-être prédictive du risque de CSC. De plus l'hyperméthylation de gènes spécifiques tels que *CCDC108*, *ELOVL6*, *DACT2*, *LHX2*, *GABRA5* et *OSBP2* dans les tissus mammaires normaux peut donc être utile en tant que biomarqueur clinique du cancer du sein si cela était vérifié dans d'autres études comprenant des cohortes plus grandes et donc plus puissantes.

6.3 Perspective

Il serait bien d'étudier le niveau de méthylation des gènes *CCDC108*, *ELOVL6*, *DACT2*, *LHX2*, *GABRA5* et *OSBP2* dans les tissus normaux adjacents à la tumeur par d'autres techniques comme la « bisulfite sequencing PCR » dans une étude plus puissante. La réalisation de ces études sera importante et intéressante pour valider l'implication de ces gènes dans le développement d'un cancer du sein controlatéral. De plus, la réalisation des études fonctionnelles pour mieux comprendre l'effet de ses gènes sur le profil de cellules mammaires sera un atout. Par exemple, réaliser une surexpression de ces gènes dans des lignées de cellules épithéliales mammaires humaines non tumorales tels que les MCF-12A et MCF-10A. Ensuite, étudier l'effet de cette surexpression sur la prolifération cellulaire qui peut être évaluée par le dosage colorimétrique au MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) et par la coloration au violet de gentiane. Finalement, étudier l'effet de la méthylation de l'ADN sur le niveau d'expression des gènes ainsi qu'examiner la corrélation entre la méthylation de l'ADN de ces gènes et l'expression des protéines qui codent pour ces gènes pourra nous préciser leur implication dans le développement d'un cancer du sein controlatéral.

Bibliographies

1. Organisation mondiale de la Santé. Statistiques Sanitaires Mondiales Suisse 2012. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44857/1/9789242564440_fre.pdf.
2. IARC, Stewart BW, Wild CP. World Cancer Report 2014. Geneva: World Health Organization; 2014.
3. Coleman MP, Quaresma M, Berrino F, Lutz JM, De Angelis R, Capocaccia R, et al. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *The Lancet Oncology*. 2008;9(8):730-56.
4. Canadian Cancer Society's Advisory committee on Cancer Statistics. Canadian Cancer Statistics 2015. Toronto, ON: Canadian Cancer Society; 2015. Available from: <https://www.cancer.ca/~media/cancer.ca/CW/cancer%20information/cancer%20101/Canadian%20cancer%20statistics/Canadian-Cancer-Statistics-2015-EN.pdf>.
5. Tumeur bénigne: Définition: *Journal des Femmes Santé*; 2014. Available from: <http://sante-medecine.journaldesfemmes.com/faq/14309-tumeur-benigne-definition>.
6. Masson P. Tumeurs humaines: histologie; diagnostics et techniques: Maloine; 1968.
7. Mathers C, Fat DM, Boerma JT. The global burden of disease: 2004 update. Switzerland: World Health Organization; 2008. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43942/1/9789241563710_eng.pdf.
8. Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, Brenner H, et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol*. 2017;3(4):524-48.
9. Althuis MD, Dozier JM, Anderson WF, Devesa SS, Brinton LA. Global trends in breast cancer incidence and mortality 1973-1997. *International journal of epidemiology*. 2005;34(2):405-12.
10. Wooster R, Weber BL. Breast and ovarian cancer. *The New England journal of medicine*. 2003;348(23):2339-47.
11. Canadian Cancer Society's Advisory committee on Cancer Statistics. Canadian Cancer Statistics 2016. Toronto, ON: Canadian Cancer Society; 2016. Available from: <http://www.colorectal-cancer.ca/IMG/pdf/Canadian-Cancer-Statistics-2016-EN.pdf>.
12. Stewart BW, Kleihues P. *Le Cancer dans le Monde*. Lyon: IARC Press; 2005. Available from: <https://www.iarc.fr/fr/publications/pdfonline/wcr/2003/LeCancerdansleMonde.pdf>.
13. Wellings SR. A hypothesis of the origin of human breast cancer from the terminal ductal lobular unit. *Pathology, research and practice*. 1980;166(4):515-35.
14. Stirling JW, Chandler JA. The fine structure of the normal, resting terminal ductal-lobular unit of the female breast. *Virchows Archiv A, Pathological anatomy and histology*. 1976;372(3):205-26.
15. Wellings SR, Jensen HM. On the origin and progression of ductal carcinoma in the human breast. *Journal of the National Cancer Institute*. 1973;50(5):1111-8.
16. Cellule épithéliale - Définition: *Journal des Femmes Santé*; 2015. Available from: <http://sante-medecine.journaldesfemmes.com/faq/38371-cellule-epitheliale>.
17. Tavassoli FA, Devilee P. *Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs*: Iarc; 2003.

18. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-52.
19. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2002;347(25):1999-2009.
20. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(14):8418-23.
21. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004;10(16):5367-74.
22. Sioshansi S, Huber KE, Wazer DE. The implications of breast cancer molecular phenotype for radiation oncology. *Frontiers in oncology*. 2011;1:12.
23. Preston-Martin S, Pike MC, Ross RK, Jones PA, Henderson BE. Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer research*. 1990;50(23):7415-21.
24. EUROPA DONNA. Les recommandations européennes pour l'assurance de qualité dans le dépistage et le diagnostic du cancer du sein 1993. Available from: <http://www.europadonna.org/wp-content/uploads/shortguide-EG-French.pdf>.
25. Bolton JL. Menopausal Hormone Therapy, Age, and Chronic Diseases: Perspectives on Statistical Trends. *Chem Res Toxicol*. 2016;29(10):1583-90.
26. Slattery ML, Kerber RA. A comprehensive evaluation of family history and breast cancer risk. *The Utah Population Database*. *Jama*. 1993;270(13):1563-8.
27. Beroud C, Letovsky SI, Braastad CD, Caputo SM, Beaudoux O, Bignon YJ, et al. BRCA Share: A Collection of Clinical BRCA Gene Variants. *Hum Mutat*. 2016;37(12):1318-28.
28. Peng L, Xu T, Long T, Zuo H. Association Between BRCA Status and P53 Status in Breast Cancer: A Meta-Analysis. *Medical Science Monitor*. 2016;22:1939-45.
29. Nagrani R, Mhatre S, Rajaraman P, Soerjomataram I, Boffetta P, Gupta S, et al. Central obesity increases risk of breast cancer irrespective of menopausal and hormonal receptor status in women of South Asian Ethnicity. *Eur J Cancer*. 2016;66:153-61.
30. Carmichael AR. Obesity as a risk factor for development and poor prognosis of breast cancer. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*. 2006;113(10):1160-6.
31. Nkondjock A, Ghadirian P. Facteurs de risque du cancer du sein. *médecine/sciences*. 2005;21(2):175-80.
32. Fournier A, Hill C, Clavel-Chapelon F. Traitement hormonal substitutif de la ménopause et risque de cancer du sein. *Bulletin du cancer*. 2003;90(10):821-31.
33. Bandera EV, Chandran U, Zirpoli G, Ciupak G, Bovbjerg DH, Jandorf L, et al. Body size in early life and breast cancer risk in African American and European American women. *Cancer causes & control : CCC*. 2013;24(12):2231-43.
34. Chen Y, Thompson W, Semenciw R, Mao Y. Epidemiology of contralateral breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1999;8(10):855-61.
35. Ko A. Everyone's guide to cancer therapy: How cancer is diagnosed, treated, and managed day to day: Andrews McMeel Publishing; 2009.
36. Burstein H, Harris J, Morrow M. Malignant tumors of the breast. Local management of invasive cancer. *Principles and Practice of Oncology*. 11620-5.

37. Fisher B. The evolution of paradigms for the management of breast cancer: a personal perspective. *Cancer research*. 1992;52(9):2371-83.
38. M E. Les seconds cancers après cancer du sein: Centre des maladies du sein. Available from: http://centre-maladies-sein-saint-louis.org/formations/presentations/presentations_hors_DU_pdf/2e_cancers_apres_k_sein.pdf.
39. Gao X, Fisher SG, Emami B. Risk of second primary cancer in the contralateral breast in women treated for early-stage breast cancer: a population-based study. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2003;56(4):1038-45.
40. Langlands F, White J, Kearins O, Cheung S, Burns R, Horgan K, et al. Contralateral breast cancer: incidence according to ductal or lobular phenotype of the primary. *Clinical radiology*. 2016;71(2):159-63.
41. van den Broek AJ, van 't Veer LJ, Hooning MJ, Cornelissen S, Broeks A, Rutgers EJ, et al. Impact of Age at Primary Breast Cancer on Contralateral Breast Cancer Risk in BRCA1/2 Mutation Carriers. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;34(5):409-18.
42. Drooger JC, Akdeniz D, Pignol JP, Koppert LB, McCool D, Seynaeve CM, et al. Adjuvant radiotherapy for primary breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers and risk of contralateral breast cancer with special attention to patients irradiated at younger age. *Breast cancer research and treatment*. 2015;154(1):171-80.
43. Shankar A, Roy S, Malik A, Kamal VK, Bhandari R, Kishor K, et al. Contralateral breast cancer: a clinico-pathological study of second primaries in opposite breasts after treatment of breast malignancy. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2015;16(3):1207-11.
44. de Glas NA, Engels CC, Bastiaannet E, van de Water W, Siesling S, de Craen AJ, et al. Contralateral breast cancer risk in relation to tumor morphology and age-in which patients is preoperative MRI justified? *Breast cancer research and treatment*. 2015;150(1):191-8.
45. Basu NN, Ingham S, Hodson J, Lalloo F, Bulman M, Howell A, et al. Risk of contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a 30-year semi-prospective analysis. *Familial cancer*. 2015;14(4):531-8.
46. Rusner C, Wolf K, Bandemer-Greulich U, Engel J, Stegmaier C, Holleczeck B, et al. Risk of contralateral second primary breast cancer according to hormone receptor status in Germany. *Breast cancer research : BCR*. 2014;16(5):452.
47. Font-Gonzalez A, Liu L, Voogd AC, Schmidt MK, Roukema JA, Coebergh JW, et al. Inferior survival for young patients with contralateral compared to unilateral breast cancer: a nationwide population-based study in the Netherlands. *Breast cancer research and treatment*. 2013;139(3):811-9.
48. Sandberg ME, Hall P, Hartman M, Johansson AL, Eloranta S, Ploner A, et al. Estrogen receptor status in relation to risk of contralateral breast cancer-a population-based cohort study. *PLoS One*. 2012;7(10):e46535.
49. Vichapat V, Gillett C, Fentiman IS, Tutt A, Holmberg L, Lichtenborg M. Risk factors for metachronous contralateral breast cancer suggest two aetiological pathways. *Eur J Cancer*. 2011;47(13):1919-27.
50. Nichols HB, Berrington de Gonzalez A, Lacey JV, Jr., Rosenberg PS, Anderson WF. Declining incidence of contralateral breast cancer in the United States from 1975 to 2006. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(12):1564-9.

51. Bessonova L, Taylor TH, Mehta RS, Zell JA, Anton-Culver H. Risk of a second breast cancer associated with hormone-receptor and HER2/neu status of the first breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20(2):389-96.
52. Metcalfe K, Lynch HT, Ghadirian P, Tung N, Olivotto I, Warner E, et al. Contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2004;22(12):2328-35.
53. Bernstein JL, Lapinski RH, Thakore SS, Doucette JT, Thompson WD. The descriptive epidemiology of second primary breast cancer. *Epidemiology.* 2003;14(5):552-8.
54. Li CI, Malone KE, Porter PL, Daling JR. Epidemiologic and molecular risk factors for contralateral breast cancer among young women. *British journal of cancer.* 2003;89(3):513-8.
55. Volk N, Pompe-Kirn V. Second primary cancers in breast cancer patients in Slovenia. *Cancer causes & control : CCC.* 1997;8(5):764-70.
56. Broet P, de la Rochefordiere A, Scholl SM, Fourquet A, Mosseri V, Durand JC, et al. Contralateral breast cancer: annual incidence and risk parameters. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 1995;13(7):1578-83.
57. Rutqvist LE, Johansson H, Signomklao T, Johansson U, Fornander T, Wilking N. Adjuvant tamoxifen therapy for early stage breast cancer and second primary malignancies. Stockholm Breast Cancer Study Group. *Journal of the National Cancer Institute.* 1995;87(9):645-51.
58. Brenner H, Siegle S, Stegmaier C, Ziegler H. Second primary neoplasms following breast cancer in Saarland, Germany, 1968-1987. *Eur J Cancer.* 1993;29a(10):1410-4.
59. Bernstein JL, Thompson WD, Risch N, Holford TR. Risk factors predicting the incidence of second primary breast cancer among women diagnosed with a first primary breast cancer. *American journal of epidemiology.* 1992;136(8):925-36.
60. Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy. 133 randomised trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet (London, England).* 1992;339(8785):71-85.
61. Rutqvist LE, Cedermark B, Glas U, Mattsson A, Skoog L, Somell A, et al. Contralateral primary tumors in breast cancer patients in a randomized trial of adjuvant tamoxifen therapy. *Journal of the National Cancer Institute.* 1991;83(18):1299-306.
62. Fisher B, Costantino J, Redmond C, Poisson R, Bowman D, Couture J, et al. A randomized clinical trial evaluating tamoxifen in the treatment of patients with node-negative breast cancer who have estrogen-receptor-positive tumors. *The New England journal of medicine.* 1989;320(8):479-84.
63. Fisher ER, Fisher B, Sass R, Wickerham L. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (Protocol No. 4). XI. Bilateral breast cancer. *Cancer.* 1984;54(12):3002-11.
64. Fornander T, Rutqvist LE, Cedermark B, Glas U, Mattsson A, Silfversward C, et al. Adjuvant tamoxifen in early breast cancer: occurrence of new primary cancers. *Lancet (London, England).* 1989;1(8630):117-20.
65. Kurtz JM, Amalric R, Brandone H, Ayme Y, Spitalier JM. Contralateral breast cancer and other second malignancies in patients treated by breast-conserving therapy with radiation. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 1988;15(2):277-84.
66. Cyclophosphamide and tamoxifen as adjuvant therapies in the management of breast cancer. CRC Adjuvant Breast Trial Working Party. *British journal of cancer.* 1988;57(6):604-7.

67. Murakami R, Hiyama T, Hanai A, Fujimoto I. Second primary cancers following female breast cancer in Osaka, Japan--a population-based cohort study. *Japanese journal of clinical oncology*. 1987;17(4):293-302.
68. Harvey EB, Brinton LA. Second cancer following cancer of the breast in Connecticut, 1935-82. *National Cancer Institute monograph*. 1985;68:99-112.
69. Webber BL, Heise H, Neifeld JP, Costa J. Risk of subsequent contralateral breast carcinoma in a population of patients with in-situ breast carcinoma. *Cancer*. 1981;47(12):2928-32.
70. Prior P, Waterhouse JA. Incidence of bilateral tumours in a population-based series of breast-cancer patients. I. Two approaches to an epidemiological analysis. *British journal of cancer*. 1978;37(4):620-34.
71. Robbins GF, Berg JW. BILATERAL PRIMARY BREAST CANCER; A PROSPECTIVE CLINICOPATHOLOGICAL STUDY. *Cancer*. 1964;17:1501-27.
72. Bernstein JL, Thompson WD, Risch N, Holford TR. The genetic epidemiology of second primary breast cancer. *American journal of epidemiology*. 1992;136(8):937-48.
73. Sisti JS, Bernstein JL, Lynch CF, Reiner AS, Mellekjaer L, Brooks JD, et al. Reproductive factors, tumor estrogen receptor status and contralateral breast cancer risk: results from the WECARE study. *SpringerPlus*. 2015;4:8-25.
74. Reiner AS, John EM, Brooks JD, Lynch CF, Bernstein L, Mellekjaer L, et al. Risk of asynchronous contralateral breast cancer in noncarriers of BRCA1 and BRCA2 mutations with a family history of breast cancer: a report from the Women's Environmental Cancer and Radiation Epidemiology Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(4):433-9.
75. Saltzman BS, Malone KE, McDougall JA, Daling JR, Li CI. Estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2-neu expression in first primary breast cancers and risk of second primary contralateral breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2012;135(3):849-55.
76. Malone KE, Begg CB, Haile RW, Borg A, Concannon P, Tellhed L, et al. Population-based study of the risk of second primary contralateral breast cancer associated with carrying a mutation in BRCA1 or BRCA2. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(14):2404-10.
77. Li CI, Daling JR, Porter PL, Tang MT, Malone KE. Relationship between potentially modifiable lifestyle factors and risk of second primary contralateral breast cancer among women diagnosed with estrogen receptor-positive invasive breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(32):5312-8.
78. Cook LS, White E, Schwartz SM, McKnight B, Daling JR, Weiss NS. A population-based study of contralateral breast cancer following a first primary breast cancer (Washington, United States). *Cancer causes & control : CCC*. 1996;7(3):382-90.
79. Storm HH, Andersson M, Boice JD, Jr., Blettner M, Stovall M, Mouridsen HT, et al. Adjuvant radiotherapy and risk of contralateral breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 1992;84(16):1245-50.
80. Boice JD, Jr., Harvey EB, Blettner M, Stovall M, Flannery JT. Cancer in the contralateral breast after radiotherapy for breast cancer. *The New England journal of medicine*. 1992;326(12):781-5.

81. Horn PL, Thompson WD. Risk of contralateral breast cancer. Associations with histologic, clinical, and therapeutic factors. *Cancer*. 1988;62(2):412-24.
82. Horn PL, Thompson WD, Schwartz SM. Factors associated with the risk of second primary breast cancer: an analysis of data from the Connecticut Tumor Registry. *Journal of chronic diseases*. 1987;40(11):1003-11.
83. Kato I, Miura S, Yoshida M, Tominaga S. Risk factors of multiple primary cancers in breast cancer patients. *Japanese journal of cancer research : Gann*. 1986;77(3):296-304.
84. Hislop TG, Elwood JM, Coldman AJ, Spinelli JJ, Worth AJ, Ellison LG. Second primary cancers of the breast: incidence and risk factors. *British journal of cancer*. 1984;49(1):79-85.
85. Waddington CH. The epigenotype. 1942. *International journal of epidemiology*. 2012;41(1):10-3.
86. Kanwal R, Gupta K, Gupta S. Cancer epigenetics: an introduction. *Methods Mol Biol*. 2015;1238:3-25.
87. Probst AV, Dunleavy E, Almouzni G. Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(3):192-206.
88. Kheir TB, Lund AH. Epigenetic dynamics across the cell cycle. *Essays in biochemistry*. 2010;48:107-20.
89. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
90. Esteller M. Epigenetics in cancer. *The New England journal of medicine*. 2008;358(11):1148-59.
91. Shen H, Laird PW. Interplay between the cancer genome and epigenome. *Cell*. 2013;153(1):38-55.
92. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Molecular cell biology* 4th edition. Section 24.2, Proto-Oncogenes and Tumor-Suppressor Genes. New York 2000.
93. Biswas S, Rao CM. Epigenetics in cancer: Fundamentals and Beyond. *Pharmacol Ther*. 2017;173:118-34.
94. Rodriguez H, El-Osta A. The epigenetic contribution to the development and progression of vascular diabetic complications. *Antioxid Redox Signal*. 2018.
95. Aref-Eshghi E, Rodenhiser DI, Schenkel LC, Lin H, Skinner C, Ainsworth P, et al. Genomic DNA Methylation Signatures Enable Concurrent Diagnosis and Clinical Genetic Variant Classification in Neurodevelopmental Syndromes. *Am J Hum Genet*. 2018;102(1):156-74.
96. Liu KY, Wang LT, Hsu SH. Modification of Epigenetic Histone Acetylation in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2018;10(1).
97. Porkka N, Valo S, Nieminen TT, Olkinuora A, Maki-Nevala S, Eldfors S, et al. Sequencing of Lynch syndrome tumors reveals the importance of epigenetic alterations. *Oncotarget*. 2017;8(64):108020-30.
98. Herceg Z, Ushijima T. Introduction: epigenetics and cancer. *Advances in genetics*. 2010;70:1-23.
99. Pereira V, Ferrier J, Balayssac D, Libert F, Busserolles J. Mécanismes épigénétiques impliqués dans la douleur chronique. *Douleur et Analgésie*. 2013;26(4):234-40.
100. Lin JC, Jeong S, Liang G, Takai D, Fatemi M, Tsai YC, et al. Role of nucleosomal occupancy in the epigenetic silencing of the MLH1 CpG island. *Cancer Cell*. 2007;12(5):432-44.
101. Kouzarides T. SnapShot: Histone-modifying enzymes. *Cell*. 2007;131(4):822.

102. Wysocka J, Swigut T, Xiao H, Milne TA, Kwon SY, Landry J, et al. A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature*. 2006;442(7098):86-90.
103. Saito Y, Jones PA. Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs in human cancer cells. *Cell Cycle*. 2006;5(19):2220-2.
104. Jiang C, Pugh BF. Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. *Nat Rev Genet*. 2009;10(3):161-72.
105. Gal-Yam EN, Jeong S, Tanay A, Egger G, Lee AS, Jones PA. Constitutive nucleosome depletion and ordered factor assembly at the GRP78 promoter revealed by single molecule footprinting. *PLoS Genet*. 2006;2(9):e160.
106. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136(2):215-33.
107. Friedman JM, Liang G, Liu CC, Wolff EM, Tsai YC, Ye W, et al. The putative tumor suppressor microRNA-101 modulates the cancer epigenome by repressing the polycomb group protein EZH2. *Cancer research*. 2009;69(6):2623-9.
108. Ulitsky I, Shkumatava A, Jan CH, Sive H, Bartel DP. Conserved function of lincRNAs in vertebrate embryonic development despite rapid sequence evolution. *Cell*. 2011;147(7):1537-50.
109. Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, Maeda N, et al. The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science*. 2005;309(5740):1559-63.
110. Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, Guigo R, Gingeras TR, Margulies EH, et al. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature*. 2007;447(7146):799-816.
111. Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet*. 2008;9(6):465-76.
112. Fernandez AF, Assenov Y, Martin-Subero JI, Balint B, Siebert R, Taniguchi H, et al. A DNA methylation fingerprint of 1628 human samples. *Genome research*. 2012;22(2):407-19.
113. Razin A, Kantor B. DNA methylation in epigenetic control of gene expression. *Progress in molecular and subcellular biology*. 2005;38:151-67.
114. Falnes PO, Rognes T. DNA repair by bacterial AlkB proteins. *Research in microbiology*. 2003;154(8):531-8.
115. Reisenauer A, Kahng LS, McCollum S, Shapiro L. Bacterial DNA methylation: a cell cycle regulator? *Journal of bacteriology*. 1999;181(17):5135-9.
116. Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *Journal of molecular biology*. 1987;196(2):261-82.
117. Siegfried Z, Simon I. DNA methylation and gene expression. *Wiley interdisciplinary reviews Systems biology and medicine*. 2010;2(3):362-71.
118. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & development*. 2002;16(1):6-21.
119. Wang Y, Leung FC. An evaluation of new criteria for CpG islands in the human genome as gene markers. *Bioinformatics*. 2004;20(7):1170-7.
120. Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(6):3740-5.
121. Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends in biochemical sciences*. 2006;31(2):89-97.

122. Uysal F, Akkoyunlu G, Ozturk S. DNA methyltransferases exhibit dynamic expression during spermatogenesis. *Reproductive biomedicine online*. 2016;33(6):690-702.
123. Wang Y, Sen GL. Enhanc(er)ing Skin Stem Cells. *Cell stem cell*. 2016;19(4):415-7.
124. Jin B, Robertson KD. DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer. *Advances in experimental medicine and biology*. 2013;754:3-29.
125. Karetka MS, Botello ZM, Ennis JJ, Chou C, Chedin F. Reconstitution and mechanism of the stimulation of de novo methylation by human DNMT3L. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(36):25893-902.
126. Chen ZX, Mann JR, Hsieh CL, Riggs AD, Chedin F. Physical and functional interactions between the human DNMT3L protein and members of the de novo methyltransferase family. *Journal of cellular biochemistry*. 2005;95(5):902-17.
127. Abramowitz LK, Bartolomei MS. Genomic imprinting: recognition and marking of imprinted loci. *Current opinion in genetics & development*. 2012;22(2):72-8.
128. Jackson-Grusby L, Beard C, Possemato R, Tudor M, Fambrough D, Csankovszki G, et al. Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation. *Nature genetics*. 2001;27(1):31-9.
129. Prendergast GC, Ziff EB. Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-Myc basic region. *Science*. 1991;251(4990):186-9.
130. Rodriguez-Paredes M, Esteller M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nature medicine*. 2011;17(3):330-9.
131. Sandoval J, Esteller M. Cancer epigenomics: beyond genomics. *Current opinion in genetics & development*. 2012;22(1):50-5.
132. You JS, Jones PA. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? *Cancer Cell*. 2012;22(1):9-20.
133. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. 2002;3(6):415-28.
134. Baylin SB. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nature clinical practice Oncology*. 2005;2 Suppl 1:S4-11.
135. Andrew P. Feinberg. Reduced Genomic 5-Methylcytosine Content in Human Colonic Neoplasia. *Cancer research*. 1988;48(5):1159-61.
136. Rodriguez J, Frigola J, Vendrell E, Risques RA, Fraga MF, Morales C, et al. Chromosomal instability correlates with genome-wide DNA demethylation in human primary colorectal cancers. *Cancer research*. 2006;66(17):8462-9468.
137. Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends in genetics : TIG*. 1997;13(8):335-40.
138. Feinberg AP. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*. 1983;301(5895):89-92.
139. Romagnolo DF, Papoutsis AJ, Laukaitis C, Selmin OI. Constitutive expression of AhR and BRCA-1 promoter CpG hypermethylation as biomarkers of ERalpha-negative breast tumorigenesis. *BMC cancer*. 2015;15:1026.
140. Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, et al. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000;92(7):564-9.

141. Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Human molecular genetics*. 2001;10(7):687-92.
142. Momparler RL. Cancer epigenetics. *Oncogene*. 2003;22(42):6479-83.
143. Bhattacharya SK, Ramchandani S, Cervoni N, Szyf M. A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature*. 1999;397(6720):579-83.
144. Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(1):37-50.
145. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 2004;429(6990):457-63.
146. Kaminskis E, Farrell AT, Wang YC, Sridhara R, Pazdur R. FDA drug approval summary: azacitidine (5-azacytidine, Vidaza) for injectable suspension. *The oncologist*. 2005;10(3):176-82.
147. Kantarjian HM, O'Brien S, Shan J, Aribi A, Garcia-Manero G, Jabbour E, et al. Update of the decitabine experience in higher risk myelodysplastic syndrome and analysis of prognostic factors associated with outcome. *Cancer*. 2007;109(2):265-73.
148. Villar-Garea A, Esteller M. DNA demethylating agents and chromatin-remodelling drugs: which, how and why? *Current drug metabolism*. 2003;4(1):11-31.
149. Robak T. New nucleoside analogs for patients with hematological malignancies. *Expert opinion on investigational drugs*. 2011;20(3):343-59.
150. Beisler JA. Isolation, characterization, and properties of a labile hydrolysis product of the antitumor nucleoside, 5-azacytidine. *Journal of medicinal chemistry*. 1978;21(2):204-8.
151. Brueckner B, Lyko F. DNA methyltransferase inhibitors: old and new drugs for an epigenetic cancer therapy. *Trends in pharmacological sciences*. 2004;25(11):551-4.
152. Kéita M. Analyse globale des altérations aberrantes de la méthylation de l'ADN dans le cancer de l'ovaire: These de doctorat. Université Laval; 2013.
153. Wu L, Shen Y, Peng X, Zhang S, Wang M, Xu G, et al. Aberrant promoter methylation of cancer-related genes in human breast cancer. *Oncology letters*. 2016;12(6):5145-55.
154. Zohny SF, Baothman OA, El-Shinawi M, Al-Malki AL, Zamzami MA, Choudhry H. The KIP/CIP family members p21^{Waf1/Cip1} and p57^{Kip2} as diagnostic markers for breast cancer. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*. 2017;18(4):413-23.
155. Hoque MO, Feng Q, Toure P, Dem A, Critchlow CW, Hawes SE, et al. Detection of aberrant methylation of four genes in plasma DNA for the detection of breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(26):4262-9.
156. Radpour R, Barekati Z, Kohler C, Lv Q, Burki N, Diesch C, et al. Hypermethylation of tumor suppressor genes involved in critical regulatory pathways for developing a blood-based test in breast cancer. *PLoS One*. 2011;6(1):e16080.
157. Dulaimi E, Hillinck J, Ibanez de Caceres I, Al-Saleem T, Cairns P. Tumor suppressor gene promoter hypermethylation in serum of breast cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004;10(18 Pt 1):6189-93.
158. Van der Auwera I, Elst HJ, Van Laere SJ, Maes H, Huget P, van Dam P, et al. The presence of circulating total DNA and methylated genes is associated with circulating tumour cells in blood from breast cancer patients. *British journal of cancer*. 2009;100(8):1277-86.

159. Swellam M, Abdelmaksoud MD, Sayed Mahmoud M, Ramadan A, Abdel-Moneem W, Hefny MM. Aberrant methylation of APC and RAR β 2 genes in breast cancer patients. *Iubmb Life*. 2015;67(1):61-8.
160. Zmetakova I, Danihel L, Smolkova B, Mego M, Kajabova V, Krivulcik T, et al. Evaluation of protein expression and DNA methylation profiles detected by pyrosequencing in invasive breast cancer. *Neoplasma*. 2013;60(6):635-46.
161. Brooks JD, Cairns P, Shore RE, Klein CB, Wirgin I, Afanasyeva Y, et al. DNA methylation in pre-diagnostic serum samples of breast cancer cases: results of a nested case-control study. *Cancer Epidemiol*. 2010;34(6):717-23.
162. CHO YH. Aberrant Promoter Hypermethylation and Genomic Hypomethylation in Tumor, Adjacent Normal Tissues and Blood from Breast Cancer Patients. *Anticancer research*. 2010;30(7):2489-96.
163. Kim J-H, Shin M-H, Kweon S-S, Park MH, Yoon JH, Lee JS, et al. Evaluation of promoter hypermethylation detection in serum as a diagnostic tool for breast carcinoma in Korean women. *Gynecologic oncology*. 2010;118(2):176-81.
164. Cho YH, McCullough LE, Gammon MD, Wu HC, Zhang YJ, Wang Q, et al. Promoter Hypermethylation in White Blood Cell DNA and Breast Cancer Risk. *Journal of Cancer*. 2015;6(9):819-24.
165. Iwamoto T, Yamamoto N, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. BRCA1 promoter methylation in peripheral blood cells is associated with increased risk of breast cancer with BRCA1 promoter methylation. *Breast cancer research and treatment*. 2011;129(1):69-77.
166. Wong EM, Southey MC, Fox SB, Brown MA, Dowty JG, Jenkins MA, et al. Constitutional methylation of the BRCA1 promoter is specifically associated with BRCA1 mutation-associated pathology in early-onset breast cancer. *Cancer Prevention Research*. 2011;4(1):23-33.
167. Snell C, Krypuy M, Wong EM, Loughrey MB, Dobrovic A. BRCA1 promoter methylation in peripheral blood DNA of mutation negative familial breast cancer patients with a BRCA1 tumour phenotype. *Breast Cancer Research*. 2008;10(1):R12.
168. Bosviel R, Garcia S, Lavediaux G, Michard E, Dravers M, Kwiatkowski F, et al. BRCA1 promoter methylation in peripheral blood DNA was identified in sporadic breast cancer and controls. *Cancer epidemiology*. 2012;36(3):e177-e82.
169. Gupta S, Jaworska-Bieniek K, Narod SA, Lubinski J, Wojdacz TK, Jakubowska A. Methylation of the BRCA1 promoter in peripheral blood DNA is associated with triple-negative and medullary breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2014;148(3):615-22.
170. Liu L, Sun L, Li C, Li X, Zhang Y, Yu Y, et al. Quantitative detection of methylation of FHIT and BRCA1 promoters in the serum of ductal breast cancer patients. *Bio-medical materials and engineering*. 2015;26(s1):S2217-S22.
171. Kloten V, Becker B, Winner K, Schrauder MG, Fasching PA, Anzeneder T, et al. Promoter hypermethylation of the tumor-suppressor genes ITIH5, DKK3, and RASSF1A as novel biomarkers for blood-based breast cancer screening. *Breast Cancer Research*. 2013;15(1):R4.
172. Ahmed IA, Pusch CM, Hamed T, Rashad H, Idris A, El-Fadle AA, et al. Epigenetic alterations by methylation of RASSF1A and DAPK1 promoter sequences in mammary carcinoma detected in extracellular tumor DNA. *Cancer genetics and cytogenetics*. 2010;199(2):96-100.

173. Yazici H, Terry MB, Cho YH, Senie RT, Liao Y, Andrulis I, et al. Aberrant methylation of RASSF1A in plasma DNA before breast cancer diagnosis in the Breast Cancer Family Registry. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2009;18(10):2723-5.
174. Papadopoulou E, Davilas E, Sotiriou V, Georgakopoulos E, Georgakopoulou S, Koliopoulos A, et al. Cell-free DNA and RNA in Plasma as a New Molecular Marker for Prostate and Breast Cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1075(1):235-43.
175. Flanagan JM, Munoz-Alegre M, Henderson S, Tang T, Sun P, Johnson N, et al. Gene-body hypermethylation of ATM in peripheral blood DNA of bilateral breast cancer patients. *Human molecular genetics*. 2009;18(7):1332-42.
176. Brennan K, Garcia-Closas M, Orr N, Fletcher O, Jones M, Ashworth A, et al. Intragenic ATM methylation in peripheral blood DNA as a biomarker of breast cancer risk. *Cancer research*. 2012;72(9):2304-13.
177. Matsui S, Kagara N, Mishima C, Naoi Y, Shimoda M, Shimomura A, et al. Methylation of the SEPT9_v2 promoter as a novel marker for the detection of circulating tumor DNA in breast cancer patients. *Oncology reports*. 2016;36(4):2225-35.
178. Martínez-Galán J, Torres B, del Moral R, Muñoz-Gómez JA, Martín-Oliva D, Villalobos M, et al. Quantitative detection of methylated ESR1 and 14-3-3- σ gene promoters in serum as candidate biomarkers for diagnosis of breast cancer and evaluation of treatment efficacy. *Cancer biology & therapy*. 2008;7(6):958-65.
179. Zurita M, Lara PC, del Moral R, Torres B, Linares-Fernández JL, Arrabal SR, et al. Hypermethylated 14-3-3- σ and ESR1 gene promoters in serum as candidate biomarkers for the diagnosis and treatment efficacy of breast cancer metastasis. *BMC cancer*. 2010;10(1):217.
180. Chimonidou M, Tzitzira A, Strati A, Sotiropoulou G, Sfikas C, Malamos N, et al. CST6 promoter methylation in circulating cell-free DNA of breast cancer patients. *Clinical biochemistry*. 2013;46(3):235-40.
181. Widschwendter M, Apostolidou S, Raum E, Rothenbacher D, Fiegl H, Menon U, et al. Epigenotyping in peripheral blood cell DNA and breast cancer risk: a proof of principle study. *PLoS One*. 2008;3(7):e2656.
182. Harrison K, Hoad G, Scott P, Simpson L, Horgan GW, Smyth E, et al. Breast cancer risk and imprinting methylation in blood. *Clin Epigenetics*. 2015;7:92.
183. Ito Y, Koessler T, Ibrahim AE, Rai S, Vowler SL, Abu-Amero S, et al. Somatic acquired hypomethylation of IGF2 in breast and colorectal cancer. *Human molecular genetics*. 2008;17(17):2633-43.
184. Baldwin RM, Bejide M, Trinkle-Mulcahy L, Cote J. Identification of the PRMT1v1 and PRMT1v2 specific interactomes by quantitative mass spectrometry in breast cancer cells. *Proteomics*. 2015;15(13):2187-97.
185. Tang Q, Holland-Letz T, Slynko A, Cuk K, Marme F, Schott S, et al. DNA methylation array analysis identifies breast cancer associated - RPTOR, MGRN1 and RAPS N hypomethylation in peripheral blood DNA. *Oncotarget*. 2016;7(39):64191.
186. Dumitrescu RG, Marian C, Krishnan SS, Spear SL, Kallakury BV, Perry DJ, et al. Familial and racial determinants of tumour suppressor genes promoter hypermethylation in breast tissues from healthy women. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2010;14(6b):1468-75.
187. Lewis CM, Cler LR, Bu DW, Zochbauer-Muller S, Milchgrub S, Naftalis EZ, et al. Promoter hypermethylation in benign breast epithelium in relation to predicted breast cancer risk.

Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2005;11(1):166-72.

188. Locke I, Kote-Jarai Z, Fackler MJ, Bancroft E, Osin P, Nerurkar A, et al. Gene promoter hypermethylation in ductal lavage fluid from healthy BRCA gene mutation carriers and mutation-negative controls. *Breast cancer research : BCR*. 2007;9(1):R20.

189. Song MA, Brasky TM, Marian C, Weng DY, Taslim C, Dumitrescu RG, et al. Racial differences in genome-wide methylation profiling and gene expression in breast tissues from healthy women. *Epigenetics*. 2015;10(12):1177-87.

190. Terry MB, McDonald JA, Wu HC, Eng S, Santella RM. Epigenetic Biomarkers of Breast Cancer Risk: Across the Breast Cancer Prevention Continuum. *Advances in experimental medicine and biology*. 2016;882:33-68.

191. Jezkova E, Kajo K, Zubor P, Grendar M, Malicherova B, Mendelova A, et al. Methylation in promoter regions of PITX2 and RASSF1A genes in association with clinicopathological features in breast cancer patients. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2016;37(12):15707-18.

192. Luo S, Chen J, Mo X. The association of PTEN hypermethylation and breast cancer: a meta-analysis. *OncoTargets and therapy*. 2016;9:5643-50.

193. Lu YM, Cheng F, Teng LS. The association between phosphatase and tensin homolog hypermethylation and patients with breast cancer, a meta-analysis and literature review. *Scientific reports*. 2016;6:32723.

194. Song XY, Li BY, Zhou EX, Wu FX. The clinicopathological significance of RUNX3 hypermethylation and mRNA expression in human breast cancer, a meta-analysis. *OncoTargets and therapy*. 2016;9:5339-47.

195. Yang R, Pfütze K, Zucknick M, Sutter C, Wappenschmidt B, Marme F, et al. DNA methylation array analyses identified breast cancer-associated HYAL2 methylation in peripheral blood. *International journal of cancer*. 2015;136(8):1845-55.

196. Fackler MJ, McVeigh M, Mehrotra J, Blum MA, Lange J, Lapidus A, et al. Quantitative multiplex methylation-specific PCR assay for the detection of promoter hypermethylation in multiple genes in breast cancer. *Cancer research*. 2004;64(13):4442-52.

197. Dammann R, Yang G, Pfeifer GP. Hypermethylation of the CpG island of Ras association domain family 1A (RASSF1A), a putative tumor suppressor gene from the 3p21.3 locus, occurs in a large percentage of human breast cancers. *Cancer research*. 2001;61(7):3105-9.

198. Son KS, Kang HS, Kim SJ, Jung SY, Min SY, Lee SY, et al. Hypomethylation of the interleukin-10 gene in breast cancer tissues. *Breast (Edinburgh, Scotland)*. 2010;19(6):484-8.

199. Munzel P, Marx D, Kochel H, Schauer A, Bock KW. Genomic alterations of the c-myc protooncogene in relation to the overexpression of c-erbB2 and Ki-67 in human breast and cervix carcinomas. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 1991;117(6):603-7.

200. Denis N, Kitzis A, Kruh J, Dautry F, Corcos D. Stimulation of methotrexate resistance and dihydrofolate reductase gene amplification by c-myc. *Oncogene*. 1991;6(8):1453-7.

201. Sun H, Li K, Shen S. A study of the role of Notch1 and JAG1 gene methylation in development of breast cancer. *Medical oncology (Northwood, London, England)*. 2016;33(4):35.

202. Cao Y, Li Y, Zhang N, Hu J, Yin L, Pan Z, et al. Quantitative DNA hypomethylation of ligand Jagged1 and receptor Notch1 signifies occurrence and progression of breast carcinoma. *American journal of cancer research*. 2015;5(6):1897-910.

203. Widschwendter M, Berger J, Daxenbichler G, Muller-Holzner E, Widschwendter A, Mayr A, et al. Loss of retinoic acid receptor beta expression in breast cancer and morphologically normal adjacent tissue but not in the normal breast tissue distant from the cancer. *Cancer research*. 1997;57(19):4158-61.
204. Di Vinci A, Perdelli L, Banelli B, Salvi S, Casciano I, Gelvi I, et al. p16(INK4a) promoter methylation and protein expression in breast fibroadenoma and carcinoma. *International journal of cancer*. 2005;114(3):414-21.
205. Toyooka KO, Toyooka S, Virmani AK, Sathyanarayana UG, Euhus DM, Gilcrease M, et al. Loss of expression and aberrant methylation of the CDH13 (H-cadherin) gene in breast and lung carcinomas. *Cancer research*. 2001;61(11):4556-60.
206. van Veldhoven K, Polidoro S, Baglietto L, Severi G, Sacerdote C, Panico S, et al. Epigenome-wide association study reveals decreased average methylation levels years before breast cancer diagnosis. *Clin Epigenetics*. 2015;7:67.
207. Severi G, Southey MC, English DR, Jung CH, Lonie A, McLean C, et al. Epigenome-wide methylation in DNA from peripheral blood as a marker of risk for breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2014;148(3):665-73.
208. Kuchiba A, Iwasaki M, Ono H, Kasuga Y, Yokoyama S, Onuma H, et al. Global methylation levels in peripheral blood leukocyte DNA by LUMA and breast cancer: a case-control study in Japanese women. *British journal of cancer*. 2014;110(11):2765-71.
209. Xu X, Gammon MD, Hernandez-Vargas H, Herceg Z, Wetmur JG, Teitelbaum SL, et al. DNA methylation in peripheral blood measured by LUMA is associated with breast cancer in a population-based study. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2012;26(6):2657-66.
210. Wu HC, Delgado-Cruzata L, Flom JD, Perrin M, Liao Y, Ferris JS, et al. Repetitive element DNA methylation levels in white blood cell DNA from sisters discordant for breast cancer from the New York site of the Breast Cancer Family Registry. *Carcinogenesis*. 2012;33(10):1946-52.
211. Deroo LA, Bolick SC, Xu Z, Umbach DM, Shore D, Weinberg CR, et al. Global DNA methylation and one-carbon metabolism gene polymorphisms and the risk of breast cancer in the Sister Study. *Carcinogenesis*. 2014;35(2):333-8.
212. Kitkumthorn N, Tuangsintanakul T, Rattanatanyong P, Tiwawech D, Mutirangura A. LINE-1 methylation in the peripheral blood mononuclear cells of cancer patients. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2012;413(9-10):869-74.
213. Choi JY, James SR, Link PA, McCann SE, Hong CC, Davis W, et al. Association between global DNA hypomethylation in leukocytes and risk of breast cancer. *Carcinogenesis*. 2009;30(11):1889-97.
214. Delgado-Cruzata L, Wu HC, Perrin M, Liao Y, Kappil MA, Ferris JS, et al. Global DNA methylation levels in white blood cell DNA from sisters discordant for breast cancer from the New York site of the Breast Cancer Family Registry. *Epigenetics*. 2012;7(8):868-74.
215. Waalwijk C, Flavell R. MspI, an isoschizomer of hpaII which cleaves both unmethylated and methylated hpaII sites. *Nucleic acids research*. 1978;5(9):3231-6.
216. Mohsen K, Johansson S, Ekström TJ. Using LUMA: a Luminometric-Based Assay for Global DNA-Methylation. *Epigenetics*. 2014;1(1):46-9.

217. Karimi M, Johansson S, Stach D, Corcoran M, Grander D, Schalling M, et al. LUMA (LUMinometric Methylation Assay)--a high throughput method to the analysis of genomic DNA methylation. *Experimental cell research*. 2006;312(11):1989-95.
218. Pilsner JR, Lazarus AL, Nam DH, Letcher RJ, Sonne C, Dietz R, et al. Mercury-associated DNA hypomethylation in polar bear brains via the LUMinometric Methylation Assay: a sensitive method to study epigenetics in wildlife. *Molecular ecology*. 2010;19(2):307-14.
219. Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res*. 1994;22(15):2990-7.
220. Wang RY, Gehrke CW, Ehrlich M. Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues. *Nucleic Acids Res*. 1980;8(20):4777-90.
221. Thu KL, Vucic EA, Kennett JY, Heryet C, Brown CJ, Lam WL, et al. Methylated DNA Immunoprecipitation. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*. 2009(23).
222. Borgel J, Guibert S, Weber M. Methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP) from low amounts of cells. *Methods Mol Biol*. 2012;925:149-58.
223. Olausson KA. Contribution à l'étude de marqueurs de la carcinogenèse bronchique et analyse de facteurs prédictifs du bénéfice de la chimiothérapie: These de doctorat. Université Paris 11; 2006.
224. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(18):9821-6.
225. Brisotto G, di Gennaro A, Damiano V, Armellini M, Perin T, Maestro R, et al. An improved sequencing-based strategy to estimate locus-specific DNA methylation. *BMC cancer*. 2015;15:639.
226. Deng D, Deng G, Smith MF, Zhou J, Xin H, Powell SM, et al. Simultaneous detection of CpG methylation and single nucleotide polymorphism by denaturing high performance liquid chromatography. *Nucleic acids research*. 2002;30(3):e13-e.
227. Zhang Y, Rohde C, Tierling S, Stamerjohanns H, Reinhardt R, Walter J, et al. DNA methylation analysis by bisulfite conversion, cloning, and sequencing of individual clones. *Methods Mol Biol*. 2009;507:177-87.
228. Colella S, Shen L, Baggerly KA, Issa JP, Krahe R. Sensitive and quantitative universal Pyrosequencing methylation analysis of CpG sites. *Biotechniques*. 2003;35(1):146-50.
229. Tost J, Gut IG. DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nat Protoc*. 2007;2(9):2265-75.
230. Draht MX, Smits KM, Jooste V, Tournier B, Vervoort M, Ramaekers C, et al. Analysis of RET promoter CpG island methylation using methylation-specific PCR (MSP), pyrosequencing, and methylation-sensitive high-resolution melting (MS-HRM): impact on stage II colon cancer patient outcome. *Clinical epigenetics*. 2016;8(1):44.
231. Uhlmann K, Brinckmann A, Toliat MR, Ritter H, Nurnberg P. Evaluation of a potential epigenetic biomarker by quantitative methyl-single nucleotide polymorphism analysis. *Electrophoresis*. 2002;23(24):4072-9.
232. Bibikova M, Barnes B, Tsan C, Ho V, Klotzle B, Le JM, et al. High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics*. 2011;98(4):288-95.
233. Maksimovic J, Gordon L, Oshlack A. SWAN: Subset-quantile within array normalization for illumina infinium HumanMethylation450 BeadChips. *Genome biology*. 2012;13(6):R44.

234. Pan H, Chen L, Dogra S, Teh AL, Tan JH, Lim YI, et al. Measuring the methylome in clinical samples: improved processing of the Infinium Human Methylation450 BeadChip Array. *Epigenetics*. 2012;7(10):1173-87.
235. Garrone R, Exposito JY, Franc JM, Franc S, Humbert-David N, Qin L, et al. Phylogenesis of the extracellular matrix. *Comptes rendus des seances de la Societe de biologie et de ses filiales*. 1993;187(2):114-23.
236. André J-M, Catala M, Morère J-J, Escudier E, Katsanis G, Poirier J. *histologie: Les tissus*. Université Pierre et Marie Curie 2007-2008. Available from: <http://www.chups.jussieu.fr/polys/histo/histoP1/histoP1.pdf>.
237. Cappetta M, Berdasco M, Hochmann J, Bonilla C, Sans M, Hidalgo PC, et al. Effect of genetic ancestry on leukocyte global DNA methylation in cancer patients. *BMC cancer*. 2015;15:434.
238. Sauter G, Simon R, Hillan K. Tissue microarrays in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2(12):962-72.
239. Rubin H. Fields and field cancerization: the preneoplastic origins of cancer: asymptomatic hyperplastic fields are precursors of neoplasia, and their progression to tumors can be tracked by saturation density in culture. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2011;33(3):224-31.
240. Huang KT, Mikeska T, Li J, Takano EA, Millar EK, Graham PH, et al. Assessment of DNA methylation profiling and copy number variation as indications of clonal relationship in ipsilateral and contralateral breast cancers to distinguish recurrent breast cancer from a second primary tumour. *BMC cancer*. 2015;15:669.
241. Wong EM, Joo JE, McLean CA, Baglietto L, English DR, Severi G, et al. Tools for translational epigenetic studies involving formalin-fixed paraffin-embedded human tissue: applying the Infinium HumanMethylation450 Beadchip assay to large population-based studies. *BMC research notes*. 2015;8:543.
242. Rauscher GH, Kresovich JK, Poulin M, Yan L, Macias V, Mahmoud AM, et al. Exploring DNA methylation changes in promoter, intragenic, and intergenic regions as early and late events in breast cancer formation. *BMC cancer*. 2015;15:816.
243. Rothman KJ. *Epidemiology: An Introduction*: OUP USA; 2012.
244. Espinal AC, Wang D, Yan L, Liu S, Tang L, Hu Q, et al. A methodological study of genome-wide DNA methylation analyses using matched archival formalin-fixed paraffin embedded and fresh frozen breast tumors. *Oncotarget*. 2017;8(9):14821-9.
245. Gilbert MT, Haselkorn T, Bunce M, Sanchez JJ, Lucas SB, Jewell LD, et al. The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when? *PLoS One*. 2007;2(6):e537.
246. Infinium HD FFPE restore protocole 2011. Available from: https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/myillumina/5c3d90a3-793c-4a8b-932b-0434590f98ef/infinium_ffpe_sample_restore_booklet_15014614_c.pdf.
247. Moran S, Vizoso M, Martinez-Cardus A, Gomez A, Matias-Guiu X, Chiavenna SM, et al. Validation of DNA methylation profiling in formalin-fixed paraffin-embedded samples using the Infinium HumanMethylation450 Microarray. *Epigenetics*. 2014;9(6):829-33.
248. Farkas SA, Milutin-Gasperov N, Grce M, Nilsson TK. Genome-wide DNA methylation assay reveals novel candidate biomarker genes in cervical cancer. *Epigenetics*. 2013;8(11):1213-25.

249. Chen Q, Sun F. A unified approach for allele frequency estimation, SNP detection and association studies based on pooled sequencing data using EM algorithms. *BMC genomics*. 2013;14 Suppl 1:S1.
250. Huang WY, Hsu SD, Huang HY, Sun YM, Chou CH, Weng SL, et al. MethHC: a database of DNA methylation and gene expression in human cancer. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(Database issue):D856-61.
251. Jaffe AE, Murakami P, Lee H, Leek JT, Fallin MD, Feinberg AP, et al. Bump hunting to identify differentially methylated regions in epigenetic epidemiology studies. *International journal of epidemiology*. 2012;41(1):200-9.
252. Roos L, van Dongen J, Bell CG, Burri A, Deloukas P, Boomsma DI, et al. Integrative DNA methylome analysis of pan-cancer biomarkers in cancer discordant monozygotic twin-pairs. *Clin Epigenetics*. 2016;8:7.
253. Imsland F, Feng C, Boije H, Bed'hom B, Fillon V, Dorshorst B, et al. The Rose-comb mutation in chickens constitutes a structural rearrangement causing both altered comb morphology and defective sperm motility. *PLoS Genet*. 2012;8(6):e1002775.
254. HLA-DPB2 gene. Available from: <http://www.creativebiomart.net/pdf/HLA-DPB2-4843H.HLA-DPB2.pdf>.
255. Shi Y, Li L, Hu Z, Li S, Wang S, Liu J, et al. A genome-wide association study identifies two new cervical cancer susceptibility loci at 4q12 and 17q12. *Nature genetics*. 2013;45(8):918-22.
256. Agarwal AK, Barnes RI, Garg A. Functional characterization of human 1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase isoform 8: cloning, tissue distribution, gene structure, and enzymatic activity. *Arch Biochem Biophys*. 2006;449(1-2):64-76.
257. Xu J, Sun J, Chen J, Wang L, Li A, Helm M, et al. RNA-Seq analysis implicates dysregulation of the immune system in schizophrenia. *BMC genomics*. 2012;13(Suppl 8):S2-S.
258. Pangon L, Ng I, Giry-Laterriere M, Currey N, Morgan A, Benthani F, et al. JRK is a positive regulator of beta-catenin transcriptional activity commonly overexpressed in colon, breast and ovarian cancer. *Oncogene*. 2016;35(22):2834-41.
259. Kovalenko PL, Basson MD. Schlafen 12 expression modulates prostate cancer cell differentiation. *The Journal of surgical research*. 2014;190(1):177-84.
260. Szebenyi G, Wigley WC, Hall B, Didier A, Yu M, Thomas P, et al. Hook2 contributes to aggresome formation. *BMC Cell Biol*. 2007;8:19.
261. Ohno Y, Suto S, Yamanaka M, Mizutani Y, Mitsutake S, Igarashi Y, et al. ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(43):18439-44.
262. Wang S, Dong Y, Zhang Y, Wang X, Xu L, Yang S, et al. DACT2 is a functional tumor suppressor through inhibiting Wnt/beta-catenin pathway and associated with poor survival in colon cancer. *Oncogene*. 2015;34(20):2575-85.
263. Coughlin CR, 2nd, Scharer GH, Friederich MW, Yu HC, Geiger EA, Creadon-Swindell G, et al. Mutations in the mitochondrial cysteinyl-tRNA synthase gene, CARS2, lead to a severe epileptic encephalopathy and complex movement disorder. *J Med Genet*. 2015;52(8):532-40.
264. Betancur P, Bronner-Fraser M, Sauka-Spengler T. ASSEMBLING NEURAL CREST REGULATORY CIRCUITS INTO A GENE REGULATORY NETWORK. *Annual review of cell and developmental biology*. 2010;26:581-603.

265. Wall DP, Esteban FJ, Deluca TF, Huyck M, Monaghan T, Velez de Mendizabal N, et al. Comparative analysis of neurological disorders focuses genome-wide search for autism genes. *Genomics*. 2009;93(2):120-9.
266. Brooks SP, Coccia M, Tang HR, Kanuga N, Machesky LM, Bailly M, et al. The Nance–Horan syndrome protein encodes a functional WAVE homology domain (WHD) and is important for co-ordinating actin remodelling and maintaining cell morphology. *Human molecular genetics*. 2010;19(12):2421-32.
267. Kentala H, Weber-Boyvat M, Olkkonen VM. OSBP-Related Protein Family: Mediators of Lipid Transport and Signaling at Membrane Contact Sites. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2016;321:299-340.
268. Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, Jackson-Grusby L, Dausman J, Gray JW, et al. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science*. 2003;300(5618):489-92.
269. Dunn BK. Hypomethylation: one side of a larger picture. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;983:28-42.
270. Lim U, Flood A, Choi SW, Albanes D, Cross AJ, Schatzkin A, et al. Genomic methylation of leukocyte DNA in relation to colorectal adenoma among asymptomatic women. *Gastroenterology*. 2008;134(1):47-55.
271. Moore LE, Pfeiffer RM, Poscablo C, Real FX, Kogevinas M, Silverman D, et al. Genomic DNA hypomethylation as a biomarker for bladder cancer susceptibility in the Spanish Bladder Cancer Study: a case-control study. *The Lancet Oncology*. 2008;9(4):359-66.
272. Pufulete M, Al-Ghnaniem R, Leather AJ, Appleby P, Gout S, Terry C, et al. Folate status, genomic DNA hypomethylation, and risk of colorectal adenoma and cancer: a case control study. *Gastroenterology*. 2003;124(5):1240-8.
273. Hsiung DT, Marsit CJ, Houseman EA, Eddy K, Furniss CS, McClean MD, et al. Global DNA methylation level in whole blood as a biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007;16(1):108-14.
274. Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, et al. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nature genetics*. 2009;41(2):178-86.
275. Hansen KD, Timp W, Bravo HC, Sabunciyan S, Langmead B, McDonald OG, et al. Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types. *Nature genetics*. 2011;43(8):768-75.
276. Ruike Y, Imanaka Y, Sato F, Shimizu K, Tsujimoto G. Genome-wide analysis of aberrant methylation in human breast cancer cells using methyl-DNA immunoprecipitation combined with high-throughput sequencing. *BMC genomics*. 2010;11:137.
277. Rao X, Evans J, Chae H, Pilrose J, Kim S, Yan P, et al. CpG island shore methylation regulates caveolin-1 expression in breast cancer. *Oncogene*. 2013;32(38):4519-28.
278. Harten SK, Oey H, Bourke LM, Bharti V, Isbel L, Daxinger L, et al. The recently identified modifier of murine metastable epialleles, Rearranged L-Myc Fusion, is involved in maintaining epigenetic marks at CpG island shores and enhancers. *BMC Biol*. 2015;13:21.
279. Gu L, Waliany S, Kane SE. Darpp-32 and its truncated variant t-Darpp have antagonistic effects on breast cancer cell growth and herceptin resistance. *PLoS One*. 2009;4(7):e6220.
280. Wang MS, Pan Y, Liu N, Guo C, Hong L, Fan D. Overexpression of DARPP-32 in colorectal adenocarcinoma. *International journal of clinical practice*. 2005;59(1):58-61.

281. Mukherjee K, Peng D, Brifkani Z, Belkhiri A, Pera M, Koyama T, et al. Dopamine and cAMP regulated phosphoprotein MW 32 kDa is overexpressed in early stages of gastric tumorigenesis. *Surgery*. 2010;148(2):354-63.
282. Belkhiri A, Zhu S, El-Rifai W. DARPP-32: from neurotransmission to cancer. *Oncotarget*. 2016;7(14):17631-40.
283. Belkhiri A, Dar AA, Peng DF, Razvi MH, Rinehart C, Arteaga CL, et al. Expression of t-DARPP mediates trastuzumab resistance in breast cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(14):4564-71.
284. Hamel S, Bouchard A, Ferrario C, Hassan S, Aguilar-Mahecha A, Buchanan M, et al. Both t-Darpp and DARPP-32 can cause resistance to trastuzumab in breast cancer cells and are frequently expressed in primary breast cancers. *Breast cancer research and treatment*. 2010;120(1):47-57.
285. Vangamudi B, Peng DF, Cai Q, El-Rifai W, Zheng W, Belkhiri A. t-DARPP regulates phosphatidylinositol-3-kinase-dependent cell growth in breast cancer. *Molecular cancer*. 2010;9:240.
286. Hansen C, Greengard P, Nairn AC, Andersson T, Vogel WF. Phosphorylation of DARPP-32 regulates breast cancer cell migration downstream of the receptor tyrosine kinase DDR1. *Experimental cell research*. 2006;312(20):4011-8.
287. Hansen C, Howlin J, Tengholm A, Dyachok O, Vogel WF, Nairn AC, et al. Wnt-5a-induced phosphorylation of DARPP-32 inhibits breast cancer cell migration in a CREB-dependent manner. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(40):27533-43.
288. Chen Z, Zhu S, Hong J, Soutto M, Peng D, Belkhiri A, et al. Gastric tumour-derived ANGPT2 regulation by DARPP-32 promotes angiogenesis. *Gut*. 2016;65(6):925-34.
289. Zhu S, Hong J, Tripathi MK, Sehdev V, Belkhiri A, El-Rifai W. Regulation of CXCR4-mediated invasion by DARPP-32 in gastric cancer cells. *Molecular cancer research : MCR*. 2013;11(1):86-94.
290. Powers JT, Hong S, Mayhew CN, Rogers PM, Knudsen ES, Johnson DG. E2F1 uses the ATM signaling pathway to induce p53 and Chk2 phosphorylation and apoptosis. *Molecular cancer research : MCR*. 2004;2(4):203-14.
291. Khalil H, Tummala H, Chakarov S, Zhelev N, Lane D. Targeting ATM pathway for therapeutic intervention in cancer. *BioDiscovery*. 2012.
292. Cremona CA, Behrens A. ATM signalling and cancer. *Oncogene*. 2014;33(26):3351-60.
293. Kamińska K, Szczylik C, Bielecka ZF, Bartnik E, Porta C, Lian F, et al. The role of the cell-cell interactions in cancer progression. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2015;19(2):283-96.
294. Cooper GM, Hausman RE. The development and causes of cancer. *The cell: A molecular approach*. 2000:725-66.
295. Zhang Y, Cai Q, Shu XO, Gao YT, Li C, Zheng W, et al. Whole-Exome Sequencing Identifies Novel Somatic Mutations in Chinese Breast Cancer Patients. *Journal of molecular and genetic medicine : an international journal of biomedical research*. 2015;9(4).
296. Shima JE, McLean DJ, McCarrey JR, Griswold MD. The murine testicular transcriptome: characterizing gene expression in the testis during the progression of spermatogenesis. *Biol Reprod*. 2004;71(1):319-30.

297. Chen D, Juko-Pecirep I, Hammer J, Ivansson E, Enroth S, Gustavsson I, et al. Genome-wide association study of susceptibility loci for cervical cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2013;105(9):624-33.
298. Ivansson EL, Juko-Pecirep I, Erlich HA, Gyllensten UB. Pathway-based analysis of genetic susceptibility to cervical cancer in situ: HLA-DPB1 affects risk in Swedish women. *Genes Immun*. 2011;12(8):605-14.
299. Okwan-Duodu D, Umpierrez GE, Brawley OW, Diaz R. Obesity-driven inflammation and cancer risk: role of myeloid derived suppressor cells and alternately activated macrophages. *American journal of cancer research*. 2013;3(1):21-33.
300. Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Kato T, Atsumi A, Yamamoto T, et al. Crucial role of a long-chain fatty acid elongase, Elovl6, in obesity-induced insulin resistance. *Nature medicine*. 2007;13(10):1193-202.
301. Zaidi N, Lupien L, Kuemmerle NB, Kinlaw WB, Swinnen JV, Smans K. Lipogenesis and lipolysis: the pathways exploited by the cancer cells to acquire fatty acids. *Progress in lipid research*. 2013;52(4):585-9.
302. Kessler SM, Simon Y, Gemperlein K, Gianmoena K, Cadenas C, Zimmer V, et al. Fatty acid elongation in non-alcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2014;15(4):5762-73.
303. Feng Y, Chen W, Kuo Y, Tung C, Tsao C, Shiau A, et al. Elovl6 is a poor prognostic predictor in breast cancer. *Oncology letters*. 2016;12(1):207-12.
304. Wang S, Dong Y, Zhang Y, Wang X, Xu L, Yang S, et al. DACT2 is a functional tumor suppressor through inhibiting Wnt/ β -catenin pathway and associated with poor survival in colon cancer. *Oncogene*. 2015;34(20):2575.
305. Brott BK, Sokol SY. Frd proteins: modulators of Wnt signaling in vertebrate development. *Differentiation*. 2005;73(7):323-9.
306. Li J, Zhang M, He T, Li H, Cao T, Zheng L, et al. Methylation of DACT2 promotes breast cancer development by activating Wnt signaling. *Scientific reports*. 2017;7(1):3325.
307. Xiang T, Fan Y, Li C, Li L, Ying Y, Mu J, et al. DACT2 silencing by promoter CpG methylation disrupts its regulation of epithelial-to-mesenchymal transition and cytoskeleton reorganization in breast cancer cells. *Oncotarget*. 2016;7(43):70924-35.
308. Dawid IB, Toyama R, Taira M. LIM domain proteins. *Comptes rendus de l'Academie des sciences Serie III, Sciences de la vie*. 1995;318(3):295-306.
309. Wandzioch E, Kolterud A, Jacobsson M, Friedman SL, Carlsson L. Lhx2^{-/-} mice develop liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(47):16549-54.
310. Kim MS, Lee J, Oh T, Moon Y, Chang E, Seo KS, et al. Genome-wide identification of OTP gene as a novel methylation marker of breast cancer. *Oncology reports*. 2012;27(5):1681-8.
311. Kuzmanov A, Hopfer U, Marti P, Meyer-Schaller N, Yilmaz M, Christofori G. LIM-homeobox gene 2 promotes tumor growth and metastasis by inducing autocrine and paracrine PDGF-B signaling. *Molecular oncology*. 2014;8(2):401-16.
312. Lambert MP, Ancy PB, Esposti DD, Cros MP, Sklias A, Scoazec JY, et al. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in hepatocellular carcinoma and after in vitro exposure to common risk factors. *Clin Epigenetics*. 2015;7:15.
313. Goto A, Liu X, Robinson C-A, Ridgway ND. Multisite phosphorylation of oxysterol-binding protein regulates sterol binding and activation of sphingomyelin synthesis. *Molecular Biology of the Cell*. 2012;23(18):3624-35.

314. Charman M, Colbourne TR, Pietrangelo A, Kreplak L, Ridgway ND. Oxysterol-binding protein (OSBP)-related protein 4 (ORP4) is essential for cell proliferation and survival. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(22):15705-17.
315. Weber-Boyvat M, Zhong W, Yan D, Olkkonen VM. Oxysterol-binding proteins: functions in cell regulation beyond lipid metabolism. *Biochemical pharmacology*. 2013;86(1):89-95.
316. Henriques Silva N, Vasconcellos Fournier M, Pimenta G, Pulcheri WA, Spector N, da Costa Carvalho Mda G. HLM/OSBP2 is expressed in chronic myeloid leukemia. *Int J Mol Med*. 2003;12(4):663-6.
317. Marzese DM, Scolyer RA, Huynh JL, Huang SK, Hirose H, Chong KK, et al. Epigenome-wide DNA methylation landscape of melanoma progression to brain metastasis reveals aberrations on homeobox D cluster associated with prognosis. *Human molecular genetics*. 2014;23(1):226-38.
318. Ambrosone CB, Young AC, Sucheston LE, Wang D, Yan L, Liu S, et al. Genome-wide methylation patterns provide insight into differences in breast tumor biology between American women of African and European ancestry. *Oncotarget*. 2014;5(1):237-48.
319. Roessler J, Ammerpohl O, Gutwein J, Steinemann D, Schlegelberger B, Weyer V, et al. The CpG island methylator phenotype in breast cancer is associated with the lobular subtype. *Epigenomics*. 2015;7(2):187-99.
320. Sato Y, Marzese DM, Ohta K, Huang SK, Sim MS, Chong K, et al. Epigenetic regulation of REG1A and chemosensitivity of cutaneous melanoma. *Epigenetics*. 2013;8(10):1043-52.
321. Marzese DM, Liu M, Huynh JL, Hirose H, Donovan NC, Huynh KT, et al. Brain metastasis is predetermined in early stages of cutaneous melanoma by CD44v6 expression through epigenetic regulation of the spliceosome. *Pigment cell & melanoma research*. 2015;28(1):82-93.
322. de Ruijter TC, de Hoon JP, Slaats J, de Vries B, Janssen MJ, van Wezel T, et al. Formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue epigenomics using Infinium HumanMethylation450 BeadChip assays. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2015;95(7):833-42.
323. Siegel EM, Berglund AE, Riggs BM, Eschrich SA, Putney RM, Ajidahun AO, et al. Expanding epigenomics to archived FFPE tissues: an evaluation of DNA repair methodologies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23(12):2622-31.

Annexe

Tableau 1.3 : Les facteurs de risque de cancer du sein controlatéral dans des études cohortes

Étude		Population			Facteurs Étudiés	Résultats	Ajustement/ stratification
Auteur (année)	Origine de population	Définition de CSC (Si présente) Critère d'inclusion/exclusion Stade	N (Date d'études) Ethnique (si présente)	Âge (moyenne / durée de suivi)			
(40) F. Langlands (2016)	Royaume-Uni	-CSC : carcinome infiltrant ou <i>in situ</i> en même temps que le PCS ou durant le temps de suivi -stade de PCS I-III	Deux registraires : WMCIU NYCRIS (1998-2003) -PCS infiltrant (total) n= 38132 -carcinome canalaire n= 32735 (CCI) -carcinome lobulaire n= 5397 (CLI)	moyenne : 8 ans CCI:59 ans CLI:63 ans	tumeur (lobulaire vs canalaire)	-901 cas parmi les CCI ont développé un CSC (2,8%) -166 cas parmi les CLI ont développé un CSC (3,1%) valeur p= 0,169	analyse univariée
(41) A. J. van den Broek (2015)	Pays-Bas	-CSC: carcinome <i>in situ</i> ou invasif développer 3 mois après le PCS	-PCS infiltrant (total) n= 6294 (1970-2003) -mutation du gène <i>BRCA1</i> n= 200	<50 ans médiane: 12,5 ans	mutation (<i>BRCA1</i> vs non) mutation (<i>BRCA2</i> vs non)	-578 femmes ont développé un CSC HR= 3,31 (2,41-4,55)* $p \leq 0,001$ HR= 2,17 (1,22-3,85)* $p = 0,01$	analyse multivariée ajustée pour : - âge au PCS - temps-interactions avec d'autres cancers - radiothérapie - traitement systémique - récepteurs d'œstrogène du PCS

	exclusion: -un cancer du sein bilatéral synchrone n= 52 -métastases, mort ou perdus pour le suivi, dans les 3 mois après le premier diagnostic de CS n= 138	mutation du gène <i>BRCA2</i> n= 71			<u>âge (ans) au diagnostic du PCS</u> (<41 vs 41- 49) sans mutation HR= 1,06 (0,89-1,28)* <i>p=0,50</i> mutation <i>BRCA1/2</i> HR= 1,89 (1,09-3,29)* <i>p=0,02</i> <u>thérapie systémique</u> (oui vs non) sans mutation HR= 0,74 (0,61-0,91)* <i>p=0,01</i> mutation <i>BRCA1/2</i> HR= 0,65 (0,37-1,17)* <i>p=0,15</i> <u>chimiothérapie</u> (oui vs non) sans mutation HR= 0,8 (0,65-0,98)* <i>p=0,03</i> mutation <i>BRCA1/2</i> HR= 0,7 (0,39-1,26)* <i>p=0,23</i> <u>antécédents familiaux de cancer du sein le cancer</u> (oui vs non) sans mutation HR= 1,65 (1,25-2,18)* <i>p<0,01</i> mutation <i>BRCA1/2</i> HR= 2,11 (0,98-4,55)* <i>p=0,06</i> <u>antécédents familiaux de CS + âge (ans) au diagnostic PCS</u> (CS + âge 41- 49 vs non) sans mutation HR=1,75 (1,29-2,39)* <i>p<0,01</i> mutation <i>BRCA1/2</i> HR=1,31 (0,51-3,37)* <i>p=0,57</i> (CS + âge <40 vs non) sans mutation HR=1,31 (0,51-3,37)* <i>p=0,57</i> mutation <i>BRCA1/2</i> HR=2,97 (1,28-6,86)* <i>p=0,01</i>	
(42) J. C. Drooger (2015) Pays-Bas	-CSC: carcinome <i>in situ</i> ou invasif développer 3	cohorte (1980-2013) n= 691 <i>BRCA1</i>	âge<40 ans	médiane: 8,6 ans	mutation (<i>BRCA1</i> vs <i>BRCA2</i>) HR= 2,33 (0,51–10,73)* chimiothérapie (oui vs non) HR= 0,52 (0,24–1,14)*	analyse multivariée ajustée pour : -âge au cancer du sein primaire - type de mutation <i>BRCA</i> - chimiothérapie

	mois après le PCS sans métastase Inclusion: -mutation de <i>BRCA1/2</i> -traités à l'Erasmus MC Cancer Institute exclusion: - moins de 3 mois de suivis n= 52 -traité par radiothérapie du sein ou de la paroi thoracique ou un traitement anticancéreux systémique n= 16 -CS bilatérale synchrone avec radiothérapie ou une mastectomie bilatérale n= 31	n= 517 <i>BRCA2</i> n= 174			hormonothérapie (oui vs non) radiothérapie (après une mastectomie vs non) (après une tumorectomie vs non)	HR= 0,25 (0,05–1,23)* HR= 0,97 (0,41–2,30)* HR= 1,53 (0,22–10,51)*	- hormonothérapie - radiothérapie
(43) A. Shankar (2015) Ludhiana (Asia)	CSC développé 6 mois après le PCS (1997-2006) CSC n= 24	PCS n= 532	moyenne: 47 ans	médiane: 6,5 ans	âge (ans) du PCS (20 - 30 vs 60 - 70) (30 - 40 vs 60 - 70) statut de ménopause (pré-ménopause vs post-	RR= 11,3 (1,4-89,4)* <i>p</i> =0,006 RR= 10,8 (1,5-79,6)* <i>p</i> =0,002 RR= 8,6 (3,5-21,3)* <i>p</i> ≤0,001	analyse univariée

		femmes postménopausées n= 401		ménopause) histoire familiale (oui vs non)	RR= 5,4 (2,5-11,6)* $p \leq 0,001$	
		femmes préménopausées n= 155		type histologique de la tumeur (lobulaire vs canalaire)	RR= 1,9 (0,6-6,1)* $p=0,22$	
		-femmes asiatiques		traitement hormonal (oui vs non)	RR= 0,7 (0,3-1,5)* $p=0,333$	
				Statut hormonal	RR=NS	
(44) N. A. de Glas (2015) Pays-Bas	CSC développé < 1 jour après le PCS -stade I-III	PCS n= 194898 (1989-2009) CSC avant 6 mois n= 2829 CSC après 6 mois n= 7185	- médiane: 6,2 ans	<6 mois du PCS : type histologique de la tumeur (lobulaire vs canalaire) âge (ans) du PCS (≥ 75 vs < 50) >6 mois du PCS : type histologique de la tumeur (lobulaire vs canalaire) âge (ans) du PCS (≥ 75 vs < 50)	SHR= 1,17 (1,06-1,30)* $p=0,002$ SHR= 2,34 (2,08-2,62)* $p < 0,002$ SHR=1,19 (1,11-1,28)* $p < 0,001$ SHR= 0,52 (0,48-0,57)* $p < 0,001$	analyse multivariée ajustée pour : -stade au premier diagnostic -période de diagnostic du PCS -grade -stade ganglionnaire
(45) N. N. Basu (2015) Manchester	exclusion : -développé un cancer bilatéral avant le test génétique -développé un cancer de l'ovaire - les femmes subites d'une mastectomie à risque avant de	PCS n= 1011 (1974-2015) histoire familiale de mutation du gène <i>BRCA1</i> n= 506 histoires familiales de mutation du gène <i>BRCA2</i> n=505	médiane: 7,8 ans moyenne: 46,1 ans moyenne: 42,3 ans	mutation (<i>BRCA2</i> vs <i>BRCA1</i>) âge (ans) à la ménopause (>45 vs <45) Statut de ménopause (préménopause vs postménopause) âge (ans) au premier cancer (40- 49 vs <40) (>50 vs <40) oophorectomie SNP	HR= 1,05 (0,65-1,72)* $p=0,836$ HR= 1,56 (0,79-3,09)* $P= 0,384$ HR= 0,99 (0,40-2,41)* HR= 0,5 (0,25-0,97)* HR= 0,36 (0,15-0,84)* HR= NS HR=NS	analyse multivariée ajustée pour : -âge -oophorectomie -statut de ménopause -mutation (<i>BRCA1</i> ou <i>BRCA2</i>)

	développer un CSC						
(46) C. Rusner (2014) Allemande	CSC développé 6 mois après le PCS	PCS n= 49804 (1998-2007) CSC n= 594	moyenne: 63 ans	médiane: 3,2 ans	PCS RH+ PCS RH- <u>PCS RH+</u> âge <50 ans âge >50 ans <u>PCS RH-</u> âge <50 ans PCS canalaire PCS lobulaire	SIR=0,7(0,6-0,8)* de développer un CSC SIR=8,9 (7,1-11,1)* de développer un CSC SIR= 1,7 (1,2-2,5)* de développer un CSC HR+ SIR= 0,6 (0,5- 0,7)* de développer un CSC RH+ SIR= 9,2 (7,1-11,9)* de développer un CSC RH- SIR=2,7 (2,3-3,2)* de développer un CSC RH- SIR= 1,6 (0,9-2,6)* de développer un CSC RH-	stratifié par RH et âge
(47) A. Font-Gonzalez (2013) Pays-Bas	CSC développé 6 mois après le PCS -stade I-III exclusion: -cancer du sein non invasif -cancer du stade VI -âge >95 ans au PCS	cancer invasif n=191474 (1989-2008) PCS n= 182562 regroupe : -CSU n= 180396 -2 ^{ème} tumeur non cancéreuse n= 12075 -cancer ipsilatéral n= 548 CSC n= 8912	< 95 ans	≤ 21 ans	<u>risque de mourir :</u> (CSC vs PCS) âge (ans) (≤50 vs >50) ≤50 ans au PCS (CSC vs PCS) âge <50 ans (CSC après 5 ans de PCS) âge 50-69 ans (CSC après 2-5 ans de PCS) âge <50 ans (chirurgie + traitement vs chirurgie) âge >70 ans	HR= 1,3 (1,3-1,4)* HR= 3,1 (2,0-4,8)* HR= 2,3 (2,2-2,5)* HR= 0,7 (0,5-0,9)* HR= 1,2 (1,0-1,3)* HR= 1,2 (1,0-1,3)*	analyse multivariée ajustée pour : -taille de la tumeur -implication des ganglions lymphatiques -histologie -traitements -âge -période de diagnostic du premier cancer du sein

					(chirurgie + traitement vs chirurgie)	HR= 0,6 (0,4-0,8)*	
					taille du PCS		
					< 2cm	HR= 1,4 (1,3-1,4)*	
					> 5cm	HR= 1,3 (1,0-1,7)*	
(48) M. Sandberg	CSC développé	cancer invasif	moyenne:	moyenne:	CSC ER+		Unité de mesure : Personne-années
(2012)	3 mois après le	n= 25715	61,1 ans	6,9 ans	(PCS ER+ vs PCS ER-)	<i>p</i> < 0,001	analyse de cette étude sont stratifié :
Suède	PCS	(1976-2005)			CSC ER-		-traitement hormonal pour le premier cancer du sein
		ER+			(PCS ER- vs PCS ER+)	<i>p</i> < 0,001	ajusté :
		n= 14720			CSC vs PCS	SIR= 2,22 (2,08-2,36)*	-âge au premier cancer du sein dans les catégories de 5 ans
		ER-			<u>risque de développer un CSC</u>		-période du premier cancer du sein dans les catégories de 10 ans
		n= 4133			PCS ER+	SIR= 2,3 (2,1-11,5)*	
		CSC			PCS ER-	SIR= 2,17 (1,8-2,55)*	
		n= 940			âge <50 ans	SIR= 5,73 (4,86-6,72)*	
		ER+			âge >50 ans	SIR= 1,98 (1,85-2,13)*	
		n= 553			<u>risque de développer un CSC</u>		
		ER-			<u>pour PCS <50 ans</u>		
		n= 142			PCS ER+	SIR= 5,87 (4,64-7,31)*	
					PCS ER-	SIR= 5,15 (3,45-7,40)*	
					<u>risque de développer un CSC</u>		
					<u>pour PCS >50 ans</u>		
					PCS ER+	SIR= 2,08 (1,90-2,28)*	
					PCS ER-	SIR= 1,89 (1,55-2,26)*	
					<u>risque de développer un CSC ER+</u>		
					PCS ER+	SIR= 2,02 (1,8-2,27)*	
					PCS ER-	SIR= 1,27 (0,94-1,68)*	
					<u>risque de développer un</u>		

					<u>CSC ER-</u>	
					PCS ER+	SIR= 1,89 (1,46-2,41)*
					PCS ER-	SIR= 4,96 (3,67-6,56)*
					<u>risque de développer un</u>	
					<u>CSC selon traitement de</u>	
					<u>PCS ER+</u>	
					oui	SIR= 1,74 (1,47-2,03)*
					non	SIR= 2,81 (1,98-3,87)*
					<u>risque de développer un</u>	
					<u>CSC ER+ selon traitement</u>	
					<u>de PCS ER+</u>	
					oui	SIR= 1,53 (1,23-1,87)*
					non	SIR= 2,80 (1,75-4,23)*
					<u>risque de développer un</u>	
					<u>CSC ER- selon traitement</u>	
					<u>de PCS ER+</u>	
					oui	SIR= 2,00 (1,30-2,92)*
					non	SIR= 1,51 (0,31-4,41)*
(49) V. Vichapat	CSC développé	cancer invasif	-	31 ans	<u>sans récurrence antérieure:</u>	
(2011)	6 mois après le	n= 8,478			histoire de la familiale	
London (Royaume-	PCS Inclusion :	(1975-2006)			(positive vs négative)	RR= 2,8 (1,4-5,5)*
Uni)	-suivie à la	PCS			(2e ou 3e degré vs non)	RR= 1,13 (0,68-1,87)*
	clinique du sein	n= 4366			(1er degré vs non)	RR= 1,38 (0,93-2,07)*
	à l'Hôpital	CSC			(1er et 2e degré vs non)	RR= 2,76 (1,39-5,47)*
	Guy's	n= 315			traitement endocrinien	
	exclusion :	sans récurrence			(oui vs non)	RR= 0,6 (0,4-1,0)*
	-cancer primitif	antérieure de la			âge (ans)	
	du stade IV	maladie			(≤49 vs 50 - 69)	RR= 1,19 (0,89-1,60)*
	-mastectomie	n= 197			(>70 vs 50 - 69)	RR= 0,65 (0,35-1,21)*
	prophylactique	(83 postménopausées			taille de la tumeur	
	du sein	/111 préménopausées)			(>2 - 5 vs ≤2 cm)	RR= 1,51 (1,12-2,04)*
	controlatéral	avec récurrence			(>5 cm vs ≤2 cm)	RR= 1,89 (1,08-3,31)*
		antérieure de la			implication des ganglions	

maladie n= 118 (37 postménopausées/80 préménopausées)	lymphatiques		
	(≥10 vs non)	RR= 1,62 (0,84-3,12)*	
	type histologique de la tumeur		
	(lobulaire vs canalaire)	RR= 1,15 (0,63-2,10)*	
	Statut de ménopause		
	(préménopause vs postménopause)	RR= NS	
	récepteurs hormonaux		
	(ER, PR, Her2)	RR= NS	
	traitement		
	(chimiothérapie, opération et radiothérapie)	RR= NS	
	Grade	RR= NS	
	Grossesse	RR= NS	
	<u>avec récurrence antérieure :</u>		
	âge (ans)		
	(≤49 vs 50 - 69)	RR= 2,04 (1,40-2,97)*	
(>70 vs 50 - 69)	RR= 0,53 (0,16-1,68)*		
traitement endocrinien			
(oui vs non)	RR= 1,67 (0,96-2,89)*		
histoire familiale			
(2e ou 3e degré vs non)	RR= 0,83 (0,40-1,71)*		
(1er degré vs non)	RR= 1,23 (0,72-2,11)*		
(1er et 2e degré vs non)	RR= 2,06 (0,83-5,08)*		
taille de la tumeur			
(>2-5 vs ≤2 cm)	RR= 0,79 (0,53-1,17)*		
(>5 cm vs ≤2 cm)	RR= 0,69 (0,35-1,35)*		
implication des ganglions lymphatiques			
(≥10 vs non)	RR= 2,0 (1,2-3,6)*		
type histologique de la tumeur			

					(lobulaire vs canalaire) récepteur œstrogène (négatif vs positif) radiothérapies (oui vs non) récepteurs (PR, Her2) traitement (chimiothérapie, opération) statut de ménopause	RR= 0,69 (0,28-1,75)* RR= 1,74 (1,12-2,71)* RR= 1,92 (1,28-2,86)* RR= NS RR= NS RR= NS	
(50) H. B.Nichols (2011) États-Unis	9 Registries Database CSC développé 12 mois après le PCS	cancer invasif n= 339790 (1975-2005) CSC n= 12886	25 - 85 ans	7,5	récepteur ER+ (< 30 ans) (> 30 ans) récepteur ER- (< 30 ans) (30 - 35 ans) (>40 ans)	EAPC= 0,45 EAPC= 0,25- 0,37 EAPC= 1,26 EAPC= 0,85 EAPC= 0,45-0,65	Unité de mesure : 100 personne-année Analyse multivariée ajustée pour : -âge au premier cancer du sein -temps depuis le premier diagnostic de cancer par incréments continus de 1 an
(51) L. Bessonova (2011) Californie	CSC <i>in situ</i> et invasif développé 6 mois après le PCS inclusion : -résidente en Californie au moment du diagnostique -âge <81 au premier diagnostic	cancer invasif n= 106331 (1999- 2005) CSC n= 1613 -blanche non hispanique n= 72658 -hispanique n= 16479 -asiatique, l'insulaire pacifique n= 10808 -afro-américain n= 6291	moyenne: 57,9 ans	moyenne: 60,9 ans	non hispanique RH+ RH- hispanique RH+ RH- asiatique (insulaire pacifique) RH+ RH- afro-américain RH+ RH-	RR= 0,83 (0,77-0,89)* RR= 1,48 (1,29-1,7)* RR= 1,86 (1,56-2,20)* RR= 3,76 (2,97-4,71)* RR= 1,41 (1,11-1,76)* RR= 2,257 (1,51-3,23)* RR= 1,71 (1,31-2,19)* RR= 2,7 (1,5-3,04)*	Unité de mesure : 423 852 personne-année

		-autre n= 95					
(52) K. Metcalfe (2004) Amérique Du Nord	famille avec mutation de <i>BRCA1</i> et <i>BRCA2</i> -stade I-II	cohorte (1975-2000) n= 491 histoires familiales de mutation du gène <i>BRCA1</i> n= 327 histoires familiales de mutation du gène <i>BRCA2</i> n= 152 PCS n= 482 CSC n= 9	24-65 moyenne: 9,2 ans 42,1 ans	moyenne: 9,2 ans	mutation du gène (<i>BCRA2</i> vs <i>BCRA1</i>) âge (ans) (>50 vs <50) tamoxifène (oui vs non) ovariectomie (oui vs non) Ovariectomie selon l'âge (<50 ans vs >50 ans) chimiothérapie (oui vs non) radiothérapie (oui vs non) <u>famille avec mutation de <i>BRCA1</i></u> âge (ans) (>50 vs <50) tamoxifène (oui vs non) ovariectomie (oui vs non) chimiothérapie (oui vs non) radiothérapie (oui vs non) <u>famille avec mutation de <i>BRCA2</i></u> âge (ans) (>50 vs <50) tamoxifène	HR= 0,65 (0,39-1,09)* <i>p</i> =0,10 HR= 0,82 (0,45-1,51)* <i>p</i> =0,52 HR= 0,62 (0,34-1,14)* <i>p</i> =0,12 HR= 0,41 (0,18-0,9)* <i>p</i> =0,03 HR= 0,24 (0,07-0,77)* <i>p</i> =0,02 HR= 1,08 (0,68-1,70)* <i>p</i> =0,74 HR= 0,86 (0,56-1,34)* <i>p</i> =0,51 HR= 0,92 (0,44-1,94)* <i>p</i> =0,83 HR= 0,59 (0,26-1,33)* <i>p</i> =0,59 HR= 0,33 (0,13-0,84)* <i>p</i> =0,02 HR= 1,04 (0,61-1,76)* <i>p</i> = 0,89 HR= 0,98 (0,59-1,62)* <i>p</i> =0,98 HR= 0,66 (0,22-1,93)* <i>p</i> =0,45	analyse multivariée mutuellement ajustée pour : -âge, -mutation (<i>BRCA1</i> ou <i>BRCA2</i>) -traitements

					(oui vs non) ovariectomie	HR= 0,65 (0,25-1,7)* <i>p</i> =0,37	
					(oui vs non) chimiothérapie	HR= 0,75 (0,16-3,48)* <i>p</i> =0,72	
					(oui vs non) radiothérapie	HR= 1,17 (0,45-3,08)* <i>p</i> =0,75	
					(oui vs non)	HR= 0,58 (0,23-1,44)* <i>p</i> =0,24	
(53) J. Bernstein (2003) États-Unis	CSC développé 6 mois après le PCS exclusion : - CSC diagnostiqué avant 6 mois n= 27,172 -tumeur antérieure non précisée n= 13,299 -latéralité ambiguë n= 4,934 -mois inconnu de diagnostic n= 1,475	PCS infiltrant (1973-1998) n= 305,533 CSC n= 13,320 -afro- américaines/blanches	>20 ans	25 ans	taux d'incidence entre le premier et le second cancer (2 ^e cancer vs global) chez les femmes âgées entre 20 - 29 ans chez les femmes âgées entre 20 - 44 ans chez les femmes âgées entre 20 - 44 ans (femmes afro-américaines vs femmes blanches) type histologique de la tumeur âge >60 ans (lobulaire vs autre)	le taux d'incidence pour un 2 ^e cancer primaire est 100 X plus élevés que le taux d'incidence pour un cancer du sein RR= 100,2 le taux d'incidence d'un 2 ^e cancer est 25 X plus élevés que le taux d'un cancer du sein RR= 25,1 risque d'un 2 ^e cancer est 50 % plus élevé chez les Afro- Américaines que les blanches risque d'un 2 ^e cancer est 2 X plus élevés si le PCS est de type lobulaire	taux d'incidence spécifique par âge pour 100,000 femmes par intervalles de 5 ans analyse univariée

(54) C. Li (2003) Seattle, Washington	CSC : carcinome infiltrant développé 6 mois après le PCS	PCS invasif n= 1285 (1983-1992) CSC n= 77	21 - 44 ans	moyenne: 9 ans	âge (ans) (≤29 vs >40) IMC selon les critères de Bray (>30 kgm ⁻² vs ≤19,9 kgm ⁻²) IMC quartiles (kgm ⁻²) (22,5 - 25,8 vs ≤20,6) Quartiles de poids (kg) (136 - 155 vs ≤123) HER2 (positif vs négatif) histoire familiale (1 ^{er} degré vs non)	HR= 2,8 (1,1-6,9)* HR= 2,6 (1,1-5,9)* HR= 2,1 (1,1-3,9)* HR= 2,8 (1,4-5,3)* HR= 1,7 (1,0-3,0)* HR= 1,5 (0,9-2,7)*	analyse multivariée ajustée pour : -âge -année au moment du premier diagnostic -stade -chimiothérapie -étude d'où vient la participante
(39) X. Gao (2003) États unis	CSC carcinome localisé ou DCIS, sans envahissement ganglionnaire développé 3 mois après le PCS	cohorte : n= 134,501 (115,606 infiltrant, 18895 DCIS) (1973-1996) PCS n=128,822 CSC n=5,679 -femmes noires/blanches hispaniques/blanches non hispaniques	moyenne: 61 ans	<20 ans	type histologique de la tumeur (médullaire vs DCIS) âge (ans) (>55 vs 45 - 55) (<45 vs 45 - 55) race (femmes noires vs femmes blanches non hispaniques) (femmes des autres races vs femmes blanches non hispaniques) radiothérapie (oui vs non) survie <5 ans	4442 de carcinome infiltrant ont développé un CSC 805 de DCIS ont développé un CSC RR= 1,18 (1,02-1,37)* p=0,03 RR= 1,15 (1,08-1,22)* p=0,0001 RR= 1,07 (0,98-1,16)* p=0,12 RR= 1,2 (1,08 -1,33)* p=0,0009 RR= 0,90 (0,81-0,99)* p=0,037 RR= 1,04 (0,97-1,10)* p =0,29 RR= 0,96 (0,88-1,04)* p=NS	Unité de mesure : 919,046 personnes-années analyse multivariée mutuellement ajustée pour : -âge -race -type histologique -radiothérapie

					survie >5 ans <u>radiothérapie après le cancer primaire chez les femmes <45 ans</u> (oui vs non)	RR= 1,14 (1,03-1,26)* <i>p=0,001</i>	
					survie <5 ans	RR= 0,98 (0,81-1,19)* <i>p=NS</i>	
					survie >5 ans <u>radiothérapie après le cancer primaire chez les femmes >55 ans</u> (oui vs non)	RR= 1,32 (1,06-1,64)* <i>p =0,01</i>	
					survie <5 ans	RR= 0,97 (0,87-1,08)* <i>p=NS</i>	
					survie >5 ans	RR= 1,15 (1,01-1,32)* <i>p =0,04</i>	
(55) N. Volk (1997) Slovénie	-	PCS invasif n= 8971 (1961-1985 CSC n= 547	-	Moyen 7,3 ans	âge (ans) <50 >50 année de diagnostic (entre PCS et CSC)	SIR= 3,0 (2,1-4,3)* SIR= 1,2 (0,9-1,4)* SIR= NS	-
(56) P. Broët (1995) États-Unis	CSC développé 6 mois après le PCS inclusion : -tumeur <70 mm -stade I-III	PCS invasif n= 4,748 (1981-1987) CSC n= 282 -femmes postménopausées n= 2479 femmes préménopausées n= 2269	moyenne:	80 mois 55,5 ans	<u>modèle I</u> âge (ans) (<55 vs >55) type lobulaire de la tumeur (oui vs non) chimiothérapie (oui vs non) <u>modèle II</u> type lobulaire de la tumeur (oui vs non) chimiothérapie (oui vs non) <u>modèle III</u> âge (ans) (<55 vs >55)	RR= 1,40 (1,10-1,78)* RR= 1,50 (1,05-2,18)* RR= 0,54 (0,36-0,81)* RR= 1,70 (1,15-2,51)* RR= 0,40 (0,23-0,67)* RR= 1,36 (1,10-1,73)*	analyse multivariée mutuellement ajustée pour les facteurs de risques : -traitement -âge -type histologie

					type lobulaire de la tumeur (oui vs non)	RR= 1,70 (1,05-2,13)*	
					chimiothérapie (oui vs non)	RR= 0,49 (0,32-0,73)*	
					métastase (oui vs non)	RR= 0,45 (0,35-0,59)*	
					récidive locale (oui vs non)	RR= 0,61 (0,46-0,80)*	
(57) L. E. Rutqvist (1995) Suède	exclusion : -cancer bilatéral -présence de l'histoire familiale	PCS invasif n=2729 (1976-1990)	<71 ans	-	tamoxifène (oui vs non)	RR= 0,6 <i>p</i> <0,01	-
(58) H. Brenner (1993) Allemagne	CSC développé 12 mois après le PCS	PCS invasif n= 9678 (1968-1987) CSC n= 409	-	-	âge (ans) <50 >50	SIR= 4,2 (3,27-5,32)* SIR= 2,05 (1,72-2,43)*	Unité de mesure : 3 642 25 personne-année stratifiée pour : - âge -le temps entre le diagnostique de deux cancers
(72) J. Bernstein (1992) États unis	CSC développé 6 mois après le PCS	PCS invasif n= 4,660 (1980-1982) CSC n= 136	20 - 54 ans	4 - 6 ans	antécédents familiaux du PCS (relative du premier degré vs personne) (relative du deuxième degré vs personne) mère (PCS vs rien) (PCS ≤45 ans vs rien) (CSC vs rien) Sœurs (PCS vs rien) (PCS ≤45 ans vs rien) (CSC vs rien) antécédents familiaux	RR= 1,91 (1,22-2,99)* RR= 1,32 (0,84-2,08)* RR= 1,07 (0,56-2,07)* RR= 2,35 (1,02-5,43)* RR= 2,55 (1,02-6,35)* RR= 3,35 (1,74-6,49)* RR= 3,36 (1,62-6,98)* RR= 0,93 (0,13-6,69)*	analyse multivariée ajustée pour : -âge -nulliparité -âge au premier accouchement -âge à la ménarche -statut ménopausique -antécédente de maladie bénigne du sein -plus haut niveau de scolarité atteint -stade de la tumeur au premier diagnostic -première tumeur avait une composante de l'histologie lobulaire

					premier degré du cancer de l'endomètre (oui vs non)	RR= 2,13 (1,04-4,35)*	
					antécédents familiaux deuxième degré du cancer de l'endomètre (oui vs non)	RR= 2,34 (1,09-5,02)*	
					antécédents familiaux du premier degré du cancer de l'ovaire (oui vs non)	RR= 1,69 (0,42-6,83)*	
					antécédents familiaux du deuxième degré du cancer de l'ovaire (oui vs non)	RR= 0,51 (0,07-3,63)*	
(59) J. Bernstein	CSC développé 6 mois après le PCS	PCS invasif n= 4,660 (1980-1982) CSC n= 136	20 - 54 ans	moyenne: 52 ans	Statut de ménopausale (périménopause vs postménopause)	RR= 1,94 (1,17-3,21)*	analyse multivariée ajustée pour :
(1992)					(préménopause vs postménopause)	RR= 1,08 (0,61-1,91)*	-âge au diagnostic
États-Unis					âge (ans) (35 - 44 vs 24 - 34)	RR= 0,64 (0,35-1,16)*	-âge à la première naissance
					(45 - 54 vs 24 - 34)	RR= 0,79 (0,47-1,34)*	-nulliparité
					race blanche (oui vs non)	RR= 0,75 (0,46-1,21)*	-âge à la ménarche
					tabagisme (oui vs jamais)	RR= 1,24 (0,87-1,77)*	-statut de ménopause
					antécédents personnels de biopsie bénigne du sein (oui vs non)	RR= 1,69 (1,13-2,53)*	-âge à la ménopause
					type lobulaire de la tumeur (oui vs non)	RR= 1,96 (1,17-3,27)*	-stade de la première tumeur au moment du diagnostic
					radiothérapie		-antécédents familiaux de cancer du sein
							-antécédents de maladie bénigne du sein
							-éducation
							-indice Quetelet à l'âge adulte
							-histologie lobulaire de PCS

					(oui vs non) chimiothérapie	RR= 1,19 (0,78-1,80)*	
					(oui vs non) grossesse	RR= 0,56 (0,33-0,96)*	
					hystérotomie	RR= NS	
					contraceptif oral	RR= NS	
					alcool	RR= NS	
					éducation	RR= NS	
					stade du PCS	RR= NS	
					indice Quetelet	RR= NS	
(60) Oxford Group (1992) Royaume-Uni	-	PCS n= 75000	-	-	tamoxifène % de réduction	39 %	-
(61) L. E. Rutqvist (1991) Suède	-	PCS n= 1846	-	-	tamoxifène % de réduction	42 %	-
(62) B. Fisher (1989) États-Unis	-	PCS n= 2644	-	4 ans	tamoxifène % de réduction	55 % <i>p</i> <0,001	-
(64) T. Fornander (1989) Suède	-	PCS n= 1846	-	-	tamoxifène (oui vs non)	RR= 0,55 <i>p</i> <0,05	-
(65) M. J. Kurtz (1988) France	-	PCS n= 2850 CSC n=184	-	-	histoire familiale (oui vs non)	RR= 1,28 <i>p</i> >0,1	non ajusté
(66) CRC working party (1988) Royaume-Uni	-	PCS n= 1912	-	-	tamoxifène (femmes postménopausées) (femmes préménopausées)	RR= 0,49 <i>p</i> =0,08 RR= 1,41 <i>p</i> =0,44	-
(67) R. Murakami (1987) Japon	-	PCS n= 9503 CSC	-	5,7 ans	âge (ans) <45 45-54	RR= 5,9 <i>p</i> <0,01 RR= 3,4 <i>p</i> <0,01	-

		n=344			>55		RR= 3,6 <i>p</i> <0,01	
(68) B. E. Harvey (1985) États unis	-	PCS n= 41109 CSC n= 3984	-	-	âge (ans) <45 45 - 54 >55		RR= 5,4 RR= 3,4 RR= 1,3	-
(63) R. E. Fisher (1984) États-Unis	-	PCS n= 1578 CSC n= 69	-	-	histoire familiale		RR= NS	-
(69) B. L. Webber (1981) États-Unis	-	PCS n= 191 CSC n= 13	-	-	type lobulaire de la tumeur (oui vs non)		RR= 6,55 <i>p</i> <0,01	-
(70) P. Prior (1978) Angleterre	-	PCS n= 21967	-	-	âge (ans) 15 - 44 45 - 59 >60		RR= 5,6 RR= 3,7 RR= 1,8	-
(71) F. G. Robbins (1964) États-Unis	-	PCS n= 1458 CSC n= 91	-	20 ans	âge (ans) <53 >53 morphologie lobulaire		RR= 8,33 RR= 4,94 RR= 1,42	-

BRCA1 : BReast Cancer 1
BRCA2 : BReast Cancer 2
CCI : Carcinome Canalaire Infiltrant
CLI : Carcinome lobulaire invasif
PCS : Premier cancer du sein
CS : Cancer du sein

CSC : Cancer du Sein controlatéral
CSU : Cancer du sein unilatéral
DCIS : Intraductal carcinoma *in situ*
ER : Récepteur des œstrogènes
HER2 : Récepteur épidermique humains 2

HR: Hazard ratio
IMC : Indice de masse corporelle
N : nombre
NS: Non Significative
PCS : Premier Cancer du Sein
NYCRIS :Yorkshire Cancer Registry Information Service
WMCIU :West Midlands Cancer Intelligence Unit

RH : Récepteur hormonaux
RR: Risque relatif
SHR : Subdistribution Hazard Ratio
SIR : Standardized Incidence Ratio
EAPC : annual percent change estimation
* : intervalle de confiance a 95%

Tableau 1.4: Les facteurs de risque de cancer du sein controlatéral dans des études cas-témoins.

Étude	Population				Facteurs étudiés	Résultats	Ajustement/ stratification
	Auteur (année)	Définition de l'étude (durée de l'étude)	Facteur d'appariement	N (cas/témoins)			
(73) J. S. Sisti (2015)	cas-témoin niché dans une cohorte (1985-2009)	<u>étude appariée</u> <u>2:1 pour :</u> -année de naissance (par strate de 5 ans)	CSC n= 1521 PCS infiltrant n= 2212	médiane : 46 ans	âge à la ménarche (≥14 ans vs ≤11 ans)	RR= 0,82 (0,65-1,03)* <i>ptrend=0,02</i>	analyse multivariée ajustée pour les facteurs confondants :
Origine de population	(WE CARE study I et II)	-année de naissance (par strate de 5 ans)	PCS infiltrant n= 2212		nombre de grossesses au PCS (≥4 vs 1)	RR= 0,60 (0,41-0,88)* <i>ptrend=0,005</i>	-âge au PCS -histologie du PCS -histoire familiale -stage au PCS -chimiothérapie
	-âge <55 ans au moment du diagnostic	premier diagnostic (strate de 4 ans)			<u>allaitement maternel</u> avec PCS ER+ (oui vs jamais)	RR= 1,09 (0,81-1,47)* <i>ptrend=p=0,19</i>	-hormonothérapie au PCS -traitement au PCS -âge à la ménarche -âge à la ménopause
	-diagnostiqué entre 1985-2009 avec un PCS infiltrant sans envahissement ganglionnaire	-comté du registre			avec PCS ER- (oui vs jamais)	RR= 0,69 (0,48-1,00)* <i>ptrend = p=0,15</i> <i>p heterogeneity =0,05</i>	-parité -pondéré pour countermatching (triplet radiothérapie)
	-être vivants au moment de contact	<u>appariement (countermatching)</u> <u>g) pour les cas du WE CARE I</u>			<u>âge à la première grossesse</u> avec PCS ER+ (≥30 ans vs <20 ans)	RR= 1,43 (0,87- 2,36)* <i>ptrend=0,18</i>	
	témoins :	<u>pour :</u> -radiothérapie (chaque triplet devait avoir 1			avec PCS ER- (≥30 ans vs <20 ans)	RR= 0,66 (0,35-1,27)* <i>ptrend=0,03</i>	
	un sein controlatéral intact	femme non exposée et 2					
	cas :						
	-CSC diagnostiqué 1 après le PCS						

	moment de contact <u>témoins</u> : -sein controlatéral intact <u>cas</u> : -CSC développé au moins 1 an après le PCS - réside dans le même comté lors des deux diagnostics -aucun diagnostic de cancers antérieurs ou intervenant	-comté du registre -race <u>appariement</u> (<u>countermatchin</u> <u>g) pour les cas</u> <u>du WECARE</u> <u>pour</u> : -radiothérapie (chaque triplet devait avoir 1 femme non exposée et 2 exposées)	Hispanique / Noire / japonaise, chinoise ou philippine / asiatique / autre	(>2 personnes du 1 ^{er} degré affecté vs non) relative du 1 ^{er} degré et 2 ^e degré (affecté âge <45 ans vs non affecté) parents du 1 ^{er} degré (CSC vs non) mère (PCS vs non) (CSC vs non) sœur (PCS vs non) (CSC vs non) âge et latéralité au diagnostic du premier degré affecté (<45 ans avec PCS vs non) (<45 ans avec CSC vs non) (>45 ans avec PCS vs non) (>45 ans avec CSC vs non)	RR= 1,5 (0,8-3,0)* RR= 2,5 (1,1-5,3)* RR= 3,6 (2,0-6,4)* RR= 1,7 (1,2-2,4)* RR= 4,1 (1,8-9,3)* RR= 1,7 (1,1-2,6)* RR= 3,4 (1,5-7,7)* RR= 1,8 (0,9-3,5)* RR= 3,0 (1,1-8,2)* RR= 1,6 (1,2-2,2)* RR= 3,4 (1,7-7,0)*	-chimiothérapie -traitements hormonaux.
(75) B. Saltzman (2012) Ouest de Washington	Cas-témoin niché dans une cohorte (1996-2008) <u>témoins</u> : -être vivants au moment de contact -sein controlatéral intact <u>cas</u> : CSC développé 6 mois après le PCS	étude appariée pour : -âge au PCS (au sein de 12 mois) -année (dans les 12 mois) suivant le diagnostic PCS	CSC : n= 482 PCS n= 1,506 -blanche/ noire/asiatique e/autre	20-74 ans <u>femme traitée par</u> <u>hormonothérapie</u> : <u>risque de développer CSC</u> : selon les récepteurs de PCS (PCS:ER+/HER2+ vs PCS:ER+/HER2-) (PCS:ER-/HER2+ vs PCS:ER+/HER2-) (PCS:ER-/PR-/HER2- vs PCS:ER+/HER2-) durée >1 an entre PCS et CSC (PCS : ER+/PR- vs PCS:ER+/PR+) (PCS:ER-/PR- vs	RC= 0,8 (0,5-1,4)* RC= 2,0 (1,1-3,8)* RC= 1,4 (0,9-2,3)* RC= 1,2 (0,9-1,8)* RC= 1,7 (1,2-2,4)*	analyse multivariée ajustée calculée avec une régression logistique conditionnelle pour : -histologie de la tumeur -stade -chimiothérapie -thérapie hormonale -âge au moment du PCS -date de référence

PCS:ER+/PR+)	
durée >3 ans entre PCS et CSC	
(PCS:ER+/PR- vs	RC= 1,4 (0,9-2,1)*
PCS:ER+/PR+)	
(PCS:ER-/PR- vs	RC= 1,9 (1,3-2,8)*
PCS:ER+/PR+)	
durée >5 ans entre PCS et CSC	
(PCS:ER+/PR- vs	RC= 1,8 (1,1-3,0)*
PCS:ER+/PR+)	
(PCS:ER-/PR- vs	RC= 2,9 (1,8-4,8)*
PCS:ER+/PR+)	
<u>risque de développer CSC avec</u>	
<u>ER+/PR+</u>	
(PCS:ER+/PR- vs	RC= 0,9 (0,6-1,5)*
PCS:ER+/PR+)	
(PCS:ER-/PR- vs	RC= 0,8 (0,5-1,3)*
PCS:ER+/PR+)	
<u>risque de développer CSC avec</u>	
<u>ER+/PR-</u>	
(PCS:ER+/PR- vs	RC= 1,2 (0,6-2,4)*
PCS:ER+/PR+)	
(PCS:ER-/PR- vs	RC= 0,7 (0,3-1,7)*
PCS:ER+/PR+)	
<u>risque de développer CSC avec</u>	
<u>ER-/PR-</u>	
(PCS:ER+/PR- vs	RC= 1,4 (0,7-3,0)*
PCS:ER+/PR+)	
(PCS:ER-/PR- vs	RC= 6,7 (3,8-11,8)*
PCS:ER+/PR+)	
<u>risque de développer CSC avec</u>	
<u>ER+/ HER2-</u>	
(PCS:ER-/PR-/HER2- vs	RC= 0,6 (0,3-1,3)*
PCS:ER+/HER2-)	

<u>risque de développer CSC avec</u>	
<u>ER-/PR-/HER2-</u>	
(PCS:ER-/PR-/HER2- vs	RC= 7,5 (2,7-20,5)*
PCS:ER+/HER2-)	
<u>femme non traitée par</u>	
<u>hormonothérapie :</u>	
<u>risque de développer CSC :</u>	
selon les récepteurs de PCS	
(PCS:ER+/HER2+ vs	RC= 1,0 (0,5-2,1)*
PCS:ER+/HER2-)	
(PCS:ER-/HER2+ vs	RC= 2,1 (1,0-4,3)*
PCS:ER+/HER2-)	
(PCS:ER-/PR-/HER2- vs	RC= 1,2 (0,6-2,2)*
PCS:ER+/HER2-)	
durée >1 an entre PCS et CSC	
(PCS:ER+/PR- vs	RC= 0,9 (0,4-1,9)*
PCS:ER+/PR+)	
(PCS:ER-/PR- vs	RC= 1,6 (1,0-2,4)*
PCS:ER+/PR+)	
durée >3 ans entre PCS et CSC	
(PCS:ER+/PR- vs	RC= 0,8 (0,3-2,2)*
PCS:ER+/PR+)	
(PCS:ER-/PR- vs	RC= 1,8 (1,0-3,0)*
PCS:ER+/PR+)	
durée >5 ans entre PCS et CSC	
(PCS:ER+/PR- vs	RC= 1,4 (0,4-4,3)*
PCS:ER+/PR+)	
(PCS:ER-/PR- vs	RC= 2,6 (1,4-5,0)*
PCS:ER+/PR+)	
<u>risque de développer CSC avec</u>	
<u>ER+/PR+</u>	
(PCS:ER+/PR- vs	RC= 0,8 (0,3-2,0)*
PCS:ER+/PR+)	

(PCS:ER-/PR- vs PCS:ER+/PR+) $RC= 0,7 (0,4-1,4)^*$
risque de développer CSC avec ER+/PR-
(PCS:ER-/PR- vs PCS:ER+/PR+) $RC= 1,0 (0,3-2,8)^*$
risque de développer CSC avec ER-/PR-
(PCS:ER-/PR- vs PCS ER+/PR+) $RC= 4,0 (1,8-9,1)^*$
risque de développer CSC avec ER+/HER2-
(PCS:ER-/PR-/HER2- vs PCS:ER+/HER2-) $RC= 0,3 (0,1-0,9)^*$
risque de développer CSC avec ER-/PR-/HER2-
(PCS:ER-/PR-/HER2- vs PCS:ER+/HER2-) $RC= 10,1 (2,3-43,3)^*$

(76) K. Malone (2010) Danemark	cas-témoin niché dans une cohorte (1985-2000) (WECARE study)	étude appariée 2 :1 pour : -année de naissance (par strate de 5 ans)	CSC n= 705 cancer primaire unilatéral n= 1398	médiane: 46 ans	mutation <i>BRCA1/2</i> (oui vs non)	$RR= 4 (2,8-5,7)^*$	analyses pondérées pour le countermatching (radiothérapie), et ajustées pour l'âge au diagnostic
	-pas d'autres types de cancers	-année du PCS (strate de 4 ans)	non	<35	mutation <i>BRCA1</i> (oui vs non)	$RR= 4,5 (2,8-7,1)^*$	
	-provenant du comté du registre	-comté du registre	hispanique	35 - 44	âge (ans)	$RR= 10,9 (3,4-34,6)^*$	
	-présente des échantillons de sang	-race	hispanique	45 - 54	Intervalle entre PCS et CSC	$RR= 4 (2,1-7,5)^*$	
	témoins :	<u>appariement</u> (countermatchin g) pour les cas :	hispanique	<5 ans	histoire familiale de 1 ^{er} degré	$RR= 2,6 (1-7,2)^*$	
	-PCS infiltrant	-radiothérapie	noire	>5 ans	non	$RR= 4,7 (2,7-8,3)^*$	
	-diagnostic avant 55 ans	(chaque triplet	japonaise	non	oui	$RR= 3,9 (1,7-9,4)^*$	
			chinoise	non	Ancêtres juifs	$RR= 6,1 (3,3-11,2)^*$	
			philippine	oui		$RR= 2,2 (1,0-4,7)^*$	
			autre				

	-pas d'invasion ganglionnaire	devait avoir 1 femme non exposée et 2 exposées)			Non	RR= 5,1 (3,0-8,4)*	
					Oui	RR= 2,3 (0,6-8,9)*	
	-sein controlatéral intact				ethnie		
					blanche	RR= 4,3 (2,7-7,0)*	
	<u>cas:</u>				non hispanique	RR= 4,1 (2,5-6,8)*	
	-CSC (<i>in situ</i> ou infiltrant)				hispanique	RR= 10,4 (1,1-95,3)*	
	développé 1 an après le PCS				noir	RR= 7,0 (0,5-98,2)*	
					<u>mutation BRCA2</u>		
					(oui vs non)	RR= 3,4 (2,0-5,8)*	
					âge (ans)		
					<35	RR= 2,4 (0,5-10,9)*	
					35 - 44	RR= 6,3 (2,6-15,4)*	
					45 - 54	RR= 2,3 (1,0-5,1)*	
					intervalle entre PCS et CSC		
					<5 ans	RR= 4,1 (2,0-8,3)*	
					>5 ans	RR= 2,7 (1,2-6,1)*	
					histoire familiale de 1 ^{er} degré		
					non	RR= 3,3 (1,6-6,5)*	
					oui	RR= 2,9 (1,3-6,8)*	
					Ancêtres juifs		
					non	RR= 3,8 (2,1-6,6)*	
					oui	RR= 1,6 (0,3-7,6)*	
					ethnie		
					blanche	RR= 3,4 (2,0-6,0)*	
					non hispanique	RR= 3,2 (1,8-5,8)*	
					hispanique	RR= 9,3 (0,7-122,7)*	
					noire	RR= 1,2 (0,1-12,0)*	
(77) C. Li (2009)	cas-témoin nichée dans une cohorte (1990-2005)	étude appariée 2 :1 pour : -âge	CSC invasif n= 365	40 - 79 ans	IMC au PCS ¹ (kgm ⁻²) (≥30 vs <25)	RC= 1,5 (1,0-2,1)*	analyse multivariée ajustée calculée avec une régression logistique pour:
Ouest de Washington	inclusion : -récepteurs d'oestrogènes	-année du diagnostic -comté	PCS invasif n= 726 -blanche non		IMC à la date de référence ¹ (≥30 vs <25)	RC= 1,3 (0,9-1,8)*	-utilisation de l'hormonothérapie
					(25 - 29,9 vs <25)	RC= 1,4 (1,0-2,1)*	-âge
					(25 - 29,9 vs <25)	RC= 1 (0,7-1,5)*	-année du PCS
							-comté

positifs (ER+) au PCS	-race / ethnicité	Hispanique/Hispanique	consommation d'alcool au PCS ²		-race / l'origine ethnique
-stade I-III _B	-stade	blanche	(>7cons./sem. vs rien)	RC= 1,7 (1,0-2,9)*	-stade
<u>témoins</u> :		/Asiatique /	(3 - 6,9 cons./sem vs rien)	RC= 1,4 (0,7-2,5)*	-temps de survie
-vivants et résider dans leur comté de diagnostic à partir de leur diagnostic de PCS jusqu'à le 2 ^e diagnostic du cas apparié.		pacifique	(<3 cons./sem vs rien)	RC= 1,6 (1,0-2,5)*	Avec des ajustements précis pour chaque facteur :
<u>cas</u> :		Islandaise	consommation d'alcool entre PCS et date de référence ²		¹ ménopausique au diagnostic PCS
-cancer invasif développé 6 mois après le PCS		/Africaine/ native	(>7cons./sem. vs rien)	RC= 1,9 (1,1-3,2)*	² indices de masse corporelle à la date de référence
		Américaine	(3-6,9 cons./sem vs rien)	RC= 1 (0,5-1,8)*	³ antécédents familiaux du premier degré de cancer du sein
			(<3 cons./sem vs rien)	RC= 1,6 (1,0-2,4)*	
			tabagisme au PCS ³		
			(actuel vs jamais)	RC= 1,8 (1,1-3,2)*	
			(occasionnel vs jamais)	RC= 1,2 (0,8-1,7)*	
			tabagisme à la date de référence ³		
			(actuel vs jamais)	RC= 2,2 (1,2-4,0)*	
			(occasionnel vs jamais)	RC= 1,2 (0,8-1,7)*	
			consommation d'alcool et tabagisme au PCS ^{1 2 3}		
			(>7 cons./sem. et fumeur actuel vs 0 à 6,9 cons./sem. et jamais/ancien fumeur)	RC= 3,7 (1,4-9,8)*	
			(>7 cons./sem. et fumeur jamais/ancien vs 0 à 6,9 cons./sem. et jamais/ancien fumeur)	RC= 0,9 (0,5-1,8)*	
			(0 à 6,9 cons./sem. et actuel fumeur vs 0 à 6,9 cons./sem. et jamais/ancien fumeur)	RC= 1,4 (0,8-2,4)*	
			consommation d'alcool et tabagisme à la date de référence ^{1 2 3}		
			(>7 cons./sem. et fumeur actuel	RC= 7,2 (1,9-26,5)*	

					vs 0 à 6,9 cons./sem. et jamais/ancien fumeur) (>7 cons./sem. et fumeur jamais/ancien vs 0 à 6,9 cons./sem. et jamais/ancien fumeur) (0 à 6,9 cons./sem. et actuel fumeur vs 0 à 6,9 cons./sem. et jamais/ancien fumeur)	RC= 1,2 (0,6-2,1)* RC= 1,5 (0,8-2,8)*	
(78) S. L. Cook (1996) États-Unis	cas-témoins niché dans une cohorte (1978-1990) inclusion : -stade I, II, III -habiter dans un des comtés couverts par le registre -sans cancers antérieurs ou concomitants au moment du PCS <u>témoins</u> : -être vivants au moment de contact -sein controlatéral intact <u>cas</u> : -CSC (<i>in situ</i> ou infiltrant) 6 mois après premier diagnostic	étude appariée 2 :1 pour : -année civile -âge (sur cinq ans des groupes d'âge) -stade de la maladie (I et II, ou III).	CSC n= 216 PCS n= 424	<85 ans	Statut de ménopause au PCS (postménopause globale vs préménopause) (oophorectomie vs préménopause) (postménopause naturelle vs préménopause) <u>femmes préménopausées</u> IMC (kgm ⁻²) (22 - 24 vs <22) (25 - 29 vs <22) (>30 vs <22) parous (oui vs non) parité (2 vs 1) (3 vs 1) (4 - 8 vs 1) histoire familiale du PCS (oui vs non) (mère vs non) (sœur vs non) histologie du PCS (lobulaire vs canalaire	RC= 0,61 (0,29-1,27)* RC= 0,25 (0,09-0,68)* RC= 0,9 (0,39-2,09)* RC= 0,81 (0,35-1,93)* RC= 1,15 (0,52-2,54)* RC= 2,25 (0,93-5,42)* RC= 0,96 (0,44-2,11)* RC= 0,88 (0,29-2,69)* RC= 0,77 (0,24-2,45)* RC= 1,43 (0,32-4,12)* RC= 1,87 (0,83-4,27)* RC= 1,32 (0,46-3,72)* RC= 2,08 (0,51-8,52)* RC= 2,15 (0,58-7,88)*	ORs appariés et ajustés pour : -histoire familiale de premier degré -histologie de la tumeur initiale ORs combinés ajustés pour : -histoire familiale de premier degré -histologie de la tumeur initiale - statut de ménopause au PCS ORs du traitement ajusté pour : -histoire familiale de premier degré -histologie de la tumeur initiale - autres types de traitements

infiltrant	
récepteur ER du PCS (positif vs négatif)	RC= 0,72 (0,32-1,61)*
récepteur PR du PCS (positif vs négatif)	RC= 0,91 (0,33-2,52)*
radiothérapie pour PCS (oui vs non)	RC= 1,24 (0,65-2,36)*
chimiothérapie pour PCS (oui vs non)	RC= 0,84 (0,41-1,73)*
<u>femmes postménopausées</u>	
IMC (kgm ⁻²) (22 - 24 vs <22)	RC= 1,25 (0,64-2,46)*
(25 - 29 vs <22)	RC= 0,76 (0,38-1,51)*
(>30 vs <22)	RC= 0,61 (0,29-1,27)*
parous (oui vs non)	RC= 0,85 (0,46-1,56)*
parité (2 vs 1)	RC= 0,63 (0,29-1,36)*
(3 vs 1)	RC= 0,70 (0,30-1,64)*
(4-8 vs 1)	RC= 0,62 (0,28-1,40)*
histoire familiale du PCS (oui vs non)	RC= 1,85 (1,05-3,27)*
(mère vs non)	RC= 1,25 (0,52-30,1)*
(sœur vs non)	RC= 2,58 (1,20-5,55)*
histologie du PCS (lobulaire vs canalaire infiltrant)	RC= 1 32 (0 65-2 67)*
récepteur ER du PCS (positif vs négatif)	RC= 1,26 (0,58-2,76)*
récepteur PR du PCS (positif vs négatif)	RC= 0,98 (0,47-2,06)*
radiothérapie pour PCS (oui vs non)	RC= 1,36 (0,78-2,36)*

chimiothérapie pour PCS	
(oui vs non)	RC= 0,84 (0,43-1,63)*
<u>femmes pré et postménopause</u>	
IMC (kgm ⁻²)	
(22 - 24 vs <22)	RC= 1,19 (0,72-1,97)*
(25 - 29 vs <22)	RC= 0,96 (0,58-1,6)*
(>30 vs <22)	RC= 0,98 (0,57-1,69)*
parous	
(oui vs non)	RC= 0,89 (0,55-1,44)*
parité	
(2 vs 1)	RC= 0,69 (0,37-1,3)*
(3 vs 1)	RC= 0,71 (0,36-1,39)*
(4 - 8 vs 1)	RC= 0,74 (0,38-1,47)*
histoire familiale du PCS	
(oui vs non)	RC= 1,86 (1,17-2,97)*
(mère vs non)	RC= 1,29 (0,66-2,52)*
(sœur vs non)	RC= 2,56 (1,29-5,05)*
(mère et sœur vs non)	RC= 5,27 (0,97-28,8)*
histologie du PCS	
(lobulaire vs canalaire infiltrant)	RC= 1,47 (0,75-2,74)*
récepteur ER du PCS	
(positif vs négatif)	RC= 0,96 (0,55-1,67)*
récepteur PR du PCS	
(positif vs négatif)	RC= 0,95 (0,52-1,74)*
radiothérapie pour PCS	
(oui vs non)	RC= 1,31 (0,86-1,99)*
chimiothérapie pour PCS	
(oui vs non)	RC= 0,84 (0,51-1,38)*

(79) H. H. Storm	cas-témoins niché	étude appariée	CSC	-	radiothérapie	analyse multivariée
(1992)	dans une cohorte	1:1 pour :	n= 529		(oui vs non)	RR= 1,04 (0,74-1,46)*
États-Unis	(1943-1978)	-âge (±5 ans)	PCS		histoire familiale	
	<u>témoins</u> :	-année civile du	n= 529		(oui vs non)	RR= 1,44 (0,89-2,34)*

	-vivant jusqu'à le diagnostic du CSC des cas appariés -pas d'autres types de cancer autre cancer de la peau non-mélanome <u>cas</u> : -CSC développé 8 ans après le PCS -pas d'autres types de cancer	diagnostic du PCS (± 5 ans) -temps de survie			parité (oui vs non) statue ménopause (oui vs non) IMC (kgm^{-2}) (25 - 29 vs <20) (>30 vs <20)	RR= 0,67 (0,49-0,92)* RR= 0,75 (0,52-1,07)* RR= 1,37 (0,94-2,0)* RR= 1,77 (1,0-3,14)*	
(80) D. J. Boice (1992) États-Unis	cas-témoins niché dans une cohorte (1935-1982) <u>témoins</u> : -vivant jusqu'à le diagnostic du CSC des cas appariés <u>cas</u> : -Cancer du sein développer 5 ans après PCS	étude appariée 2:1 pour : -âge (± 5 ans) -année civile au diagnostic du PCS (± 5 ans) -race -temps de survie	CSC n= 655 PCS n= 1189	-	radiothérapie (oui vs non) survie après traitement (5 - 9 ans vs pas de traitement) (10 - 14 ans vs pas de traitement) (>10 ans vs pas de traitement) (>15 ans vs pas de traitement) âge au moment du traitement (oui vs non) 45 ans 45 - 54 ans >50 ans <u>âge au moment du traitement avec une survie de 10 ans</u> (oui vs non) <45 ans >45 ans histoire familiale (oui vs non)	RR= 1,99 (0,94-1,5)* RR= 0,99 (0,68-1,45)* RR= 1,98 (1,29-3,06)* RR= 1,33 (0,99-1,78)* RR= 0,93 (0,62-1,4)* RR= 1,59 (1,07-2,36)* RR= 0,85 (0,56-1,5)* RR= 1,18 (0,79-1,78)* RR= 1,85 (1,15-2,97)* RR= 1,08 (0,74-1,57)* RR= 1,8	analyse multivariée ajustée pour : -histoire familiale -poids (IMC) -statut de ménopause -statut nodale -nulliparité
(81) P. Horn	registre des tumeurs	étude 1:1 pour :	CSC	-	<u>CSC simultané avec PCS</u>		analyse multivariée ajustée calculée avec une

(1988)	du Connecticut	non appariés	n= 292	type lobulaire de la tumeur		régression logistique non conditionnelle pour :
New	haven,	(CTR)	PCS	(oui vs non)	RC= 1,8 (1,0-3,5)*	-âge
Connecticut	(1935-1983)		n= 264	invasion ganglionnaire		-antécédents familiaux
	<u>témoins :</u>			(oui vs non)	RC= 0,9 (0,6-1,3)*	-histologie de la tumeur
	-vivant jusqu'à le			récepteur de la progestérone		-stade
	diagnostic du CSC			(positif vs négatif)	RC= 3,2 (1,0-9,5)*	-radiothérapie
	des cas appariés			type sanguin		-chimiothérapie
	- pas de			(AB vs O)	RC= 2,3 (0,7-7,7)*	-temps écoulé depuis le diagnostic
	mastectomie			(A vs O)	RC= 0,9 (0,6-1,3)*	-statut de ménopause
	prophylactique du			(B vs O)	RC= 0,9 (0,4-1,5)*	-exposition exogène à l'oestrogène
	sein controlatéral			chimiothérapie pour PCS		
	<u>cas :</u>			(oui vs non)	RC= 0,3 (0,1-0,7)*	
	- CSC (<i>in situ</i> ou			chimiothérapie pour autre		
	infiltrant)			cancer		
				(oui vs non)	RC= 0,4 (0,2-0,9)*	
				histoire familiale		
				(oui vs non)	RC= 2,8 (1,6-4,9)*	
				récepteur oestrogène	RC= NS	
				radiothérapie	RC= NS	
				zones irradiées	RC= NS	
				stade	RC= NS	
				temps entre les 2 diagnostics	RC= NS	
				âge	RC= NS	
				parité	RC= NS	
				statut de ménopause	RC= NS	
				<u>CSC non simultané avec PCS</u>		
				type lobulaire de la tumeur		
				(oui vs non)	RC= 1.4 (0,6-3,4)*	
				invasion ganglionnaire		
				(oui vs non)	RC= 0,9 (0,5-1,4)*	
				radiothérapie		
				(oui vs non)	RC= 1,3 (0,8-2,1)*	
				chimiothérapie		

					(oui vs non)	RC= 0,5 (0,2-1,3)*	
					stade	RC= NS	
					temps entre les 2 diagnostics	RC= NS	
(82) P. Horn	registre des tumeurs	étude 2:1 dont 1	CSC	-	durée entre CSC et PCS		analyse multivariée mutuellement ajustée pour les
(1987)	du Connecticut	témoin apparié	n= 338		(coute durée vs longue durée)	RC= 1,7 (1,2-2,5)*	facteurs d'appariements calculés avec une
Connecticut	(CTR)	pour:	témoins non		<u>témoins non appariés</u>		régression logistique
	(1935-1982)	-âge au premier	appariés		type histologique de la tumeur		
	<u>témoins</u> (2 groupes	diagnostic du	PCS		(lobulaire vs autre)	RC= 2,2 (1,2-4,2)*	
	comparaison):	cancer (±5 ans)	n= 338		étendue de cancer		
	-témoins appariés	-temps écoulé	témoins		(régional vs local)	RC= 1 (0,7-1,5)*	
	-témoins non	depuis le PCS	appariés		(CIS vs local)	RC= 1,3 (0,6-2,8)*	
	appariés		PCS		chimiothérapie		
	-vivante dans		n= 336		(oui vs non)	RC= 1,8 (0,9-3,8)*	
	l'intervalle du		-blanche/		race	RC= NS	
	premier et		autre		radiothérapie	RC= NS	
	deuxième cancer du				âge	RC= NS	
	cas				mariage	RC= NS	
	-sans métastases à				<u>témoins apparié</u>		
	distance au moment				type histologique de la tumeur		
	de la sélection				(lobulaire vs autre)	RC= 3,4 (1,7-6,9)*	
	-vivant jusqu'à le				étendue de cancer		
	diagnostic				(régional vs local)	RC= 1,1 (0,8-1,6)*	
	du CSC des cas				(CIS vs local)	RC= 1,4 (0,6-3,3)*	
	appariés				race		
	- PCS depuis 1935				(blanche vs autre)	RC=0,6 (0,3-1,3)*	
	-< 85 ans au				mariage		
	moment de la				(jamais vs déjà)	RC= 1,2 (0,7-2)*	
	sélection				chimiothérapie		
	-résidente au				(oui vs non)	RC= 1,3 (0,6-2,5)*	
	Connecticut au				radiothérapie	RC= NS	
	moment du						
	diagnostic						
	<u>cas</u> :						

	- CSC (<i>in situ</i> ou infiltrant) entre 1979-1982 -PCS depuis 1935 -résidentes au Connecticut au moment du diagnostic des deux Cancers -< 85 ans pour CSC - sans métastases à distance au moment du CSC						
(83) I. Kato (1986) Japon	étude nichée dans une cohorte (1964-1984) témoins : -vivant jusqu' à le diagnostic du CSC des cas appariés	étude appariée 2:1 pour : -âge (± 3 ans) -temps de l'opération du cancer du sein (± 1 an) -période de survie	CSC n= 115 PCS n= 230	-	histoire familiale (oui vs non)	RC= NS	analyse multivariée ajustée pour les facteurs confondants
(84) T. Hislop (1984) Canada	cas-témoins niché dans une cohorte (1946-1976) témoins (2 groupes comparaison) : -un échantillon de 5% sélectionné aléatoirement -un témoin apparié -vivante dans l'intervalle du	étude appariée 1:1 pour : -âge (± 2 ans) -année de diagnostic du PCS (± 1 an)	CSC n= 275 diagnostiqué durant l'année n= 100 diagnostiqué après la première année n= 175	-	<u>durée <1 an entre CSC et PCS :</u> histoire familiale (oui vs non) types lobulaires (oui vs non) envahissement ganglionnaire antécédent utilisation d'œstrogène (oui vs non) âge au premier enfant maladie bénigne	RR= 1,6 (0,6-4,1)* RR= 4,3 (1,2-23,6)* RR= 0,5 (0,3-1)* RR= 2,4 (1-6,9)* RR= 2,7 (0,6-15,5)* RR= 1,2 (0,5-3,3)*	analyse multivariée ajustée pour -âge au premier enfant -parité -âge la menarche -contraceptif oral -poids -histoire d'autres maladies (cancer, bénigne du sein, hypertension, thyroïde) -type de symptômes -tumeurs multifocales -grade

premier et deuxième cancer du cas <u>cas</u> : -CSC diagnostic <1 an	PCS n= 275	tumeurs multifocales	RR= 3,5 (0,7-34,5)*	-délai entre diagnostic et traitement
		<u>durée >1 an entre CSC et PCS</u> :		-localisation de la tumeur
		histoire familiale		
		(oui vs non)	RR= 3,1 (1,5-7,1)*	
		types lobulaires		
		(oui vs non)	RR= 1 (0,4-2,5)*	
		envahissement ganglionnaire	RR= 1 (0,7-1,5)*	
		antécédent utilisation d'œstrogène		
		(oui vs non)	RR= 1,3 (0,5-3,1)*	
		âge au premier enfant	RR= 1,5 (0,7-3,4)*	
maladie bénigne	RR= 0,5 (0,2-1,3)*			
tumeurs multifocales	RR= 1,7 (0,3-10,6)*			

BRCA1 : BReast CAncer 1

BRCA2 : BReast CAncer 2

cons : Consommation

CSC: Cancer du Sein controlatéral

ER : Récepteur des œstrogènes

HER2 : Récepteur épidermique humains 2

IMC: Indice de masse corporelle

WECARE : Women's Environmental, Cancer,
and Radiation Epidemiology

PCS : Premier Cancer du Sein

PR: Récepteur des progestérones

RC : Rapport de cotes

RR : Risque relatif

sem : semaine

*intervalle de confiance à 95%

Tableau 1.6: La différence de la méthylation de l'ADN et le risque de cancer du sein.

Étude		Population					Technique	Facteur	Résultat	Ajustement	
Auteur (année)	Origine de la population	critères d'inclusion	Facteur d'appariement	N	Types de tissus	âge (ans) cas/témoins	Type d'étude (durée de suivi)				
(206) K. Veldhoven (2015)	Italie	-	EPIC : -date de naissance (± 5 ans)	EPIC : cas : n=162 cancer du sein	Sang	EPIC : 54,4/54,2	étude cas-témoins nichée	-Illumina Infinium Human Methylation 450 BeadChip array pour EPIC et NOWAC	EPIC: -valeur β moyenne (cas vs témoins) -méthylation globale (cas vs témoins)	0,18 % plus faible $P=1,82e-05$ RC per 1 SD = 0,61 (0,47-0,8)* $p = 0,0004$	Ajusté pour - l'âge -analyse tient compte le facteur d'appariements BGS : Ajustement du type de globules blancs
			-mois de recrutement	témoins : n=168		NOWAC : 55,4/55,4		NOWAC			
			-centre d'étude	femmes saines		BGS : 52/52		-Whole-genome bisulphite sequencing pour BGS	- méthylation de l'épigénome entier dans les régions génomiques dehors promoteurs (cas vs témoins)	RC = 0,51 (0,38-0,69)* $p= 1,58 \times 10^{-5}$	
			-année de naissance	cas : n=192							
			-mois de recrutement	cancer du sein					- méthylation l'ADN de l'épigénome de CpG dans les promoteurs (cas vs témoins)	RC = 0,92 (0,64-1,32)* $P= 0,66$	
			BGS : -âge	n=192 femmes saines							
			-ethnie	BGS							
			-date de recrutement	cas : n=548 cancer du sein					NOWAC : -méthylation globale (cas vs témoins)	RC per 1 SD = 1,03 (0,82-1,30)* $P= 0,81$	
				témoins; n=192							
				femmes saines					BGS : -méthylation globale (cas vs témoins)	NS	
(207) G. Severi (2014)	Melbourne, Australie	-	-année de naissance	cas : n=420	Sang	64/64	étude cas-témoins nichée	-Illumina Infinium Human Methylation 450 BeadChip array	méthylation de l'ADN de l'épigénome entier (Q4 > 0,5264 vs Q1<0,5123)	RC =0,42 (0,2-0,9)* $P= 0,026$	Ajusté pour -les facteurs d'appariement -indicateurs de morbidité
			-année de participation de base	adénocarcinome invasif du sein					un incrément d'écart-type	RC =0,69 (0,50-0,95)*	

	-pays d'origine -type d'échantillon de sang de base	n=420 individus sains				test d'hétérogénéité	méthylation l'ADN de l'épigénome de CpG dans les promoteurs fonctionnels (cas vs témoins) méthylation de l'épigénome entier dans les régions génomiques dehors promoteurs (cas vs témoins) méthylation de l'épigénome entier dans les régions génomiques dehors promoteurs dépendant de la durée entre le temps de la collecte de sang au diagnostic (cas vs témoins) <5 ans 5-9 ans >10 ans	<i>P=0,02</i> RC =1,82 (1,20-2,75)* RC =0,63 (0,46-0,85)* <i>P= 0,0002</i> RC =0,49 RC =0,61 RC =0,83 <i>P= 0,10</i>	- le type de globules blancs
(208) A. Kuchiba (2014) Japon	- -âge (dans les trois ans) -zone résidentielle (ville ou zone régionale) au cours de la période d'étude	cas : n=384 patients avec cancer du sein invasif témoins : n=384 individus sains japonaises	sang	54,1 /53,9	étude cas- témoins	-Luminometric Methylation Assay (LUMA)	méthylation de l'ADN globale (T2 (69.1–71.8) vs T1 (≥71.8)) méthylation de l'ADN globale (T3 (<69.1) vs T1 (≥71.8)) niveaux de méthylation globale (cas vs contrôles)	RC =1,87 (1,20-2,91)* RC =2,86 (1,85-4,44)* <i>Valeur-p <0.05</i>	Ajusté pour : -l'âge -les antécédents familiaux de cancer du sein -l'état de tabagisme -le statut de ménopause - l'activité physique -le nombre de naissances -l'apport d'acide folique ajusté en fonction de l'énergie -l'utilisation de suppléments vitaminiques

										-la consommation d'alcool
(211) L. DeRoo (2014) États-Unis et Porto Rico	complète ou demi-sœur avec un cancer du sein	-	cas : n=294 témoins : n= 646	Sang	35-74 ans	étude cas-témoins nichée	-bisulfite pyrosequencing	Niveaux de méthylation LINE-1 (Q1:74,8-75,8 vs Q4:76,6-78,0)	HR=1,75 (1,19-2,59)* P=0,002	Ajusté pour : -l'âge
(214) L. Delgado-Cruzata (2012) New York	-	-	cas : n=273 sœurs atteintes de cancer du sein témoins : n=335 sœurs non atteintes de cancer du sein blanches/hispaniques/autres	Sang	49,6/48,2	étude cas-témoins	- [3H]-methyl acceptance assay dont l'analyse de 233 cas et 295 témoins -dosage de méthylation luminométrique (LUMA) dont l'analyse de 263cas et 321 témoins	méthylation de l'ADN globale (Q4:> 115215 vs Q1:≤ 41692) méthylation de l'ADN globale (Q1≤62,9 vs Q4:>73,0)	RC = 1,8 (1-3,3)* P<0,05 RC = 0,8 (0,41-1,55)* P >0.05	Ajusté pour : -l'âge -l'âge à la première grossesse -l'utilisation de contraceptifs oraux -l'utilisation de la thérapie de remplacement hormonal -l'absorption d'alcool -le statut de mutation de BRCA1 / 2 -le statut de ménopause.
(209) X. Xu (2012) Long Island, New York	-	-âge	cas : n= 1055 témoins : n= 1101	Sang	-	étude cas-témoins	-dosage de LUMA	Méthylation de l'ADN dans le sang périphérique (Q5 >0.67 vs Q1 <0.39)	RC =2,41 (1,83-3,16)* P <0,0001	Ajusté pour : -l'âge

			selon le statut ménopause : n= 1381 femmes pré-ménopauses n= 713 femmes post-ménopauses				-bisulfite pyrosequencing	LINE1 méthylation (Q5 vs Q1)	RC = 1 (0,76-1,3)* P=0,94
(210) HC. Wu (2012) New York	-	-	cas : n=282 Patient avec un cancer du sein témoins : n=347 sœurs non atteintes	Sang	49,5/48	étude cas-témoins	-methyLight ADN traité par bisulfite de sodium dont l'analyse de cas/témoins Sat2 : 266/333 LINE-1 :265/333 Alu :266/334 - bisulfite pyrosequencing LINE-1:279/340	niveaux de méthylation de Sat2 (GB) (Q1:≤25,8 vs Q4:>52,5) niveaux de méthylation de LINE-1 (GB) (Q1:≤72,9 vs Q4:>125,7) niveaux de méthylation d' Alu (GB) (Q1:≤73 vs Q4 (>117.8) niveaux de méthylation de LINE-1 (GB) (Q1:≤73,4 vs Q4:>76,1) niveaux de méthylation de Sat2, LINE-1, Alu dans granulocyte	Ajusté pour : -l'âge -les autres éléments répétitifs RC = 2,12 (0,88–5,11)* RC = 0,97 (0,41–2,32)* RC =1,42 (0,62–3,27)* RC = 0,93 (0,46–1,89)* NS
(176) K. Brennan (2012) Australie, Europe, Nouvelle-Zélande et Royaume-Uni	KConFab cas : diagnostiqué au moins 1 mois après le prélèvement de sang témoins : pas d'histoire familiale	BGS : -source de recrutement -année d'achèvement du questionnaire de base -ethnie (blanc seulement) -date de naissance (±12 mois) -disponibilité de l'échantillon de sang	KConFab cas : n= 153 patients avec un cancer du sein invasif témoins : n= 218 BGS cas : n= 241 patientes avec cancer du sein invasif témoins : n= 242	Sang	KConFab 50/60 BGS 54/54 EPIC 52/52	étude cas-témoins nichée	bisulfite pyrosequencing	niveaux de méthylation de LINE-1 (cas vs témoins) KConFab BGS EPIC	BGS et EPIC résultats sont ajustés pour les facteurs d'appariement P=0,2 P=0,96 P=0,89

		-durée pendant laquelle l'échantillon de sang a été envoyé par la poste EPIC : -âge à la ligne de base -centre de recrutement -date et heure de la collecte du sang	EPIC cas : n= 232 patientes avec cancer du sein invasif témoins : n= 263							
(212) N. Kitkumthorn (2012) Thailand	-	-	cas : n= 36 femmes avec carcinome canalaire invasif témoins : n= 144 ensembles des femmes et hommes	Sang	50,28/48,67	étude cas-témoins	COBRA	niveaux de méthylation de LINE-1 (cas vs témoins)	NS	-
(162) YH. Cho (2010) Turquie	-non traités par chimiothérapie avant l'opération -tumeurs >2 cm - échantillon s traités dans les 3 à 4 h de Collection -tissu	-race	cas : n= 40 tissus de cancer canalaire invasif du sein n= 27 tissus normaux adjacents n= 40 globule blanc n= 40 témoins : individus sains n= 40	Sang	50,8 /48,3	étude cas-témoins	-methyLight dosage : ADN traité par bisulfite de sodium	sat2M1 dans l'ADN de GB (cas vs témoins) LINE-1 dans l'ADN de GB (cas vs témoins) Alu dans l'ADN de GB (cas vs témoins)	<i>P=0,01</i> NS NS	Ajuté pour : -l'âge

	normal adjacent est 12-15 cm de la tumeur primaire		globules blancs selon le statut ménopause : n= 41 femmes pré-ménopauses n= 35 femmes post-ménopauses							
(213) JY. Choi (2009)	-	-âge -race	cas : n=176	Sang	35-75 ans	étude cas-témoins	-mass spectrométrie dont l'analyse de cas/témoins 19/18	niveau de 5-méthyldeoxycytosine (5-mdC) dans l'ADN des leucocytes (cas vs témoins)	plus faible <i>P=0,001</i>	Ajusté pour : -l'âge -la race
Buffalo, New York			cancer du sein au stade précoce (I-IIIa) témoins : n= 173 individus sains femmes caucasiennes/ afro-Américaines n= 132 femmes pré-ménopauses n= 192 femmes post-ménopauses					5-mdC (faible méthylation T1 VS haute méthylation T3) (T2 vs T3) RC = 2,86 (1,65-4,94)* RC = 1,49 (0,84-2,65)* <i>P=0,176</i>		
							-bisulfite pyrosequencing	Méthylation de LINE-1 (cas vs témoins)	NS	

Alu: Arthrobacter luteus

BGS: Breakthrough Generations Study

EPIC: European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition

HR: Hazard Risque

LINE-1: Long interspersed elements

LUMA: Luminometric Methylation Assay (LUMA)

N: nombre

NOWAC: Norwegian Women and Cancer study

*Intervalle de confiance à 95%

RC: rapport de cotes

NS: Non Significatif

OR: Odds Ratio

Q: Quartile

SD: Standard Deviation

Sta2: Signal transducer and activator of transcription

T: Tertile

5-mdc: 5-methyl-deoxy-cytidine

GB : Globule blanc

Tableau 5.6.1: Les gènes impliqués dans les voies de signalisation, les fonctions et les maladies affectées par les sites différentiellement méthylés entre les contrôlatéraux et les primaires.

Gènes hypométhylés		Gènes hyperméthylés	
Voie de signalisation	Valeur-p	Voie de signalisation	Valeur-p
Voie de signalisation D1/AMPC/PKA/DARPP-32 (<i>PPP1R10, CREBBP, CACNA1C</i>)	0,0062	Voie de signalisation du diabète type 2 (<i>IRS4, TNFRSF1B, PRKD1</i>)	0,00853
Potentialisation synaptique à long terme (<i>PPP1R10, CREBBP, CACNA1C</i>)	0,00268	Voie de signalisation de MAPK induite par UVC (<i>MAPK11, PRKD1</i>)	0,00846
Voie de signalisation de NGF (<i>CREBBP, TRIO</i>)	0,0299	Biosynthèse de Cofacteur à molybdène (<i>MOCOS</i>)	0,00329
Voie de signalisation de p53 (<i>TP73, PLAGL1</i>)	0,0271	Cycle de l'urée (<i>ARG1</i>)	0,0196
Voie de signalisation d'ATM (<i>TP73, CREBBP</i>)	0,0147	Dégradation de l'arginine I (voie d'Arginase) (<i>ARG1</i>)	0,0131
Fonction	Valeur-p*	Fonction	Valeur-p*
Morphologie cellulaire (<i>Akt, CACNA1C, CD3, CLMN, CPLX1, CPLX3, CPT1A, Creb, CREBBP, DHRS4, ERK1/2, GBX1, HISTONE, Histoneh3, HULC, Jnk, MAGI3, MCF2L, NELL2, NRGN, P38, MAPK, PAX7, Pkc(s), PLAGL1, SLC12A4, SLC6A19, TAS1R1, TP73, TRIO, Vegf, VWF, WDFY2, ZNF239</i>)	0,0496	Expression du gène (<i>APCDD1, BMPER, CD300LG, CHST15, DLX1, EN1, ENOX2, EVX1, FRZB, GBP3, GBP4, GDF3, GPC4, IER5, IRX3, KIF16B, KRTAP103, KRTAP109, LHX2, Macf1, Oasl2, OTX1, PCSK6, Pdlim3, POU5F1, RGS17, Sox, SOX2, SOX3, SPG7, TBC1D16, TNFRSF19, TNP2, TWSG1, WNT8B</i>)	0,0065
Cycle cellulaire (<i>CACNA1C, CAMK2N1, DMPK, CREBBP, MYF6, PLAGL1, PPP1R10, TP73, mir-7</i>)	0,0496	Assemblage et organisation cellulaire (<i>APLP2, CASP14, FAT1, FZD5, PCDHB11, PCDHGA1, PCDHGA4, PDZRN3, PTPRU, TNXB, FGF13, MAPK11, MCF2, RP1, TFAP2A, TNFRSF1B</i>)	0,0256
Fonctionnement et maintenance cellulaire (<i>CREBBP, GJB6, ARF3, NELL2, VWF, CACNA1C, CPLX1, RPH3AL, SLC12A4</i>)	0,0496	Interactions cellule-cellule (<i>ARX, BUD13, CASP14, CYFIP1, DMXL1, DOT1L, EED, GRWD1, HIF1A, HRK, IPO4, IPO9, KIF24, MCTS1, MDM2, METTL23, MSRB3, MYCN, NCOA5, Npm, NPM1, NPM2, NPM3, NUDT12, P4HA2, PDLIM1, ROBO1, RPL41, RPS23, RPS28, RPS27L, RPS3A, RUNX2, SCT, TMEM79</i>)	0,0228
Transport moléculaire (<i>CACNA1C, CD3, CLMN, CPLX1, CPLX3, CPT1A, Creb, CREBBP, DHRS4, ERK1/2, GBX1, HISTONE, Histoneh3, HULC, Jnk, MAGI3, MCF2L, NELL2, NRGN, P38, MAPK, PAX7, Pkc(s), PLAGL1, SLC12A4, SLC6A19, TAS1R1, TP73, TRIO, Vegf, VWF, WDFY2, ZNF239, AKT</i>)	0,0474	Mort et survie cellulaire (<i>ADORA3, CDK11B, DOT1L, EN1, FAT1, MAPK11, MCF2, PCDHGA1, PCDHGA4, PCSK6, PRKD1, TFAP2A, TNFRSF1B, LHX2, GABRB3, MSRB3, SPG7, ARX, KCND2</i>)	0,0228
Croissance et prolifération cellulaire (<i>CREBBP, MCF2L, mir-7, PAX7, PLAGL1, TP73, VWF, MYF6</i>)	0,0451	Métabolisme des acides aminés7 (<i>ARG1, SLC13A3, SLC17A7</i>)	0,0228
Maladies	Valeur-p*	Maladie	Valeur-p*

Lésions organiques et anomalies (<i>CACNA1C, CHRNA2, CREBBP, TP73, VWF, PAX7, ACACB, ANKRD1, ARF3, ASPM, CAMK2N1, DAZAP1, DEPTOR, ELAVL1, EPHB4, FCHSD2, FGF6, FNBP1, FNDC3B, GRAMD3, IL13RA1, KIF6, KPNA6, MAP4K1, mir7, MSI2, MSL1, MYF6, NUPR1, PPF1BP2, SE, RTAD2, SETD3, SNX16, SPEG, SPOCK1, TGFB1, TMEM101, TRERF1, UBE4B, VSIG10, WNT11, CREB3, MFS11</i>)	0,0496	Lésions organiques et anomalies (<i>ADORA3, APLP2, ARG1, ARGLU1, ARX, CACNA1C, CASC2, CASP14, CD1A, CD300LG, CDK11B, DDX25, DMXL1, DNAH5, DOT1L, EN1, ENOX2, FAT1, FGF13, FZD5, GABRB3, GPC4, HECW1, IRS4, JAKMIP1, KCND2, LHX2, MAPK11, MARCH1, MBOAT4, MCF2, MCTS1, MOCOS, MSRB3, NPM2, NUDT12, PANX2, PCDHB11, PCDHGA1, PCDHGA4, PCSK6, PDZRN3, PLD5, PRKD1, PRRC2A, PTPRU, RP1, RP2, RPH3AL, SERPINB11, SLC13A3, SLC17A7, SOX3, SPATA18, SPATS2L, SPG7, SYT15, TBC1D16, TFAP2A, TMEM185A, TMEM79, TNFRSF1B, TNNC2, TNXB, ZNF366</i>)	0,0254
Maladie neurologique (<i>CDH23, CREBBP, EFNA3, GJB6, PLAGL1, TP73, TRIO, CPT1A, DMPK, MATR3, MYF6, CACNA1C, CHRNA2, ZNF239, VWF</i>)	0,0480	Cancer (<i>ADORA3, APLP2, ARG1, ARGLU1, ARX, CACNA1C, CASC2, CASP14, CD1A, CD300LG, CDK11B, DDX25, DMXL1, DNAH5, DOT1L, EN1, ENOX2, FAT1, FGF13, FZD5, GABRB3, GPC4, HECW1, IRS4, JAKMIP1, KCND2, LHX2, MAPK11, MARCH1, MBOAT4, MCF2, MCTS1, MOCOS, MSRB3, NPM2, NUDT12, PANX2, PCDHB11, PCDHGA1, PCDHGA4, PCSK6, PDZRN3, PLD5, PRKD1, PRRC2A, PTPRU, RP1, RP2, RPH3AL, SERPINB11, SLC13A3, SLC17A7, SOX3, SPATA18, SPATS2L, SPG7, SYT15, TBC1D16, TFAP2A, TMEM185A, TMEM79, TNFRSF1B, TNNC2, TNXB, ZNF366</i>)	0,0240
Cancer (<i>ARFGEF3, CACNA1C, CDH23, CPT1A, CREBBP, DMPK, FAM155B, GJB6, GNLI, IFITM5, KIF6, LHFPL4, MAGI3, MICALL2, MYF6, NELL2, PAX7, PLAGL1, RPH3AL, SLC12A4, SLC6A19, SNTG2, SPEG, TP73, TRIO, VSIG10, VWF, WDFY2, ZNF239, AP1M2, ARF3, ARFGEF3, CACNA1C, CAMK2N1, CDH23, CHRNA2, CPT1A, CREBBP, ECHDC1, EFNA3, FAM155B, GJB6, GNLI, KIF6, KLK10, LHFPL4, MAGI3, MATR3, MCF2L, MICALL2, mir7, MSL1, MYF6, NELL2, PAX7, PPP1R10, RPH3AL, SLC12A4, SLC6A19, SNTG2, SPEG, SPOCK1, TP73, TRIO, VSIG10, VWF</i>)	0,0479	Maladie neurologique (<i>APLP2, ARX, EN1, GABRB3, KCND2, LHX2, MCF2, PCSK6, RP1, SLC17A7, SPG7, TFAP2A, TNFRSF1B, SOX3, MSRB3, ARG1, KCND2, ADORA3, CACNA1C, FGF13, GPR88, PRRC2A, SLC17A7, TNNC2, TNXB</i>)	0,0230
Maladie cardiovasculaire (<i>CHRNA2, CACNA1C, CPT1A, SLC12A4, TRIO, SLC12A4, VWF, TP73, DMPK, PPP1R10, MCF2L</i>)	0,0475	Maladie gastro-intestinale (<i>APLP2, CACNA1C, CD300LG, CDK11B, DNAH5, DOT1L, EN1, FAT1, FGF13, GABRB3, HECW1, IRS4, JAKMIP1, KCND2, LHX2, MAPK11, MCF2, NPM2, PCDHGA1, PCDHGA4, PDZRN3, PRKD1, PRRC2A, PTPRU, RP1, RP2, RPH3AL, SOX3, SPATA18, SPG7, SYT15, TBC1D16, TNXB, ZNF366</i>)	0,0228
Trouble héréditaire (<i>SLC6A19, ECHDC1, NELL2, SPOCK1, TRIO, CHRNA2, CDH23, GJB6, SLC6A19, CACNA1C, CHRNA2, CREBBP, DMPK, mir-7, SPEG, CPT1A, ECHDC1, GNLI</i>)	0,0451	Maladies et affections dermatologiques (<i>ADORA3, APLP2, CACNA1C, CASP14, CD1A, CD300LG, DDX25, DMXL1, DNAH5, DOT1L, EN1, FAT1, FGF13, FZD5, GABRB3, HECW1, JAKMIP1, KCND2, LHX2, MAPK11, MARCH1, MBOAT4, MCF2, MSRB3, PANX2, PCDHB11, PCDHGA1, PCDHGA4, PLD5, PRKD1, PRRC2A, PTPRU, RP1, RPH3AL, SERPINB11, SLC13A3, SPATA18, SPG7, SYT15, TBC1D16, TMEM185A, TMEM79, TNFRSF1B, TNXB, ZNF366</i>)	0,0131

() nom du gène

Tableau 5.11.1 : Les gènes impliqués dans les voies de signalisation, les fonctions et les maladies affectées par les sites différentiellement méthylés entre les primaires et les bénins.

Gènes hypométhylés		Gènes hyperméthylés	
Voie de signalisation	Valeur-p	Voie de signalisation	Valeur-p
Communication entre les cellules immunitaires innées et adaptées (<i>HLA-C, CD8A</i>)	0,0223	Dégradation de 4-aminobutyrate I (<i>ABAT</i>)	0,00985
Signalisation du cancer de la vessie (<i>FGF13, FGF19</i>)	0,0214	Voie de présentation des antigènes (<i>HLA-DRB1, HLA-DQB1</i>)	0,00697
Signalisation de carcinome basocellulaire (<i>BMP7, FZD1</i>)	0,0150	Dégradation d'alanine (<i>ABAT</i>)	0,00658
Régulation de la voie de transition épithéliale-mésenchymateuse (<i>FZD1, FGF13, FGF19</i>)	0,0130	Développement de cellule B (<i>HLA-DRB1, HLA-DQB1</i>)	0,00593
Dégradation de la phényléthylamine I (<i>ALDH2</i>)	0,0103	Rôle de l'Oct4 dans les cellules souches pluripotentes embryonnaires de mammifères (<i>FGF4, WWP2</i>)	0,0101
Fonction	Valeur-p*	Fonction	Valeur-p*
Biochimie des petites molécules (<i>ALDH2, NRTN, BMP7, CYP26C1, DGKG, DGKQ, TEKTA, PGR, PTPRN2, ST6GALI, CAMTA1, SLC35F3, SLC22A16, PGR, PGR, FGF19, PGR, PTPRN2, RPH3AL, CYP26C1</i>)	0,0331	Morphologie cellulaire (<i>FGF4, HCN2, SLC1A6, SNCA, WWP2, NRG1, CALCOCO2, RADIL, HCN2, FGF4, INSR, DAPK1, MINK1, SORCS2, RALGDS</i>)	0,0293
Interactions cellule-cellule (<i>ADGRB1, BMP7, FGF19, MAD1L1, PGR, ST6GALI, ALDH2, NRTN, LY75, CD8A, TYRO3, MAD1L1, MARK2, PTPRN2, FZD1, LTBP1</i>)	0,0306	Interactions cellule-cellule (<i>INSR, MINK1, NRG1, RADIL, RALGDS, ABAT, SNCA, SORCS2MAEA, FGF4, RDH5, TSC22D3, HLA-DQB1, HCN2, SLC1A6, HCN2, LHX1, WNT10A, MKNK2, ABAT, SH2D3C</i>)	0,0293
Métabolisme médicamenteux (<i>ALDH2, NRTN, BMP7, CYP26C1, PGR, PTPRN2, CAMTA1, PGR</i>)	0,0306	Assemblage et organisation cellulaire (<i>MINK1, NRG1, SNCA, HCN2, SLC1A6, WWP2, INSR, BRD4, LTBP2, SH2D3C, RALGDS</i>)	0,0293
Présentation de l'antigène (<i>CD8A</i>)	0,00259	Biochimie des petites molécules (<i>ABAT, CYP2A6, SNCA, SORCS2, INSR, LCLAT1, SLC1A6, LCLAT1, ELOVL6, RDH5, PNLIIPRP2, A, BAT, FAM20C, LDHC, LRRK1, PFKL</i>)	0,0287
Mouvement cellulaire (<i>ADGRB1, ALDH2, BMP7, CD8A, CYP26C1, FGF13, FGF19, KRT19, MAD1L1, MARK2, NRTN, PGR, SLC</i>)	0,0258	Métabolisme médicamenteux (<i>ABAT, SNCA, SORCS2, CYP2A6, NRG1, INSR</i>)	0,0261

22A16,ST6GALI,TEKT4,TYRO3)			
Maladies	Valeur-p*	Maladies	Valeur-p*
Lésions organiques et anomalies (ADGRB1,AGO2,ALDH2,ANO2,ATP11A,BMP7,C1QL4,CAMTA1,CASKIN1,CD8A,CRB2,CYB5R2,CYP26C1,DBX2,DGKG,DGKK,DGKQ,FGF13,FGF19,FZD1,GGA1,HLAC,IRX6,KIF25,KLHL14,KRT19,LBX2,LTBP1,LY75,MAD1L1,MARK2,MIER2,NRTN,OLFM3,PAQR6,PCDHGA4,PGR,POU6F1,PPP1R13L,PRDM16,PTPRN2,RAI1,RCVRN,RPH3AL,SLC16A5,SLC22A16,SLC35F3,SLFN12,ST6GALI,SYT6,TEKT4,TSPAN6,TYRO3,ZNF560)	0,0331	Maladie immunologique (FASTK,HLA-DQB1,HLA-DRB1,ESAM,FGF4,TSC22D3)	0,0293
Cancer (ADGRB1,AGO2,ALDH2,ANO2,ATP11A,BMP7,C1QL4,CAMTA1,CASKIN1,CD8A,CRB2,CYB5R2,CYP26C1,DBX2,DGKG,DGKK,DGKQ,FGF13,FGF19,FZD1,GGA1,HLAC,IRX6,KIF25,KLHL14,KRT19,LBX2,LTBP1,LY75,MAD1L1,MARK2,MIER2,NRTN,OLFM3,PAQR6,PCDHGA4,PGR,POU6F1,PPP1R13L,PRDM16,PTPRN2,RAI1,RCVRN,RPH3AL,SLC16A5,SLC22A16,SLC35F3,SLFN12,ST6GALI,SYT6,TEKT4,TSPAN6,TYRO3,ZNF560)	0,0331	Cancer (ABAT,AFF2,ARHGEF10,ATP11A,BRD4,CALCOCO2,CARS2,CASQ1,CNGB1,COX6A2,CXorf38,CYP2A6,DACT2,DAPK1,EFCAB2,ELOVL6,ESAM,FAM20C,FAM24B,FAM57A,FAM57B,ASTK,FBN3,FBRSL1,FGF4,FOKK1,HCN2,HLA,DQB1,HLADRB1,HNRNPM,IGSF21,INSR,IQSEC2,KCNK9,KIFC2,LCLAT1,LDHC,LRRK1,LTBP2,MAEA,MINK1,MISP,MKNK2,NRG1,P4HA3,PDE6B,PEX11G,PFKL,PMEP1,PROZ,RADIL,RALGDS,RDH5,SH2D3C,SHROOM2,SLC1A6,SLC22A17,SNCA,SORCS2,TFCP2L1,TMEM132C,TMEM179,TRIM14,TSC22D3,UBA1,WNT10A,WWP2)	0,0289
Trouble du développement (BMP7,FGF19,LTBP1,PGR,CYP26C1,ALDH2,DGKG,FGF13,CRB2,CAMTA1,RAI1)	0,0331	Maladie hématologique (ESAM,FGF4,INSR,KCNK9,TSC22D3)	0,0261
Maladie gastro-intestinale (AGO2,ALDH2,ANO2,ATP11A,BMP7,C1QL4,CAMTA1,CASKIN1,CD8A,CRB2,CYB5R2,CYP26C1,DBX2,DGKG,DGKK,FGF13,FGF19,FZD1,GGA1,HLAC,IRX6,KIF25,KLHL14,KRT19,LBX2,LTBP1,LY75,MAD1L1,MARK2,MIER2,OLFM3,PAQR6,PCDHGA4,PGR,PPP1R13L,PRDM16,PTPRN2,RAI1,RCVRN,RPH3AL,SLC22A16,SLC35F3,SLFN12,ST6GALI,SYT6,TEKT4,TYRO3,ZNF560)	0,0331	Maladie neurologique (AFF2,INSR,IQSEC2,KCNK9,SLC1A6,SNCA,ABAT,CASQ1,NRG1,HLA-DQB1,HLA-DRB1,FAM20C,ARHGEF10,UBA1,DAPK1,ABAT,SORCS2,WNT10A,SH2D3C,NRG1)	0,0261
Maladie du système reproducteur (AGO2,ATP11A,FGF19,LY75,MAD1L1,PCDHGA4,PGR,PTPRN2,SLC16A5,SLC22A16,ST6GALI,TYRO3,FZD1,PGRAGO2)	0,0298	Maladie psychologiques (ABAT,CASQ1,INSR,NRG1,SLC1A6,HLA-DQB1,HLA-DRB1,SNCA,CYP2A6,LCLAT1,SORCS2)	0,0198

() nom du gène