RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINSTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ ORAN 1 AHMED BEN BELLA

FACULTÉ DE MÉDECINE
DÉPARTEMENT DE PHARMACIE

N° d'ordre : .....

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES MÉDICALES

Docteur ZENDJABIL Mustapha

Maître Assistant en Biochimie

IDENTIFICATION D'UN PROFIL DE MICROARN CIRCULANTS POUVANT SERVIR DE BIOMARQUEUR POTENTIEL DU CANCER DU SEIN

Présentée et soutenue publiquement le : 03/07/2022

Présidente du jury

BENRAHAL ép. TALEB Faouzia	Professeur	Faculté de Médecine d'Oran

Membres du jury

BENCHIKH Nasreddine	Professeur	Faculté de Médecine de Mostaganem
DELLAOUI Yahia	Professeur	Faculté de Médecine d'Oran
MOULAY El Hadj	Professeur	Faculté de Médecine d'Oran
BELDJILALI Mohamed	Professeur	Faculté de Médecine d'Oran

Directeur de thèse

BOURROUBEY Hadj	Professeur	Faculté de Médecine d'Oran

Co-directrice de thèse

SAADI ép. OUSLIM Amal Soulef	MCA	Faculté de Médecine d'Oran

Année : 2022

Résumé

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme. Les microARN sont des acides nucléiques d'une vingtaine de nucléotides qui régulent au niveau post-transcriptionnel environ un tiers du génome. Les microARN sont associés à plusieurs maladies cancéreuses, dont le cancer du sein. Grâce à leurs différentes formes de transport, les microARN sont stables et peuvent être détectés dans les liquides biologiques comme le sang ou les urines. L'objectif de cette étude consiste à identifier un profil plasmatique de microARN, capable de discriminer les patientes atteintes du cancer du sein des femmes saines.

Dans cette étude prospective, des échantillons sanguins ont été prélevés sur 120 personnes, comprenant 60 patientes atteintes d'un cancer du sein nouvellement diagnostiqué en tant que groupe de cas et 60 femmes en bonne santé appariées sur l'âge en tant que groupe témoin. Le niveau d'expression de quatre microARN (miR-16, miR-21, miR-96 et miR-155) a été déterminé par qRT-PCR (*quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*). MiR-16 a servi à la normalisation de l'expression des trois autres microARN. En outre, les marqueurs tumoraux sériques classiques CA 15-3 (*Cancer Antigen 15-3*) et ACE (Antigène Carcino-Embryonnaire) ont été dosés par une méthode immunochimique.

Nous avons retrouvé une surexpression des trois microARN (miR-21, miR-96 et miR-155) dans le plasma des patientes atteintes du cancer du sein par comparaison aux témoins ($p < 0.001$, $p < 0.001$ et $p = 0.004$ respectivement). L'expression de ces microARN est associée à certaines caractéristiques cliniques des patientes, notamment le type histologique de la tumeur. L'analyse des performances diagnostiques de ces microARN pris séparément ou sous forme de combinaison, a révélé que la signature moléculaire offrant la meilleure performance est l'association de miR-21 avec miR-96 (ASC : 0.933, IC95% : 0.887 – 0.980) qui présente une sensibilité et une spécificité de 91.7 % et 83.3 % respectivement. Ces résultats sont nettement plus importants que ceux du CA 15-3 (ASC : 0.623, IC95% : 0.522 – 0.723) et de l'ACE (ASC : 0.522, IC95% : 0.415 – 0.624).

En conclusion, nous avons identifié trois microARN, en particulier l'association miR21 et miR-96, pouvant servir de nouveaux biomarqueurs non invasifs du cancer du sein.

Mots clés : cancer du sein ; microARN ; biomarqueurs ; qRT-PCR ; plasma.

Abstract

Breast cancer is the most common cancer in women. MicroRNAs are nucleic acids of about twenty nucleotides which regulate at the post-transcriptional level about one third of the genome. MicroRNAs are associated with several cancers, including breast cancer. Thanks to their different forms of transport, microRNAs are stable and can be detected in biological fluids such as blood and urine. The aim of this study is to identify a plasma microRNA profile able of discriminating breast cancer patients from healthy women.

In this prospective study, blood samples were collected from 120 participants, including 60 newly diagnosed breast cancer patients as the case group and 60 age-matched healthy women as the control group. The expression level of four microRNAs (miR-16, miR-21, miR-96 and miR-155) was determined by qRT-PCR (quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction). MiR-16 served to normalize the expression of the other three microRNAs. In addition, the classical serum tumor markers CA 15-3 (Cancer Antigen 15-3) and CEA (Carcinoembryonnic Antigen) were mesured by an immunochemical method.

We found an overexpression of the three microRNAs (miR-21, miR-96 and miR-155) in the plasma of patients with breast cancer compared to controls ($p < 0.001$, $p < 0.001$ and $p = 0.004$ respectively). The expression of these microRNAs is associated with certain clinical characteristics of the patients, in particular the histological type of the tumour. Analysis of the diagnostic performances of these microRNAs taken separately and in form of combinations, revealed that the best diagnosis performance is offered by the association of miR-21 and miR-96 (AUC : 0.933, 95% CI : 0.887 – 0.980) which has a sensitivity and specificity of 91.7% and 83.3% respectively. These results are significantly higher than those of CA 15-3 (AUC : 0.623, 95% CI : 0.522 – 0.723) and ACE (AUC : 0.522, 95% CI : 0.415 – 0.624).

In conclusion, we have identified three microRNAs, in particular the combination of miR21 and miR-96, that can serve as new non-invasive biomarkers for breast cancer.

Keywords : breast cancer ; microRNA ; biomarkers ; qRT-PCR ; plasma.

ملخص

سرطان الثدي هو السرطان الاكثر شيوعا عند النساء. MicroRNAs هي أحماض نووية لحوالي عشرين نيوكليوتيد والتي تنظم على مستوى ما بعد النسخ حوالي ثلث الجينوم. ترتبط MicroRNAs بالعديد من الأمراض السرطانية، بما في ذلك سرطان الثدي. بفضل أشكال النقل المختلفة، فإن microRNAs مستقرة ويمكن اكتشافها في السوائل البيولوجية مثل الدم أو البول. الهدف من هذه الدراسة هو تحديد ملف تعريف من microRNAs في البلازما القادر على التمييز بين مرضى سرطان الثدي والنساء الأصحاء.

في هذه الدراسة الاستباقية، تم أخذ عينات دم من 120 شخصًا، بما في ذلك 60 مريضًا تم تشخيصهم حديثًا بسرطان الثدي كمجموعة الحالة و60 من النساء الأصحاء المتطابقين مع العمر كمجموعة التحكم. تم تحديد مستوى التعبير لأربعة microRNAs (miR-16, miR-21، miR-96 و miR-155) بواسطة qRT-PCR (quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction). عملت MiR-16 على تطبيع التعبير عن microRNAs الثلاثة الأخرى. بالإضافة إلى ذلك، تم تقييم علامات ورم المصل الكلاسيكي CA 15-3 (Cancer Antigen 15-3) و ACE (Carcinoembryonnic Antigen) بطريقة كيميائية مناعية.

وجدنا إفراطًا في التعبير عن microRNAs الثلاثة (miR-21، miR-96 و miR-155) في بلازما مرضى سرطان الثدي مقارنةً بمجموعة التحكم ($p < 0.001$، $p < 0.001$ و $p = 0.004$) على التوالي .يرتبط التعبير عن هذه الجزيئات الدقيقة بخصائص سريرية معينة للمرضى، لا سيما النوع النسيجي للورم. كشف تحليل الأداء التشخيصي لهذه الجزيئات الدقيقة المأخوذة بشكل منفصل أو في شكل مزيج أن التوقيع الجزيئي الذي يقدم أفضل أداء هو ارتباط miR-21 مع miR-96 (AUC: 0.933 ، 95)٪0.980 - CI: 0.887 التي لديها حساسية وخصوصية 91.7٪ و 83.3٪ على التوالي.

هذه النتائج أعلى بكثير من تلك الخاصة بـ CA 15-3 (AUC: 0.623،95) ٪ 0.624 - CI: 0.415 و ACE (AUC : 0.522 0.615 - 95% CI:0.415).

في الختام، حددنا ثلاثة جزيئات من microRNAs، ولا سيما التركيبة miR21 وmiR-96 ، التي يمكن أن تكون بمثابة مؤشرات حيوية جديدة غير جراحية لسرطان الثدي.

الكلمات المفتاحية: سرطان الثدي؛ microRNAs ؛ المؤشرات الحيوية ؛ qRT-PCR ؛ بلازما.

Remerciements

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à mon directeur de thèse, Professeur BOURROUBEY Hadj, et à ma co-directrice de thèse, Professeur SAADI OUSLIM Amal Soulef, pour leur soutien, aide et conseils durant toutes ces années, ce qui m'a permis de mener à bien cette thèse.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude au Professeur BENRAHAL Faouzia de m'avoir accordé l'honneur de présider le jury de ma soutenance. Je vous remercie pour vos remarques constructives et vos suggestions qui m'ont permis d'améliorer la qualité de cette thèse.

Mes remerciements vont également aux Professeurs BENCHIKH Nasreddine, DELLAOUI Yahia, MOULAY El Hadj et BELDJILALI Mohamed pour avoir accepté de lire et corriger ce travail. Je vous suis très reconnaissant pour la précision de vos observations et l'apport que cela constitue pour ma thèse.

Je remercie Professeur BOUCHERIT El Hassan, chef du service de gynécologie obstétrique de l'EHU d'Oran, de m'avoir permis d'effectuer le recrutement de la population d'étude, le recueil des données cliniques et la collecte des échantillons sanguins nécessaires à la réalisation de ce travail.

Je souhaite témoigner ma reconnaissance au Professeur ABERKANE Meriem, chef du service de biologie moléculaire et cytogénétique de l'EHU d'Oran, et au Docteur DALI YAHIA Radia, chef du service de microbiologie de l'EHU d'Oran, de m'avoir ouvert les portes de vos services pour l'utilisation de l'appareillage de biologie moléculaire nécessaire au dosage des microARN.

Je dédie cette thèse à toute ma famille, mon père Allah Yarhmah, ma sœur Sarah, mon beau-frère Nassim ainsi que mes neveux Lina, Rayane et Anis.

Je ne saurai assez remercier ma mère, à qui je dois tout ! Merci pour ton éducation, ta patience, ta présence et ton soutien inconditionné. Je te souhaite beaucoup de santé et une longue vie incha'Allah.

Sommaire

Liste des abréviations X

Liste des tableaux XIV

Liste des figures XVI

Liste des annexes XIX

INTRODUCTION 1

REVUE DE LA LITTÉRATURE 4

Chapitre I : Le cancer du sein 5

1. Données épidémiologiques 5

2. Anatomie de la glande mammaire 6

3. Facteurs de risque 9

3.1. Prédisposition génétique 9

3.2. Hygiène de vie 10

3.3. Statut hormonal 10

4. Dépistage du cancer du sein 11

4.1. Examen clinique 12

4.2. Imagerie 13

4.3. Examen anatomopathologique 14

5. Intérêt des marqueurs tumoraux sériques dans la prise en charge du cancer du sein 14

6. Classification 15

5.1. Classification selon le stade TNM 16

5.2. Classification histologique 20

5.3. Classification selon le grade histo-pronostic 21
5.4. Classification moléculaire 22
6. Traitement 23
6.1. La chirurgie 23
6.2. La radiothérapie 24
6.3. La chimiothérapie 24
6.4. Les thérapies ciblées 26
Chapitre II : Les microARN 28
1. Historique 28
2. Biogenèse des microARN 29
3. Fonctions et mécanismes d'action 31
4. Rôle des microARN dans le développement du cancer du sein 33
5. Arguments en faveur de l'utilisation des microARN comme biomarqueurs du cancer du sein 37
Chapitre III : Aspects méthodologiques de l'analyse des microARN circulants 40
1. Phase pré-analytique 40
1.1. Matrice 40
1.2. Choix de l'anticoagulant 41
1.3. Centrifugation 41
1.4. Influence de l'hémolyse 42
1.5. Conservation 42
1.6. Extraction 42
2. Phase analytique 44
2.1. qRT-PCR 46
2.2. PCR digitale 47

2.3. Microarrays 49
2.4. Séquençage de nouvelle génération (NGS) 50
3. Phase post-analytique 51
3.1. Contrôles exogènes 51
3.2. Contrôles endogènes 52
OBJECTIFS 53
Objectif principal 54
Objectifs secondaires 54
MATÉRIEL ET MÉTHODES 55
1. Type et population d'étude 56
2. Recueil des données cliniques 57
3. Prélèvements sanguins 58
4. Centrifugation et conservation des échantillons 58
7. Dosage des marqueurs tumoraux CA 15-3 et ACE 67
8. Analyse statistique 69
9. Liste de l'équipement et des réactifs utilisés 71
RÉSULTATS 74
1. Caractéristiques démographiques des deux groupes 75
1.1. Age 75
1.2. Indice de masse corporelle 75
1.3. Statut ménopausique 76
1.4. Parité 77
1.5. Antécédents familiaux de cancer du sein 77
1.6. Récapitulatif des caractéristiques démographiques 78
2. Caractéristiques cliniques des patientes 79

2.1. Localisation de la tumeur 79
2.2. Type de carcinome 80
2.3. Taille de la tumeur 81
2.4. Atteinte des ganglions lymphatiques 82
2.4. Stade TNM 82
2.5. Grade histo-pronostic 83
2.6. Profil immunohistochimique 84
2.7. Pathologies associées 85
2.8. Résumé des données cliniques des patientes 86
3. Analyse de l'expression des microARN plasmatiques 86
4. Association entre les microARN plasmatiques et les données clinicopathologiques des patientes 88
5. Marqueurs tumoraux sériques CA 15-3 et ACE 90
6. Performances diagnostiques des microARN et comparaison aux marqueurs tumoraux CA15-3 et ACE 90
7. Analyse comparative des voies d'interaction géniques 93
DISCUSSION 94
CONCLUSION 105
ANNEXES 108
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 116

Liste des abréviations

3’UTR	3’-untranslated region
ACE	Antigène carcino-embryonnaire
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNtc	ADN tumoral circulant
AGO2	Argonaute 2
AJCC	American Joint Committee for Cancer
AK3	Arginine kinase 3
ARN	Acides ribonucléiques
ARNm	Acides ribonucléiques messagers
ASC	Aire sous la courbe
BI-RADS	Breast Imaging-Reporting and Data System
BRCA1	Breast cancer gene 1
BRCA2	Breast cancer gene 2
CA 15-3	Cancer antigen 15-3
CCIS	Carcinome canalaire in situ
CCR4-NOT	Carbon catabolite repression 4 – negative on TATA-less
CINS	Carcinome infiltrant non spécifique
CLI	Carcinome lobulaire infiltrant
CLIS	Carcinome lobulaire in situ
CTC	Cellules tumorales circulantes
DCP2	Decapping protein 2
DGCR8	Digeorge Critical Region 8
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétatique

EGFR	Epidermal growth factor receptor
eIF4F	Facteur d'initiation de la traduction 4F
FDA	Food and Drug Administration
FOXO3	Forkhead box O 3
GTP	Guanine triphosphate
HDL	Lipoprotéines de haute densité
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HTA	Hypertension artérielle
IC 95%	Intervalle de confiance à 95 %
IMC	Indice de masse corporelle
IRM	Imagerie par résonance magnétique
Kb	Kilo-bases
LCR	Liquide céphalorachidien
LNA	Locked nucleic acids
LZTFL1	Leucine zipper transcription factor like 1
Mb	Méga-bases
MEK/ERK	Mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase
miRISC	MiRNA-induced silencing complex
MMP16	Matrix metallopeptidase 16
MRE	MicroRNA response element
NGS	Séquençage de nouvelle génération
NIH	National Institutes of Health
NPM1	Nucléophosmine 1
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PABP	Poly(A) binding protein
PACT	Protein Kinase R-activating protein

PAI-1	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type urokinase
PAN2/3	Poly(A) nucléases 2/3
pb	Paires de bases
PCR	Polymerase chain reaction
pré-miARN	MicroARN prémature
pri-miARN	MicroARN primaire
PTEN	Homologue de la phosphatase et de la tensine
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
RE	Récepteurs de l'œstrogène
RISC	RNA-induced silencing complex
ROC	Receiver operating characteristics
RP	Récepteurs de la progestérone
RR	Risque relatif
SBR	Echelle de Scarff-Bloom et Richardson
snARN	Small nuclear ARN
snoARN	Small nucleolar ARN
SOCS1	Suppressor Of cytokine signaling 1
STAT6	Signal transducer and activator of transcription 6
TEP au ^{18}FDG	Tomographie par émission de positons au 18F-fluorodeoxyglucose
THS	Traitement hormonal substitutif
Tm	Température de fusion
TNM	Tumor-node-metastasis
TRBP	The human immunodeficiency virus transactivating response RNA binding protein
Trop-2	Trophoblast cell surface antigen 2
uPA	Activateur du plasminogène de type urokinase

VNN	Valeur prédictive négative
VPP	Valeur prédictive positive
XN1	Exoribonucléase 1

Liste des tableaux

Tableau I. Définition de la taille de la tumeur primaire (T) selon l'AJCC. 17
Tableau II. Définition clinique de l'envahissement des ganglions lymphatiques régionaux (N). 18
Tableau III. Définition des métastases à distance (M). 19
Tableau IV. Classification anatomique du cancer du sein en stades TNM selon l'AJCC. 20
Tableau V. Principales molécules de chimiothérapie utilisées dans le traitement du cancer du sein. 25
Tableau VI. Expression dérégulée des microARN et de leurs cibles dans le cancer du sein 36
Tableau VII. Avantages et inconvénients des méthodes actuelles utilisées pour détecter les microARN. 45
Tableau VIII. Comparaison entre différentes plateformes de NGS. 51
Tableau IX. Principales caractéristiques des trousses utilisées pour le dosage du CA 15-3 et de l'ACE. 69
Tableau X. Liste de l'équipement utilisé. 71
Tableau XI. Liste des réactifs et consommables. 72
Tableau XII. Répartition des deux groupes selon les tranches d'IMC. 76
Tableau XIII. Classification des malades et des témoins selon la parité. 77
Tableau XIV. Comparaison des données démographiques et obstétriques des deux groupes. 78
Tableau XV. Classification des patientes selon le stade TNM. 82
Tableau XVI. Caractéristiques clinico-pathologiques des patientes atteintes du cancer du sein (n=60). 86
Tableau XVII. Comparaison de l'expression relative des microARN entre les deux groupes. 88

Tableau XVIII. Association entre les microARN testés et les caractéristiques cliniques des patientes atteintes du cancer du sein. 89
Tableau XIX. Résultats du dosage des marqueurs tumoraux sériques CA 15-3 et ACE chez les deux groupes. 90
Tableau XX. Comparaison des performances diagnostiques des microARN et des deux marqueurs tumoraux sériques pour le diagnostic du cancer du sein. 92

Liste des figures

Figure 1. Taux d'incidence et taux de mortalité par cancer normalisés selon l'âge, chez les femmes (tout âge), dans le monde en 2020. 5
Figure 2. Répartition des incidences du cancer du sein féminin par tranches d'âge à Alger en 2017. 6
Figure 3. Anatomie de la glande mammaire humaine. 8
Figure 4. Épithélium mammaire normal. 9
Figure 5. Évaluation clinique du cancer du sein. 12
Figure 6. Photographie prise lors de la cérémonie de remise des prix Breakthrough, le 9 novembre 2015, en Californie. 28
Figure 7. Vue d'ensemble sur la biogenèse des microARN 31
Figure 8. Mécanisme d'action des microARN 33
Figure 9. Interaction des microARN avec les grandes voies de l'oncogenèse. 34
Figure 10. Rôle des microARN comme suppresseur de tumeur et oncogènes dans la formation des tumeurs. 35
Figure 11. Sécrétion et libération des microARN dans le milieu extracellulaire 38
Figure 12. Méthodes d'extraction des microARN 44
Figure 13. Détermination de l'expression des microARN par qRT-PCR. Détection de l'amplicon à l'aide des sondes SYBR® Green (A) ou TaqMan (B). . 47
Figure 14. Principe de la PCR digitale pour le dosage des microARN. 48
Figure 15. Analyse des microARN par *microarrays*. 49
Figure 16. Organigramme de la population d'étude. 57
Figure 17. Double centrifugation des échantillons sanguins. 59
Figure 18. Centrifugation des tubes primaires. 59
Figure 19. Seconde centrifugation sur microcentrifugeuse. 60
Figure 20. Extraction des ARN sous une hotte de laboratoire. 61

Figure 21. Vue d'ensemble sur la procédure d'extraction des microARN par le kit mirVana®. 62
Figure 22. Spectrophotomètre utilisé pour l'évaluation de la pureté de l'ARN obtenu après extraction. 63
Figure 23. Transcription inverse sur thermocycleur C1000 Touch Thermal Cycler® (Bio-Rad®). 64
Figure 24. Principe de la détermination de l'expression des microARN par la méthode Taqman® MicroRNA Assay (Thermo Fisher®). 65
Figure 25. Amplification des microARN par qRT-PCR. 66
Figure 26. Courbes d'amplification par PCR. 67
Figure 27. Dosage des marqueurs tumoraux sériques CA 15-3 et ACE sur l'automate Immulite 2000 XPi® 68
Figure 28. Histogrammes de la répartition en fonction de l'âge. 75
Figure 29. Représentation en secteurs de la répartition en fonction du statut ménopausique.. 76
Figure 30. Répartition des deux groupes selon la présence ou l'absence d'antécédents familiaux de cancer du sein. 77
Figure 31. Répartition des patientes en fonction de la localisation de l'atteinte tumorale 79
Figure 32. Types histologiques des carcinomes mammaires. 80
Figure 33. Distribution des patientes selon la taille de la tumeur. 81
Figure 34. Répartition des patientes en fonction de la présence ou de l'absence d'une atteinte des ganglions lymphatiques. 82
Figure 35. Distribution des patientes selon le grade histo-pronostic de Scarff Bloom et Richardson 83
Figure 36. Profil immunohistochimique des patientes. 84
Figure 37. Pathologies présentes chez les patientes au moment du diagnostic du cancer du sein. 85
Figure 38. Comparaison du niveau d'expression des microARN plasmatiques entre les malades et les témoins. 87

Figure 39. Courbes ROC (*Receiver Operating Characteristics*) des microARN et des marqueurs tumoraux sériques. 91
Figure 40. Réseau génétique commun des trois microARN (hsa-miR-21-3p, hsa-miR-96-5p et hsa-miR-155-5p) déterminé par l'algorithme miRTargetLink 2.0. 93

Liste des annexes

Annexe 1. Fiche de renseignements des données cliniques et démographiques des patientes 109
Annexe 2. Protocole d'extraction des microARN plasmatiques 110
Annexe 3. Protocole de la transcription inverse 112
Annexe 4. Protocole de l'amplification 114

INTRODUCTION

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), le cancer du sein affecte environ 2.3 millions de femmes dans le monde chaque année (1). En Algérie, on a enregistré durant l'année 2020, 12 536 nouveaux cas et 4 116 décès, ce qui est en fait à la fois le cancer ayant la plus grande incidence et la plus grande mortalité (2). Il existe une forte association entre la survie et le stade du cancer au moment du diagnostic, en particulier avec la taille de la tumeur et la présence de métastases tumorales aux ganglions lymphatiques ou au-delà. Ainsi, le taux de survie à 5 ans des patientes atteintes du cancer du sein précoce est supérieur à 95% pour les formes localisées, environ 85% pour les formes invasives et de seulement 30% pour les formes métastatiques (3). Malheureusement, dans notre pays, 40% des patientes consultent à un stade localement avancé ou métastatique avec une taille tumorale moyenne au moment du diagnostic de 3.6 cm (4).

Le diagnostic du cancer du sein repose essentiellement sur l'examen clinique et la mammographie. Outre le fait d'exposer les patientes à des rayonnements ionisants pouvant eux-mêmes être à l'origine d'un processus tumoral chez les femmes ayant une prédisposition génétique, la mammographie offre une faible sensibilité lors des premiers stades du cancer du sein. En effet, durant les premières années de développement du cancer du sein, la mammographie ne montre pas d'anomalies à cause de la faible taille de la tumeur (<0.5 cm) (5). Ceci s'explique par le fait que le développement des cellules cancéreuses dans le tissu de la glande mammaire nécessite approximativement une durée de 7 ans, car il faut 100 à 300 jours à ces cellules pour se multiplier et 30 multiplications sont nécessaires pour qu'un néoplasme mammaire émerge (6). Par ailleurs, la biologie médicale n'est pas très contributive à ce stade. Les rares marqueurs tumoraux disponibles, dont les plus importants le *Cancer Antigen* 15-3 (CA 15-3), ne permettent pas de poser le diagnostic et leur utilisation est limitée au pronostic et au suivi thérapeutique (7,8). La recherche de nouveaux biomarqueurs pour la détection précoce du cancer du sein, bien avant l'apparition des métastases, est donc essentielle pour améliorer la survie des patientes.

Les microARN sont des acides ribonucléiques (ARN) d'une vingtaine de nucléotides qui régulent au niveau post-transcriptionnel environ un tiers du génome (9). Grâce à leurs différentes formes de transport, les microARN sont stables et peuvent être détectés dans les liquides biologiques comme le sang, les urines, le liquide céphalo-rachidien ou la salive. Par ailleurs, le profil des microARN circulants est en partie spécifique de la cellule qui les a sécrétés et est modifié selon l'état physiologique ou pathologique dans lequel elle se trouve (10). Les microARN émergent actuellement comme des biomarqueurs prometteurs pour de nombreuses pathologies. La première étude à avoir démontré l'intérêt des microARN comme biomarqueurs est celle de Lawrie *et al.* en 2008 (11). Depuis, de nombreuses signatures de microARN ont été décrites principalement pour les maladies cancéreuses, mais également pour d'autres pathologies humaines comme les maladies cardiovasculaires ou encore les maladies neurodégénératives (12). Les microARN jouent un rôle déterminant dans le développement et la progression du cancer du sein (13). Ainsi, de nombreux microARN sont décrits comme étant dérégulés aussi bien dans les tissus que dans le sang des patientes atteintes du cancer du sein (12). Étant stables, spécifiques, non invasifs et mesurables, les microARN circulants pourraient s'avérer être d'excellents biomarqueurs prédictifs pour le dépistage, le diagnostic, le pronostic et le suivi thérapeutique du cancer du sein.

REVUE DE LA LITTÉRATURE

Chapitre I : Le cancer du sein

1. Données épidémiologiques

Le cancer du sein constitue la pathologie tumorale la plus fréquente chez la femme avec près de 2.3 millions de nouveaux cas par an dans le monde ; soit 25% des cancers féminins. Le cancer du sein représente également la première cause de mortalité chez la femme (**Figure 1**) dans pratiquement tous les pays avec 685 000 décès enregistrés dans le monde en 2020 (1).

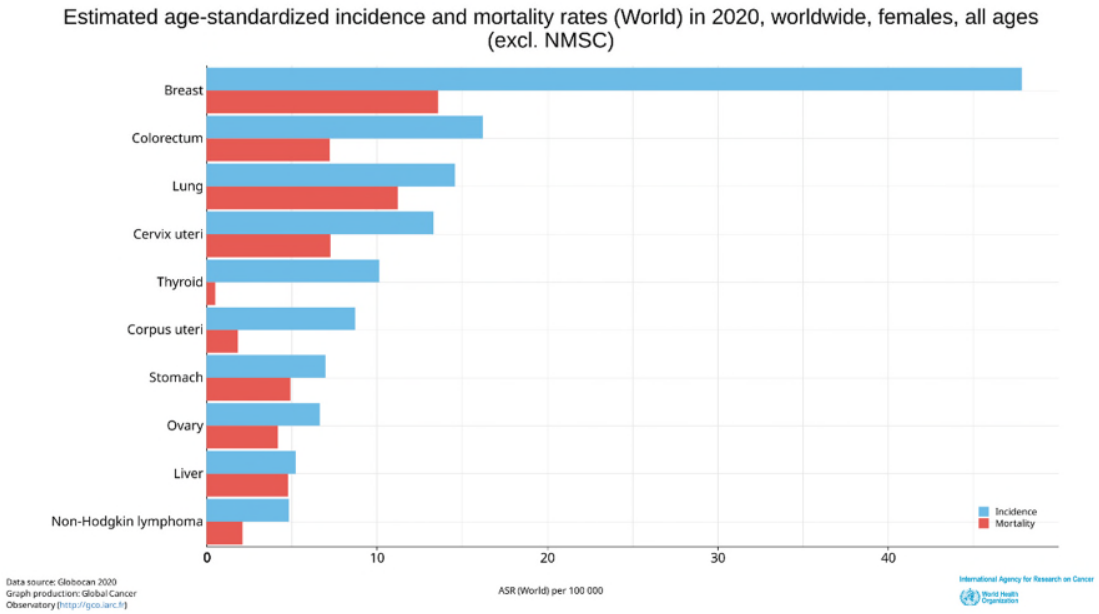


Figure 1. Taux d'incidence (en bleu) et taux de mortalité (en rouge) par cancer normalisés selon l'âge, chez les femmes (tout âge), dans le monde en 2020 (d'après GLOBOCAN 2020) (2).

En Algérie, on recense plus de 12 000 nouveaux cas diagnostiqués et 4 000 décès par an. Le cancer du sein représente à lui seul près de la moitié des cancers (47.3%) affectant les femmes. L'âge moyen au moment du diagnostic est de 48 ans et 66% des femmes algériennes diagnostiquées ont moins de 50 ans. Cet âge moyen est plus faible de plus d'une dizaine d'années à celui d'autres pays comme les États-Unis d'Amérique (62 ans) ou la France (65 ans)

(15,16). L'incidence du cancer du sein est en nette augmentation dans notre pays depuis plus de 20 ans (17). Les registres du cancer de Sétif et d'Alger illustrent bien cette augmentation passant de 20 nouveaux cas pour 100 000 femmes à plus de 60 nouveaux cas pour 100 000 femmes. À Oran, le cancer du sein représente 52% des cancers diagnostiqués chez les femmes en 2017, avec un taux d'incidence de 68 pour 100 000 habitants. Dans le registre du cancer d'Alger, l'âge moyen de survenue du cancer est de 51 ans et les tranches d'âge ayant les incidences spécifiques les plus importantes sont : 45 – 49 ans et 65 – 69 ans (**Figure 2**) (18).

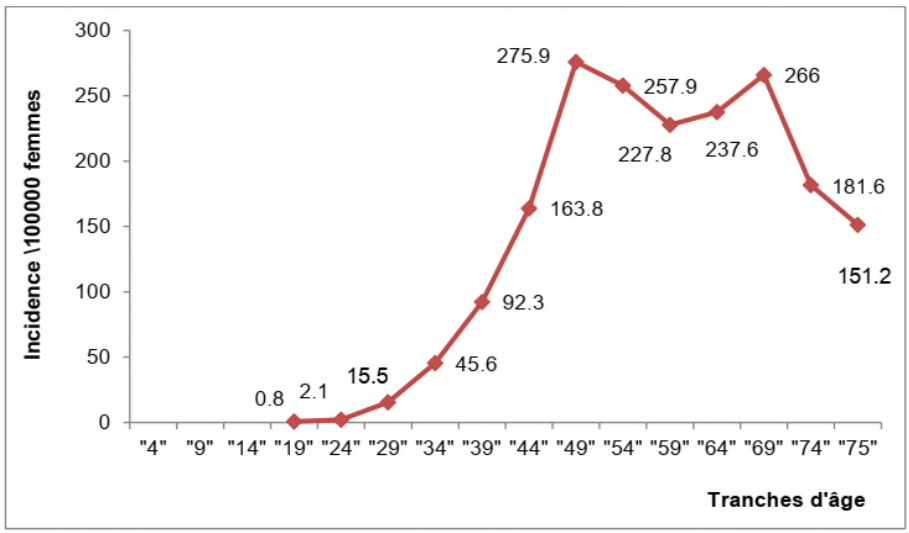


Figure 2. Répartition des incidences du cancer du sein féminin par tranches d'âge à Alger en 2017 (18).

2. Anatomie de la glande mammaire

Le sein est une glande exocrine dont la fonction principale est la production du lait après l'accouchement. Les seins sont situés de part et d'autre du sternum, en regard de l'espace compris entre la 3ème et la 7ème côte. Ils peuvent avoir une forme conique ou hémisphérique ; et sont généralement de taille asymétrique. Le sein est composé d'une glande mammaire, de tissu conjonctif et de tissu adipeux qui lui donne sa forme et son volume. Des ligaments constitués de tissu conjonctif assurent la fixation et le soutien des seins aux muscles thoraciques.

Les seins contiennent également des nerfs ainsi que des vaisseaux sanguins et lymphatiques. La glande mammaire (**Figure 3**) comprend une vingtaine de lobes divisés en lobules qui sont eux-mêmes formés de regroupements d'acini. Ces derniers sont reliés au mamelon par des structures tubulaires ramifiées, les canaux galactophores. La face luminale des acini (**Figure 4**) est constituée de cellules épithéliales responsables de la production du lait, tandis que la couche externe est composée de cellules myoépithéliales douées de propriétés contractiles (19).

La structure des seins évolue au cours du temps en fonction de l'âge et des modifications du statut hormonal de la femme : cycle menstruel, grossesse, lactation et ménopause. Le sein se développe à la fois chez le fœtus mâle et femelle dès la 4ème semaine de vie fœtale à partir de l'ectoderme et sa différenciation se produit lors du troisième trimestre de la grossesse sous l'effet des hormones maternelles. De la naissance à la puberté, la structure de la glande mammaire reste relativement stable. À la puberté, l'effet des estrogènes entraine chez les filles une prolifération des canaux et des cellules stromales contrairement aux garçons chez lesquels l'effet antagoniste des androgènes empêche cette prolifération. Lors de la grossesse, les lobules atteignent leur maturation fonctionnelle avec la différenciation des cellules épithéliales et myoépithéliales en préparation de la lactation. Après l'accouchement, la prolactine stimule la synthèse du lait maternelle par les cellules épithéliales, tandis que l'ocytocine induit la contraction des cellules myoépithéliales afin d'expulser le lait produit vers le mamelon. Les cellules épithéliales reviennent ensuite à leur état initial lorsque la lactation est terminée. À la ménopause, la diminution des taux d'œstrogène et de progestérone entraine une involution du tissu glandulaire qui est remplacé par du tissu conjonctif et du tissu adipeux (20).

Le développement du cancer du sein débute par une prolifération incontrôlée des cellules épithéliales, particulièrement celles en contact avec la face luminale. Cette phase pré-néoplasique est à l'origine de la formation d'un carcinome *in situ*. Par la suite, la tumeur peut évoluer en cancer du sein infiltrant

en perçant la membrane basale, lui permettant de se propager. Comme chaque sein est entouré d'environ 35 ganglions lymphatiques dont la plupart sont situés dans le creux de l'aisselle ou à proximité, ce sont ces ganglions qui constituent le premier foyer cancéreux à distance des seins.

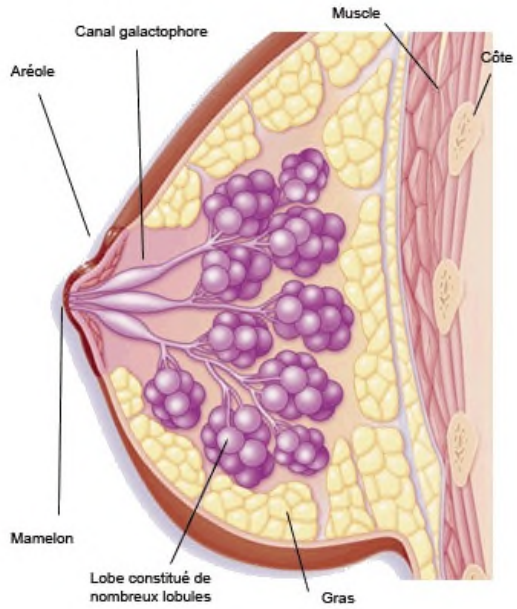


Figure 3. Anatomie de la glande mammaire humaine.

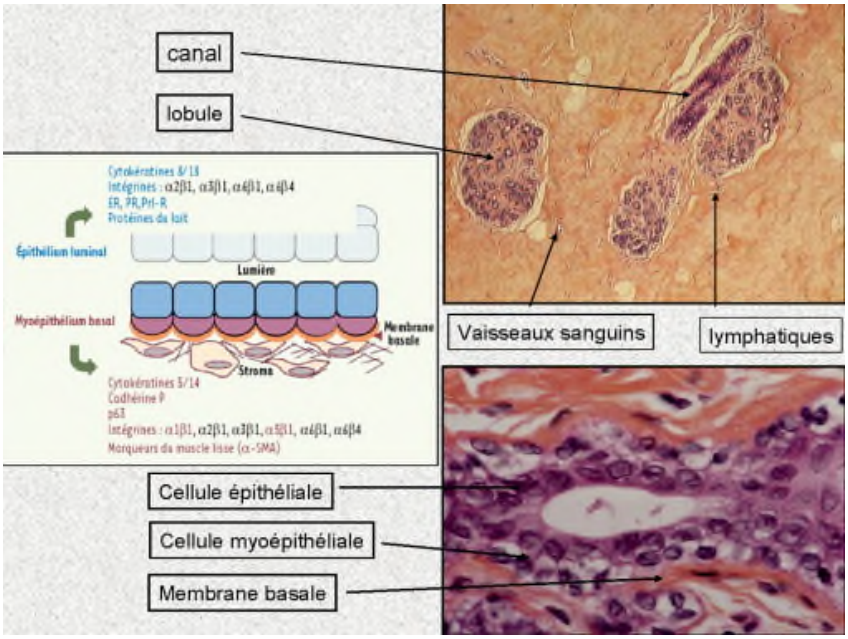


Figure 4. Épithélium mammaire normal (21).

3. Facteurs de risque

Les causes du cancer du sein sont multiples, résultants à la fois de facteurs génétiques et environnementaux. L'âge, les antécédents familiaux, l'obésité, le traitement par les hormones ou par irradiation constituent les principaux facteurs de risque du cancer du sein.

3.1. Prédisposition génétique

Environ 5 à 10 % des cancers du sein sont héréditaires. La principale cause du cancer du sein héréditaire est une mutation dans les gènes BRCA1 (*breast cancer gene 1*) et BRCA2 (*breast cancer gene 2*). Ce sont deux gènes suppresseurs de tumeur qui jouent un rôle fondamental dans la réparation des cassures double brin de l'acide désoxyribonucléique (ADN) par recombinaison homologue, le contrôle de la transcription et du cycle cellulaire, ainsi que le remodelage de la chromatine. Les mutations au niveau de ces gènes sont à transmission autosomique dominante et sont associées à un risque très élevé de développer le cancer du sein et/ou de l'ovaire. Le risque cumulé de développer le cancer du sein est en moyenne de 72% et de 69% pour les porteuses de BRCA1 et de BRCA2 respectivement. L'incidence de la maladie augmente de manière

importante dès l'âge de 30 à 40 ans pour les porteuses de BRCA1 et dès 40 à 50 ans pour BRCA2 ; l'incidence devient par la suite similaire et constante jusqu'à 80 ans (22).

3.2. Hygiène de vie

L'obésité, le tabagisme, la consommation d'alcool et l'absence d'activité physique régulière sont des facteurs de risque du cancer du sein. Le surpoids ou l'obésité augmente le risque de survenu du cancer du sein en post-ménopause avec un risque relatif (RR) de 1,2 à 2,5 (16). Une activité physique régulière réduit le risque d'apparition du cancer du sein, réduit le taux de récidive et augmente le taux de survie des patientes atteintes de ce cancer. Plusieurs mécanismes semblent expliquer cet effet bénéfique. L'activité physique diminue la sécrétion des hormones sexuelles, des hormones métaboliques, des adipokines et des radicaux libres oxydants, tandis qu'elle stimule le fonctionnement du système immunitaire (23). Le tabagisme est associé à un risque modeste, mais significativement augmenté de cancer du sein, en particulier chez les femmes qui ont commencé à fumer à l'âge de l'adolescence. Le risque relatif de cancer du sein associé au tabagisme semble être plus élevé chez les femmes ayant des antécédents familiaux de la maladie (24,25). L'éthanol constitue lui-même, le principal composant cancérogène des boissons alcoolisées ; l'effet étant proportionnel à la fréquence de la consommation. Sous l'influence de l'alcool déshydrogénase, l'éthanol se métabolisera en acétaldéhyde, qui est un cancérogène connu. Entre autres, la consommation chronique d'alcool favorise la production d'hormones endogènes, affecte le facteur de croissance 1 analogue à l'insuline, modifie plusieurs voies biologiques, augmente le stress oxydatif et endommage les gènes. Même une consommation d'alcool quotidienne modérée augmente le risque de cancer du sein (26).

3.3. Statut hormonal

Le cancer du sein est dans la plupart des cas hormonodépendant. D'une part, les effets protecteurs de l'ovariectomie sont connus depuis très longtemps. D'autre part, il existe une association bien établie entre la survenue du cancer du

sein avec la présence de récepteurs hormonaux de l'œstrogène (RE) et de la progestérone (RP). Les femmes nullipares ou ayant un enfant après l'âge de 30 ans ont plus de risque de développer un cancer du sein. La grossesse à terme entraine la différentiation terminale des glandes mammaires, les rendant moins sensibles aux effets des carcinogènes. Ainsi, les femmes ayant eu au moins une grossesse à terme ont en moyenne une réduction de 25% du risque de développer le cancer du sein (16). L'allaitement est aussi un facteur protecteur à condition qu'il soit prolongé, son effet bénéfique s'explique par l'augmentation de la sécrétion de prolactine et/ou par la diminution de la sécrétion d'œstrogènes. Mais, l'allaitement ne semble pas protecteur contre les formes héréditaires (27).

Le traitement hormonal contraceptif et le traitement hormonal substitutif (THS) après la ménopause ont un effet promoteur sur les lésions préexistantes. Une méta-analyse englobant 58 études réalisées entre 1992 et 2018 a comparé le risque de survenu de la maladie chez des femmes ménopausées sous traitements œstroprogestatifs à celles sous estrogène seul *versus* celles ne prenant aucun traitement. Le risque relatif est plus élevé chez les femmes sous THS comparativement aux femmes sous estrogène seul. Ces dernières ont elles-mêmes un risque plus important que les femmes ménopausées qui ne prennent pas de traitement (28). Ce risque est corrélé à la durée du traitement. Toutefois, certains auteurs estiment que cette augmentation du risque demeure de faible amplitude et que le bénéfice des traitements hormonaux est largement supérieur à ce risque (29).

4. Dépistage du cancer du sein

Un dépistage précoce du cancer du sein est associé à de plus grandes chances de guérison et à un traitement moins lourd. Pour schématiser la démarche de dépistage du cancer sein (**Figure 5**), les anomalies détectées lors de l'examen clinique des seins et de la mammographie de dépistage sont suivis d'une évaluation par imagerie diagnostique, qui peut impliquer une combinaison de mammographie, d'échographie et/ou d'imagerie par résonance magnétique

(IRM). Le diagnostic du cancer du sein est confirmé par l'examen anatomopathologique d'un prélèvement biopsique.

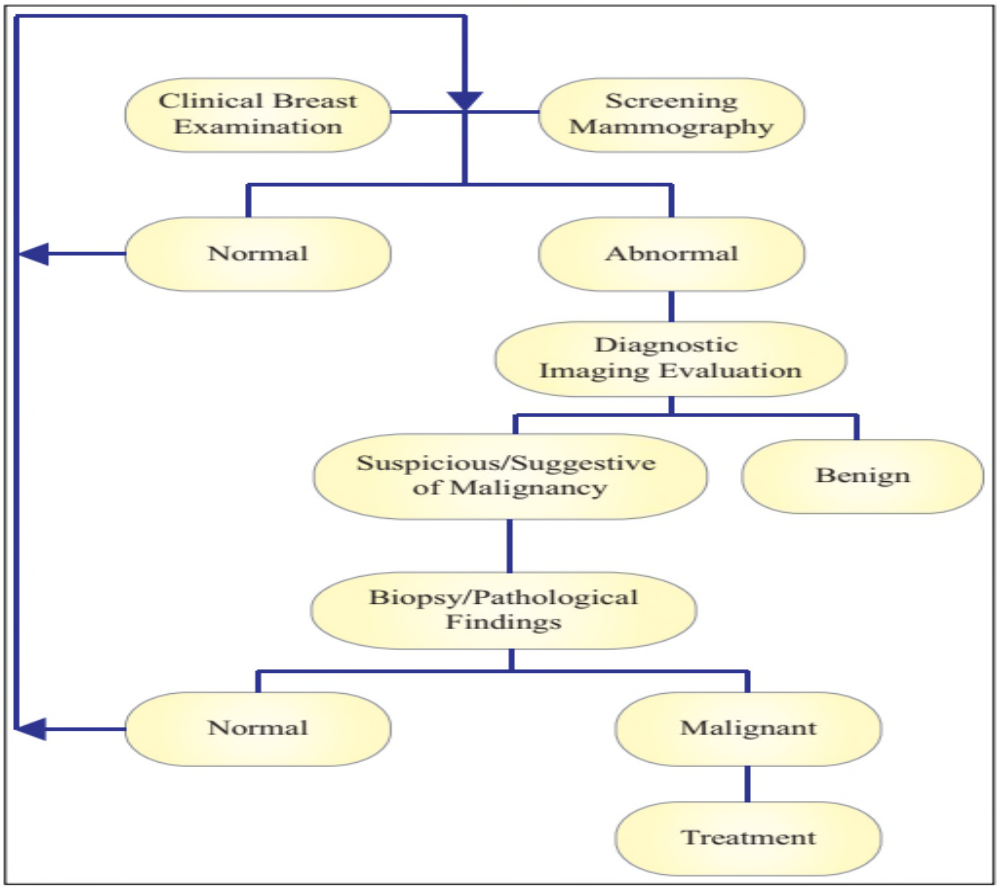


Figure 5. Évaluation clinique du cancer du sein (30).

4.1. Examen clinique

Les directives de dépistage du *National Comprehensive Cancer Network* (États Unis d'Amérique) suggèrent que les femmes âgées de 25 à 39 ans qui sont asymptomatiques et ne présentent aucun facteur de risque particulier de cancer du sein doivent subir un examen clinique des seins tous les 1 à 3 ans. Des examens plus fréquents sont recommandés chez les femmes âgées de 40 ans et plus, les femmes présentant des facteurs de risque, des antécédents de cancer du sein et/ou les patientes symptomatiques (31).

L’interrogatoire permettra de recueillir des notions de base sur la patiente comme l’âge, le poids, la taille, l’état général, la présence éventuelle de comorbidités ou encore les antécédents néoplasiques personnels et familiaux. L’examen clinique s’effectue par inspection et palpation des seins à la recherche d’anomalies telles que des modifications cutanées, la présence de nodule ou d’un écoulement anormal. Le manque de sensibilité de l’examen clinique par comparaison à l’imagerie fait que des tumeurs de petite taille peuvent ne pas être détectées. Néanmoins, l’examen clinique demeure indispensable pour la classification de la maladie et pour l’orientation des prochaines étapes de la prise en charge chirurgicale et oncologique (32). En ce qui concerne l’autopalpation des seins, son intérêt reste controversé (33,34).

4.2. Imagerie

La mammographie constitue actuellement le principal outil de dépistage du cancer du sein. En fonction des caractéristiques présentes sur la mammographie, les patientes sont classées en utilisant le système BI-RADS (*Breast Imaging-Reporting And Data System*) qui va de la catégorie 0 à 6, la catégorie 0 étant une étude incomplète nécessitant des investigations supplémentaires et la catégorie 6 correspondant à une mammographie d’un cancer prouvé. D’autres examens d’imagerie peuvent s’avérer utile comme l’échographie et l’IRM. L'échographie est généralement utilisée en conjonction avec la mammographie pour une évaluation plus approfondie des lésions suspectes et chez les patientes qui ont une plus grande densité de tissu mammaire. L'IRM, en plus de la mammographie, est généralement réservée au dépistage des patients à haut risque qui ont un risque cumulatif à vie supérieur à 20% ou 25% de développer un cancer du sein (35).

Même si l’intérêt de la mammographie pour le dépistage massif est clairement démontré, elle présente néanmoins de nombreuses limites. La précision de la mammographie de dépistage est grandement affectée par l'âge. Les jeunes femmes ayant des seins plus denses, rendant l'interprétation de la mammographie plus difficile. Le taux de faux positif peut aller jusqu’à 19% ; ce

qui peut entrainer chez ces femmes de l'anxiété et la réalisation inutile de biopsie (36). Par ailleurs, l'irradiation lors de la réalisation de la mammographie n'est pas sans risque. Aux États-Unis d'Amérique, pour 100 000 femmes dépistées annuellement de 40 à 74 ans, la mammographie aurait induit 125 cancers dont 16 ayant entrainé des décès. Mais, il faut tout de même noter qu'en contrepartie 968 décès par cancer du sein auraient été évités (37).

L'imagerie est également essentielle pour la réalisation du bilan d'extension initial à la recherche de la présence d'une éventuelle métastase. Ce bilan par imagerie peut être effectué par l'une des trois manières suivantes :

- Radiographie de thorax, échographie abdominale et scintigraphie osseuse ;
- Scanner thoraco-abdominal et scintigraphie osseuse ;
- Tomographie par émission de positons au 18F-fluorodeoxyglucose (TEP au ^{18}FDG) (38).

4.3. Examen anatomopathologique

L'examen anatomopathologique est indispensable pour le diagnostic positif et la classification du cancer du sein. Il peut être réalisé avant et/ou après l'exérèse chirurgicale de la tumeur. Cet examen comporte une visualisation au microscope et aussi une étude immunohistochimique pour déterminer l'expression des récepteurs hormonaux suivants : RE, RP, le *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2) et l'antigène Ki67.

5. Intérêt des marqueurs tumoraux sériques dans la prise en charge du cancer du sein

Les deux principaux marqueurs tumoraux sériques du cancer du sein sont le CA 15-3 et l'antigène carcino-embryonnaire (ACE). Ils ne possèdent pas des performances suffisantes pour être utilisés à des fins diagnostics, mais sont très utiles au pronostic et au suivi thérapeutique des patientes atteintes du cancer du sein (39).

Le CA15-3 est une glycoprotéine de haut poids moléculaire (300 à 450 kDa) appartenant à la famille des mucines et codée par le gène MUC-1 qui se

trouve sur le chromosome 1 (1q21-24). Elle est principalement localisée au niveau des alvéoles et des canaux des glandes mammaires. Le CA 15-3 est fréquemment surexprimé et glycosylé de manière aberrante dans les cancers du sein. D'où son utilisation pour l'exploration de ces pathologies. Le principe du dosage du CA15-3 repose sur une méthode immunométrique en « sandwich », utilisant deux types d'anticorps monoclonaux anti-CA15-3 (115D8 : anticorps de capture ; DF3 : anticorps de détection) (40). Il existe une importante variabilité des résultats en fonction des méthodes de dosage utilisés. Il est donc essentiel de faire le suivi dans un même laboratoire avec la même méthode de dosage. Pour le CA 15-3 comme pour la plupart des marqueurs tumoraux, la notion de valeurs usuelles est remplacée par celle de la valeur seuil. Cette dernière varie de 25 à 39 UI/mL selon la méthode de dosage. D'autres mucines, à l'instar du CA 27-29 et du CA-549, ont fait l'objet d'évaluations dans le but de les utiliser comme marqueurs du cancer du sein, mais aucune n'a montré sa supériorité par rapport au CA 15-3.

L'ACE est une glycoprotéine d'environ 180 kDa, isolée pour la première fois par Gold et Freeman en 1965. L'ACE appartient à la superfamille des immunoglobulines. Il est impliqué dans les processus d'adhésion et de différenciation cellulaires, ainsi que dans la résistance aux chimiothérapies. Sa synthèse débute à l'âge fœtal dans l'intestin, le foie et le pancréas. À l'âge adulte, cette synthèse est en grande partie réprimée ; seul un faible taux persiste au niveau sanguin. L'ACE est cependant surexprimé dans plusieurs cancers tels que celui du colon, du sein ou encore des poumons. Sa demi-vie est de quelques jours et son élimination est principalement hépatique. Même si l'ACE peut être augmenté dans plusieurs pathologies autres que le cancer du sein, l'association de la mesure des concentrations sériques de l'ACE avec le CA15-3 avant la chirurgie augmente considérablement la sensibilité du CA 15-3 pour prédire la survie au cancer du sein (41).

6. Classification

La classification du cancer du sein est essentielle pour plusieurs raisons :

- Aider les cliniciens à choisir le traitement le plus approprié.
- Poser un pronostic et faciliter le suivi des malades.
- Permettre un échange d'information entre les différents centres de traitement.
- Rendre les résultats des traitements comparables et contribuer ainsi au développement de nouveaux traitements.

Les différents systèmes de classification du cancer du sein sont traités ci-dessous :

5.1. Classification selon le stade TNM

La classification Tumeur-Ganglion-Métastase, en anglais *Tumor-Node-Metastasis* (TNM) se focalise essentiellement sur des critères anatomiques en prenant en considération la taille de la tumeur (**Tableau I**), l'atteinte des ganglions lymphatiques (**Tableau II**) et la présence éventuelle de métastases (**Tableau III**). La combinaison de ces trois critères permet de définir le stade de la maladie (**Tableau IV**). Cette classification constitue un langage commun dans le monde pour la stratification et le traitement de la maladie (42). Elle est basée sur les travaux de Pierre Denoix durant les années 1943 à 1952. Elle a été proposée pour la première fois en 1959 par l'*American Joint Committee for Cancer* (AJCC) et sa dernière mise à jour date de 2017 (8ème édition). Le système TNM distingue entre le stade clinique avant traitement noté « c » et le stade anatomopathologique déterminé après chirurgie, noté « p » (43).

Tableau I. Définition de la taille de la tumeur primaire (T) selon l'AJCC.

Catégorie	**Critères**
Tx	Tumeur primaire non évaluable T0 Pas de tumeur primaire
Tis (CCIS)	Carcinome in situ de type canalaire
Tis (Paget)	Maladie de Paget sans lésion carcinomateuse in situ ou infiltrante sous-jacente
T1	< 20mm
T1mi	< 1mm
T1a	> 1mm et < 5mm
T1b	> 5mm et < 10mm
T1c	> 10mm et < 20mm
T2	> 20mm et < 50mm
T3	> 50mm
T4	Quelle que soit la taille si il y'a extension à la paroi thoracique ou à la peau (ulcération ou nodules cutanés).
T4a	Extension à la paroi thoracique à l'exclusion de l'atteinte isolée du muscle pectoral.
T4b	Ulcération ou œdème ou peau d'orange ou nodule pariétal macroscopique ispsilatéral séparé de la tumeur principale sans signe inflammatoire.
T4c	T4a + T4b
T4d	Carcinome inflammatoire (Œdème / érythème > 1/3 du sein)

Tableau II. Définition clinique de l'envahissement des ganglions lymphatiques régionaux (N).

Catégorie	**Critères**
Nx	L'envahissement des ganglions lymphatiques régionaux ne peut pas être évalué (par exemple, déjà enlevés chirurgicalement ou non disponibles pour analyse anatomopathologique du fait de l'absence d'évidement).
N0	Absence d'envahissement ganglionnaire régional.
N1	Métastases(s) ganglionnaire(s) homolatérale(s) axillaire(s) mobile(s) étage 1 et 2 de Berg.
N2	Métastase(s) ganglionnaire(s) homolatérale (s) axillaire(s) dans les étages 1 et 2 de Berg fixée(s) ou métastase(s) ganglionnaire(s) homolatérale(s) mammaire interne cliniquement (clinique et imagerie) sans atteinte axillaire.
N3	Métastase(s) ganglionnaire(s) homolatérale(s) sous-claviculaire(s) (étage 3 de Berg) avec ou sans atteinte des étages 1 et 2 de Berg ou métastase(s) ganglionnaire(s) homolatérale(s) mammaire interne cliniquement (clinique et imagerie) avec atteinte axillaire des étages 1 et 2 de Berg ou métastases ganglionnaire(s) sus-claviculaire(s) avec ou sans atteinte axillaire ou mammaire interne.

Tableau III. Définition des métastases à distance (M).

Catégorie	Critères
M0	Aucune preuve clinique ou radiographique de métastases à distance.
cM0i(+)	Aucune preuve clinique ou radiographique de métastases à distance en présence de cellules tumorales en absence de dépôts supérieures à 0,2 mm détectés au microscope ou en utilisant des techniques moléculaires dans le sang, la moelle osseuse ou un autre tissu ganglionnaire non régional chez une patiente sans symptômes ou signes de métastases.
M1	Métastases à distance détectées par des examens cliniques et radiographiques (cM) et/ou métastases histologiquement prouvées dont la taille dépasse 0,2 mm (pM).

Tableau IV. Classification anatomique du cancer du sein en stades TNM selon l'AJCC.

Stade	**T**	**N**	**M**
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T0	N1mi	M0
	T1	N1mi	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	Tout T	N3	M0
IV	Tout T	Tout N	M1

5.2. Classification histologique

On peut classer le cancer du sein selon les caractéristiques observées en microscopie optique sur des échantillons de biopsies de cellules à partir desquelles la tumeur maligne se développe. Les carcinomes *in situ* sont des carcinomes limités à l'épithélium avec une prolifération qui ne franchit pas la membrane basale. Le carcinome canalaire *in situ* (CCIS) en est le plus couramment rencontré. Ce carcinome se caractérise par une prolifération des cellules épithéliales canalaires et des modifications morphologiques comparables

à ceux du cancer du sein malin, sauf que cette prolifération ne dépasse pas la membrane basale des canaux galactophores (44). Le plus souvent, aucune anomalie n'est observée à l'examen clinique et ce type de carcinome est généralement détecté à la mammographie de dépistage. Même si le taux de survie à 10 ans est supérieur à 95 % (45), il faut noter que 13 à 50 % des CCIS peuvent évoluer vers un cancer invasif sur une période de 10 ans ou plus (46). Le carcinome lobulaire *in situ* (CLIS) est plus rare que le CCIS. Il s'agit d'une prolifération cellulaire anormale au niveau des lobules. Elle concerne souvent plusieurs régions du sein, affectant fréquemment les deux seins à la fois. Le CLIS est difficilement décelable par mammographie ou lors des examens cliniques. Il est souvent découvert de manière fortuite lors de la réalisation de biopsies à la recherche d'autres lésions (47).

Un carcinome est dit infiltrant lorsqu'il y a effraction de la membrane basale qui sépare l'épithélium du tissu conjonctif. Le carcinome infiltrant non spécifique (CINS), autrefois appelé « carcinome canalaire infiltrant », représente 50 à 75 % de la totalité des cancers du sein. Les types spécifiques en constituent 20 à 25%, le plus commun d'entre eux est le carcinome lobulaire infiltrant (CLI) (48). Il existe plusieurs autres types histologiques de cancer du sein qui sont moins répandus, notamment le carcinome tubulaire, le carcinome micropapillaire, le carcinome métaplasique, le carcinome adénoïde kystique, le carcinome mucineux et le carcinome médullaire (35).

5.3. Classification selon le grade histo-pronostic

L'examen anatomo-pathologique permet de déterminer le grade histo-pronostique de la tumeur. La classification la plus couramment employée dans ce but est le système de Nottingham, également appelée la modification Ellis et Elston (49) de l'échelle de Scarff-Bloom et Richardson (SBR). Ce grade est utile pour évaluer l'agressivité de la tumeur. Plus le grade est bas, meilleur est le pronostic. Le pathologiste examine au microscope un prélèvement tissulaire de la lésion suspecte détectée à la palpation ou par mammographie. Trois paramètres morphologiques sont pris en compte pour cette classification :

l'aspect des cellules, le pléomorphisme nucléaire et le nombre de cellules en division. Pour chacun de ces critères un score allant de 1 à 3 est attribué (1 étant le plus proche de la normale) et le score global détermine le grade. Ainsi, un score entre 3 et 5 correspond au grade I qui est le moins agressif. Le grade II est défini par un score de 6 à 7. Enfin, les tumeurs les plus agressives (grade III) correspondent à un score de 8 à 9.

5.4. Classification moléculaire

Grâce au développement de nouvelles technologies d'analyse du génome comme les puces à ADN (*microarrays*), une classification moléculaire a été proposée dès le début des années 2000 et n'a cessé d'être améliorée durant ces dernières années. Elle a l'avantage de mieux tenir compte de l'hétérogénéité du cancer du sein et d'offrir la possibilité de prescrire un traitement adapté au type moléculaire de la tumeur. Le cancer du sein peut être divisé en quatre sous-types moléculaires : Luminal A (ER et/ou PR positif, HER2 négatif), Luminal B (ER, PR et HER2 positifs), HER2 surexprimé (ER et PR négatifs, HER2 positif) et Basal-like dont la majorité sont des cancers triple-négatifs (ER, PR et HER2 négatifs) (50). Le cancer du sein est dit à récepteur hormonal positif lorsqu'au moins, 1% des cellules expriment le récepteur à l'œstrogène (RE+) ou le récepteur à la progestérone (RP+) ; ces tumeurs sont plus fréquentes chez les femmes âgées. Le cancer du sein triple négatif doit son nom au fait qu'il n'exprime aucun de ces trois récepteurs : RE, RP, HER2. Il touche surtout les femmes jeunes noires ou hispaniques et a un moins bon pronostic. Ainsi, le taux de survie à 5 ans pour les patientes atteintes du cancer du sein triple négatif métastatique est d'environ une année contre cinq ans pour les autres sous-types (51). Par ailleurs, plusieurs tests moléculaires ont été validés sur les tissus pour évaluer le pronostic de la maladie : Oncotype DX ™, MammaPrint ® et uPA/PAI-1 (52). Oncotype DX ™ est l'une des signatures moléculaires les plus couramment utilisées. Elle est basée sur la détermination de l'expression de 21 gènes par mesure des acides ribonucléiques messagers (ARNm) correspondants afin de calculer un score de récidive. Selon ce score, les patientes seront réparties en 3 catégories, les scores de plus de 30 sont considérés comme à haut risque, ceux

compris entre 18 et 30 ont un risque intermédiaire et les scores inférieurs à 18 sont considérés comme à faible risque. MammaPrint ® est un autre test moléculaire validé qui utilise des puces à ADN pour évaluer l'expression relative de 70 gènes qui sont principalement impliqués dans les voies régulatrices du cancer. Selon l'expression relative des gènes, les patientes sont divisées en deux groupes, à faible risque et à haut risque de récidive du cancer. L'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) et son inhibiteur principal (PAI-1) sont deux protéines qui jouent un rôle important dans l'invasion cellulaire et l'apparition de métastases. Des concentrations élevées au niveau tissulaire sont associées à une maladie plus agressive (53).

6. Traitement

La prise en charge thérapeutique du cancer du sein repose essentiellement sur la chirurgie dont l'objectif consiste à supprimer la tumeur et les ganglions locorégionaux affectés. Ce traitement localisé est fréquemment associé à d'autres traitements à visée générale notamment la radiothérapie, la chimiothérapie et les thérapies ciblées. Le but étant d'empêcher la prolifération d'éventuelles cellules malignes résiduelles.

6.1. La chirurgie

Il existe deux types de traitements chirurgicaux : la tumorectomie et la mastectomie. Le choix entre ces deux options dépend d'une part de la nature de la tumeur (sa taille et des considérations d'ordre esthétique), et d'autre part, de l'état de la patiente (pathologies sous-jacentes, grossesse…). La tumorectomie correspond à l'exérèse de la lésion (nodule, opacité radiologique ou échographique) se trouvant dans le sein. Elle consiste à retirer uniquement la tumeur et une partie du tissu qui l'entoure. Cette technique est à privilégier lorsque, la taille de la tumeur est inférieure à 2 cm ou un peu plus si les seins sont suffisamment volumineux. À l'opposé, la mastectomie est une exérèse monobloc de la glande mammaire, avec réalisation d'un curage axillaire homolatéral et conservation des muscles petits et grands pectoraux.

La chirurgie réparatrice fait partie intégrante de la prise en charge des patientes. Il existe plusieurs techniques de reconstruction mammaire qui peuvent être proposées aux patientes, sauf en cas de cancer inflammatoire. Le choix entre une reconstruction immédiate ou différée dépendra du type histologique de la tumeur et du traitement ou non de la patiente par chimiothérapie ou radiothérapie (54). Il existe actuellement plusieurs techniques chirurgicales (reconstruction par prothèse, reconstruction par lambeau de grand dorsal autologue, lipomodelage…) pour la réalisation de la reconstruction qui donnent des résultats très satisfaisants (55).

Que ce soit lors de la tumorectomie ou de la mastectomie, le chirurgien peut effectuer une exérèse d'un ou de plusieurs ganglions lymphatiques axillaires et les soumettre à une analyse anatomo-pathologique. Ces interventions chirurgicales tendent de plus en plus à être réalisées en ambulatoire car elles sont de courte durée, sont peu douloureuses et présentent un faible risque de complications (56).

6.2. La radiothérapie

La radiothérapie peut être délivrée à une partie ou à la totalité du sein après tumorectomie, au thorax suite à une mastectomie, ainsi qu'aux régions contenant des ganglions lymphatiques. La radiothérapie permet de diminuer de 60% le risque de récidive locale après chirurgie. Elle consiste à délivrer des rayonnements ionisants (photons X). Les radicaux libres générés vont induire des cassures sur les brins d'ADN et comme, les cellules tumorales se divisent très rapidement comparativement aux cellules saines, les cellules tumorales sont détruites tout en préservant au mieux les cellules saines avoisinantes. La dose moyenne de rayonnement qui a été longtemps utilisée est de 50.4 Grays en 28 séances. Actuellement, on tend à administrer une dose de 42.5 Grays en 16 séances (57).

6.3. La chimiothérapie

La chimiothérapie constitue un traitement essentiel à la fois en thérapie néo-adjuvante et adjuvante. La chimiothérapie néo-adjuvante est systématique

dans les stades avancés et lorsque la tumeur n'est pas opérable, afin de réduire la taille de la tumeur et éventuellement la rendre opérable. Actuellement, la chimiothérapie néo-adjuvante s'étend de plus en plus au cancer du sein à stade précoce, afin d'augmenter les chances de pouvoir, réaliser une chirurgie conservatrice. La chimiothérapie adjuvante sert à prévenir les rechutes chez un grand nombre de patientes atteintes du cancer du sein de stade I à III. En ce qui concerne le cancer du sein avec métastases (stade IV), la chirurgie n'a qu'un intérêt palliatif, la chimiothérapie et l'hormonothérapie représentent le traitement de base pour ces cancers. Enfin, la chimiothérapie représente le traitement systémique le plus couramment utilisé chez les patientes atteintes du cancer du sein triple négatif.

La chimiothérapie peut faire appel à différentes classes médicamenteuses (**Tableau V**), pouvant être prescrites seules ou en associations. La polychimiothérapie semble augmenter l'efficacité et diminuer la toxicité ainsi que le risque de résistance médicamenteuse par comparaison à la monochimiothérapie (58). Les effets secondaires de la chimiothérapie comprennent l'alopécie, les nausées, les vomissements et l'immunosuppression. D'autres effets sont plus rarement observés : insuffisance ovarienne prématurée, infertilité, toxicité cardiaque et rénale, neuropathie et leucémie (35).

Tableau V. Principales molécules de chimiothérapie utilisées dans le traitement du cancer du sein (59).

Dénomination commune internationale	**Spécialité**	**Classe pharmacologique**
Cyclophosphamide	Endoxan®	Moutarde à l'azote, alkylant
Docétaxel	Taxotère®	Taxane, poison du fuseau
Doxorubicine	Adriamycine®	Anthracycline
Épirubicine	Farmorubicine®	Anthracycline
Paclitaxel	Taxol®	Taxane, poison du fuseau
5 fluoro-uracile (5-FU)	Fluoro-Uracile®	Antipyrimidique, antimétabolite

6.4. Les thérapies ciblées

L'avancement des connaissances sur les aspects moléculaires du cancer du sein ont permis l'émergence de nouveaux médicaments agissant de façon plus spécifique, rentrant ainsi pleinement dans le cadre de la médecine personnalisée. On peut adapter les traitements en fonction des récepteurs hormonaux qui sont exprimés par la tumeur en immunohistochimie.

- Les cancers exprimant les récepteurs à l'œstrogène (RE+) sont très sensibles à l'hormonothérapie. Même si dans plusieurs classifications thérapeutiques, l'hormonothérapie est séparée des autres thérapies ciblées, elle reste néanmoins « l'ancêtre » des thérapies ciblées. Le tamoxifène (Nolvadex®) représente le chef de file de cette classe médicamenteuse, qui agit sur la voie du récepteur de l'œstradiol. Ce médicament est en effet un modulateur sélectif des récepteurs à l'œstrogène qui empêche la fixation de l'œstrogène à son récepteur. Le tamoxifène peut être prescrit à la fois aux femmes en pré- et post-ménopause. La mortalité des patientes atteintes d'un cancer du sein RE+ a été réduite de près de 31% grâce à l'hormonothérapie (60).

- Les cancers sur-exprimant l'oncoprotéine HER2 répondent bien au traitement à base d'anti-HER2. Les inhibiteurs de HER2 sont des anticorps monoclonaux qui peuvent agir soit au niveau extracellulaire à l'instar du trastuzumab (Herceptin®) ou intracellulaire comme le lapatinib (Tyverb®). L'association du pertuzumab (Perjeta®) et du trastuzumab donne de meilleurs résultats que l'utilisation du trastuzumab seul. La combinaison de ces deux médicaments améliore considérablement le pronostic avec un taux de survie de près de 5 ans chez les femmes atteintes du cancer du sein métastatique HER2 positif (61).

- Les cancers sur-exprimant à la fois les récepteurs des hormones stéroïdiennes et ceux de HER2 sont résistants à l'action du tamoxifène, sauf lorsque la prescription de ce dernier est associée à la suppression de la fonction endocrinienne ovarienne. Les inhibiteurs de l'aromatase sont une classe de médicaments particulièrement efficaces chez les femmes ménopausées qui

présentent ce profil de récepteurs hormonaux (62). Les inhibiteurs de l'aromatase (létrozole, Fémara® ; anastrozole, Arimidex® ; exémestane, Aromasine®) agissent en diminuant le taux d'œstrogène circulant par blocage de la conversion des androgènes en œstrogènes.

- Les cancers triple-négatifs n'expriment aucun récepteur hormonal. La chimiothérapie constitue le traitement habituel de ces formes. Cependant, on estime que seulement 10 à 15 % des patientes répondent à ce traitement. Trodelvy (sacituzumab govitecan, Gilead®) représente une nouvelle option de traitement du cancer du sein triple négatif résécable ou métastatique. Ce médicament associe un anticorps humanisé conçu pour se lier au récepteur Trop-2 (*trophoblast cell surface antigen 2*) et un agent antinéoplasique, un inhibiteur de la topo-isomérase 1 (63).

Chapitre II : Les microARN

1. Historique

Dans le passé, les petits fragments d'acides nucléiques retrouvés lors du contrôle qualité réalisé au cours des analyses de biologie moléculaire, étaient considérés comme étant des « déchets » issus de la dégradation de l'ADN ou de l'ARN. En 1993, les équipes de Victor Ambros et Gary Ruvkun (**Figure 6**) découvrent le premier microARN, dénommé lin-4, qui joue un rôle important dans le développement du nématode *Caenorhabditis elegans* (64,65). Les microARN ont été officiellement reconnus comme étant une classe à part entière d'ARN non codants à la fin de l'année 2001 (66).



Figure 6. Photographie prise lors de la cérémonie de remise des prix Breakthrough, le 9 novembre 2015, en Californie. Elle montre les lauréats Victor Ambros (à gauche) et Gary Ruvkun (à droite), pour leur co-découverte des microARN.

Depuis, un grand nombre d'équipes de recherche se sont intéressées à la compréhension de la biogenèse, aux mécanismes d'action et aux fonctions

régulatrices des microARN chez les animaux et les végétaux. La première étude à avoir mis en évidence un lien entre des microARN et une pathologie humaine est l'étude de Calin *et al.* qui a révélé une association entre la sous-expression de miR-15 et miR-16 avec la leucémie lymphocytaire chronique (67). En 2008, Lawrie *et al*., ont montré pour la première fois l'intérêt que peuvent avoir les microARN sanguins comme biomarqueurs, en identifiant une signature permettant le diagnostic du lymphome diffus à grandes cellules B (11). Au fur et à mesure de leur découverte, les noms et les séquences des microARN sont collectés dans une base de données qui leur est dédiée, dénommée *miRBase*. On dénombre actuellement plus de 2300 microARN humains matures (68)**.**

2. Biogenèse des microARN

La voie de biogenèse canonique des microARN (**Figure 7**) s'effectue en deux grandes étapes, l'une nucléaire et l'autre cytoplasmique. Cette voie débute par la formation d'un transcrit primaire (pri-miARN) à partir du génome nucléaire. Environ la moitié des microARN sont transcrits à partir des régions intragéniques, en particulier à partir des introns (69). Les gènes des microARN sont souvent transcrits sous forme polycistronique avec un seul promoteur commun, bien que certains microARN soient transcrits sous forme monocistronique avec leurs propres promoteurs. Le pri-miARN présente une structure de type tige-boucle imparfaite d'une longueur supérieure à 1 000 bases avec une coiffe 7-méthyl-guanosine à l'extrémité 5' et une queue polyadénylée à l'extrémité 3'. Le pri-miARN est ensuite digéré par un complexe Microprocesseur constitué d'une molécule Drosha qui est une ribonucléase III de classe 2 et de deux molécules de la protéine *DiGeorge Critical Region 8* (DGCR8), un cofacteur de Drosha. Le dimère DGCR8 reconnaît un motif particulier au sein du pri-miARN afin de le stabiliser. Tandis que Drosha sert de règle moléculaire en effectuant un clivage à une distance de 11 paires de bases (pb) de la jonction ARN simple brin - ARN double brin (70). Il en résulte un transcrit de microARN prématuré (pré-miARN) d'environ 70 nucléotides, ayant une structure en tige-boucle formée par complémentarité imparfaite entre les deux moitiés de la

séquence. Le pré-miARN est acheminé vers le cytoplasme par transport actif faisant appel à l'exportine 5. Cette dernière est une exportine nucléo-cytoplasmique, qui utilise le Ran-GTP (guanine triphosphate) pour contrôler sa liaison au pré-miARN. L'exportine 5 se lie aux pré-miARN à des taux élevés de Ran-GTP dans le noyau et transporte les pré-miARN à travers des pores nucléaires vers le cytoplasme, où les pré-miARN sont libérés à partir du complexe Ran/GTP/exportine 5 lors de l'hydrolyse du GTP. Par la suite, l'exportine 5 libre qui se trouve dans le cytoplasme retourne au compartiment nucléaire et sert d'intermédiaire pour un nouveau cycle de transport de pré-miARN (71).

Dans le cytoplasme, le pré-miARN est clivé par une seconde enzyme de type ribonucléase III, appelée Dicer. Un duplex de microARN est alors produit et des groupements phosphates ainsi que des saillies de deux nucléotides sont ajoutés aux extrémités 3' des deux brins matures. Ce microARN duplex, imparfait et asymétrique, est ensuite pris en charge par le complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*). Ce dernier est composé d'une protéine Argonaute 2 (AGO2), de PACT (*Protein Kinase R-activating protein*), de TRBP (*the human immunodeficiency virus transactivating response RNA binding protein*) et de Dicer. Ce complexe multiprotéique choisit parmi les deux brins du duplex celui qui sera conservé et celui qui sera éliminé ; l'association entre le brin sélectionné et le complexe RISC, est appelée miRISC (mi*RNA-induced silencing complex*). Les proportions des brins 5p et 3p sont variables en fonction du type cellulaire et de l'environnement. La sélection du brin 5p ou 3p dépend de la stabilité thermodynamique aux extrémités 5'. Généralement, le brin ayant la plus grande stabilité est chargé avec les protéines AGO, et est considéré comme étant le « brin guide ». À l'opposé, l'autre brin, qualifié de « brin passager », est dégradé de manière passive. Cependant, des études récentes remettent en question ce dogme selon lequel le microARN du brin passager est simplement un sous-produit non fonctionnel de la biogenèse du microARN (72).

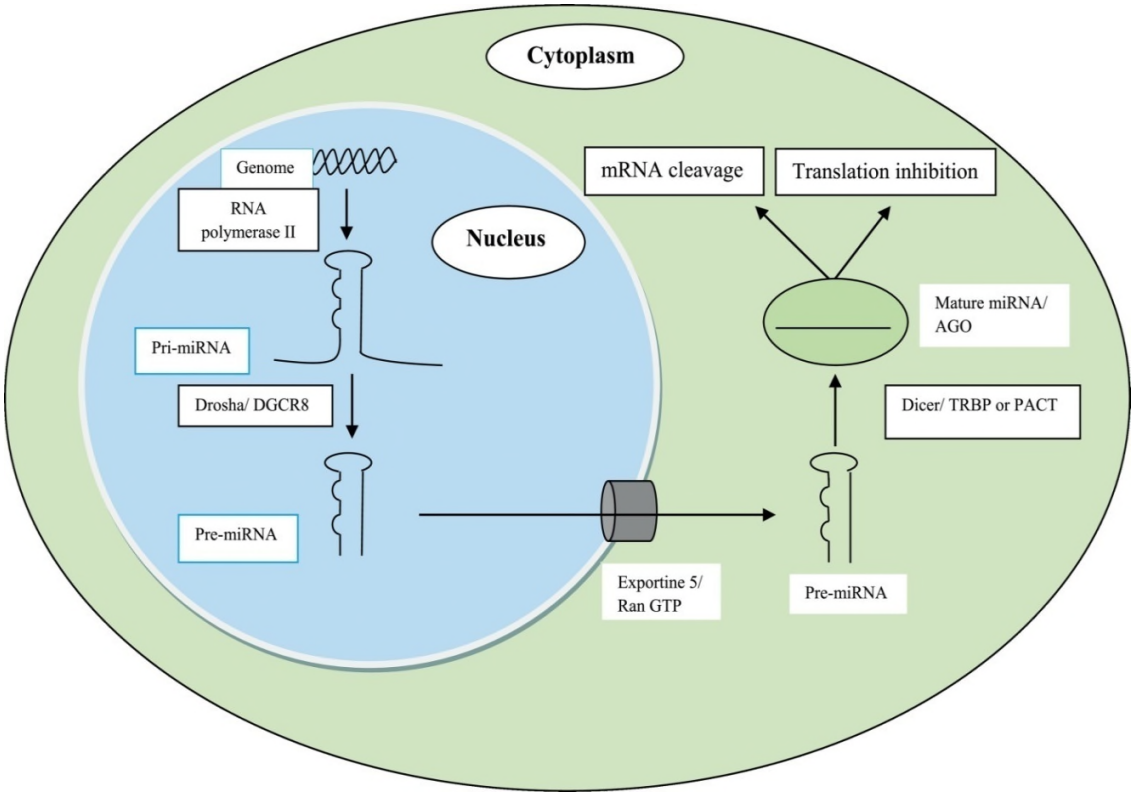


Figure 7. Vue d'ensemble sur la biogenèse des microARN (D'après Zendjabil, 2018) (12).

3. Fonctions et mécanismes d'action

Les microARN sont impliqués dans une multitude de processus physiologiques y compris le métabolisme cellulaire, l'apoptose, la croissance, la prolifération et la différentiation cellulaire. Même si du point de vue quantitatif, les microARN représentent une faible fraction de la totalité des ARN cellulaires, le nombre de copies des microARN dépasse souvent celui de leurs ARNm cibles. Ainsi, un seul microARN peut avoir pour cibles jusqu'à 200 ARNm, de même, plusieurs microARN peuvent agir sur un même ARNm de manière intégrée et synergique (73). Les microARN agissent (**Figure 8**) en empêchant la traduction de leurs ARNm cibles ou bien en les déstabilisant, ce qui entraine leur dégradation. Les bases des nucléotides 2 à 8 de l'extrémité 5' du microARN se lient par complémentarité à leurs éléments de réponse (MRE : *microRNA response element*) contenus dans la région 3'UTR (3'-*untranslated region*) de

l’ARNm ou plus rarement dans les régions 5’UTR ou dans les régions codantes de leurs cibles (74). Le sort de l’ARNm cible dépend du degré de complémentarité entre le microARN et l’ARNm. Une complémentarité totale induit la dégradation de l’ARNm, tandis qu’une complémentarité partielle entraine plutôt à une répression de la traduction (75).

Normalement, la traduction est initiée par des modifications se produisant aux niveaux de la coiffe en 5’ de l’ARNm et de sa queue poly(A). Le complexe du facteur d'initiation de la traduction 4F (eIF4F) se lie à la coiffe en 5’ et recrute la sous-unité ribosomale 40S, tandis que la *poly(A) binding protein* (PABP) se lie à la queue poly (A) en 3’. La traduction de l’ARNm débute par la formation d’une conformation en boucle fermée par interaction du PABP avec la sous-unité eIF4G. Le miRISC peut inhiber la traduction grâce aux protéines AGO qui dissocient le complexe eIF4F de la coiffe en 5’, la sous-unité ribosomal n’est alors pas recrutée, ce qui empêche l’initiation de la traduction. Le miRISC peut également recruter une protéine nommée GW182 qui fournit l’échafaudage nécessaire au recrutement d’autres protéines effectrices, en commençant par la PABP, suivie par les poly(A)-désadénylases 2/3 (PAN2/3) qui initient la désadénylation et CCR4-NOT (*carbon catabolite repression 4 – negative on TATA-less*) qui termine le processus. L’élimination de la coiffe est ensuite facilitée par la DCP2 (*decapping protein 2*) et enfin la dégradation en 5’-3’ est assurée par l’exoribonucléase 1 (XN1) (69,76).

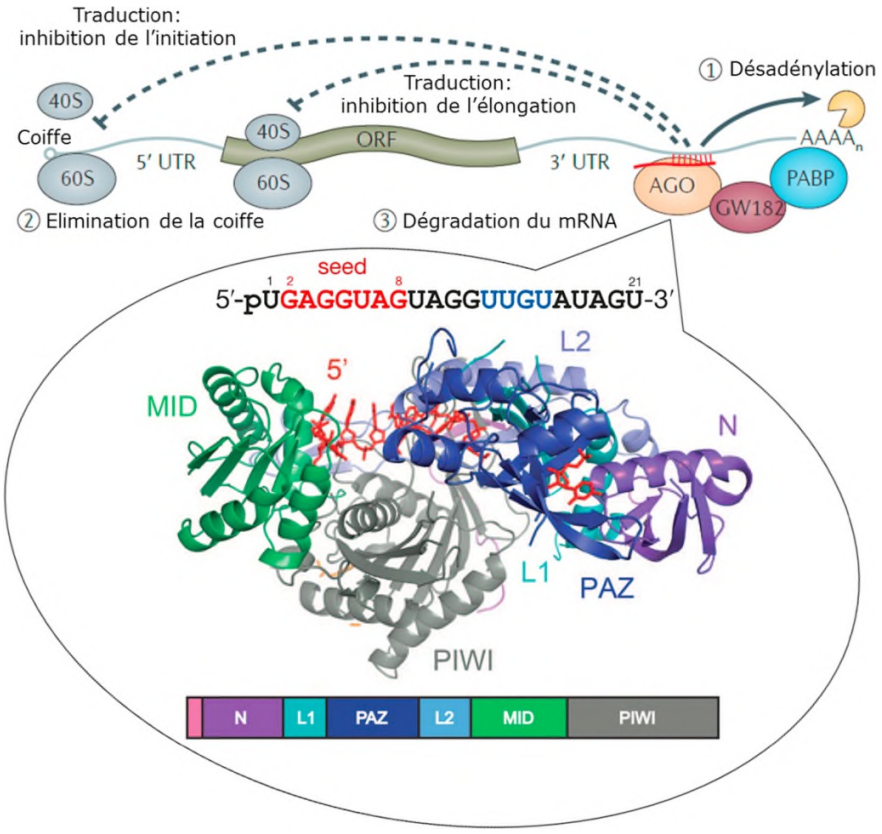


Figure 8. Mécanisme d'action des microARN (D'après Zendjabil *et al.*, 2017) (77).

4. Rôle des microARN dans le développement du cancer du sein

Il existe de nombreuses interactions entre les fonctions des microARN et les grandes voies de l'oncogenèse (**Figure 9**). Parmi la dizaine de caractéristiques distinctives nécessaires aux cellules tumorales pour qu'elles acquièrent les capacités spécifiques dictant leur survie, leur prolifération et leur dissémination, on en retrouve une large majorité pour lesquelles l'implication des microARN a été établie.

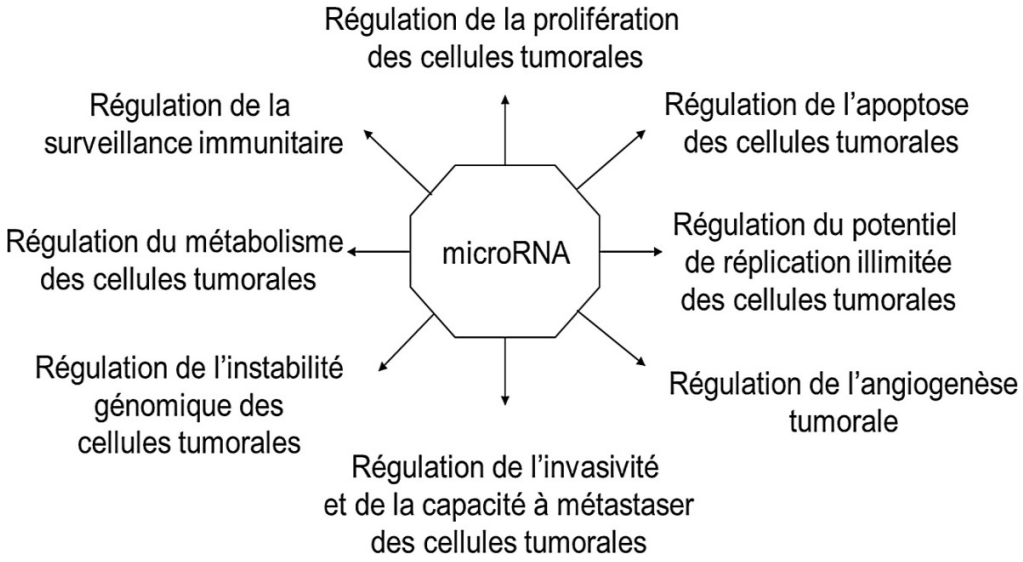


Figure 9. Interaction des microARN avec les grandes voies de l'oncogenèse (D'après Zendjabil *et al.*, 2017) (77).

Les microARN contribuent de manière significative au développement du cancer du sein en agissant sur la multiplication et le cycle cellulaire, l'apoptose, l'inflammation, le pouvoir métastatique, l'angiogenèse, la reprogrammation métabolique et l'échappement à la surveillance du système immunitaire (78). On distingue globalement deux catégories de microARN, ceux qui agissent comme des suppresseurs de tumeurs et ceux qui agissent comme des oncogènes (**Figure 10**). Le premier groupe de microARN inhibe la formation de tumeurs en supprimant l'expression des oncogènes. À l'opposé, le second groupe de microARN est généralement surexprimé lors de la formation du cancer en supprimant l'expression de gènes suppresseurs de tumeur, ce qui entraîne une croissance cellulaire aberrante, une prolifération, une perte d'apoptose et des métastases.

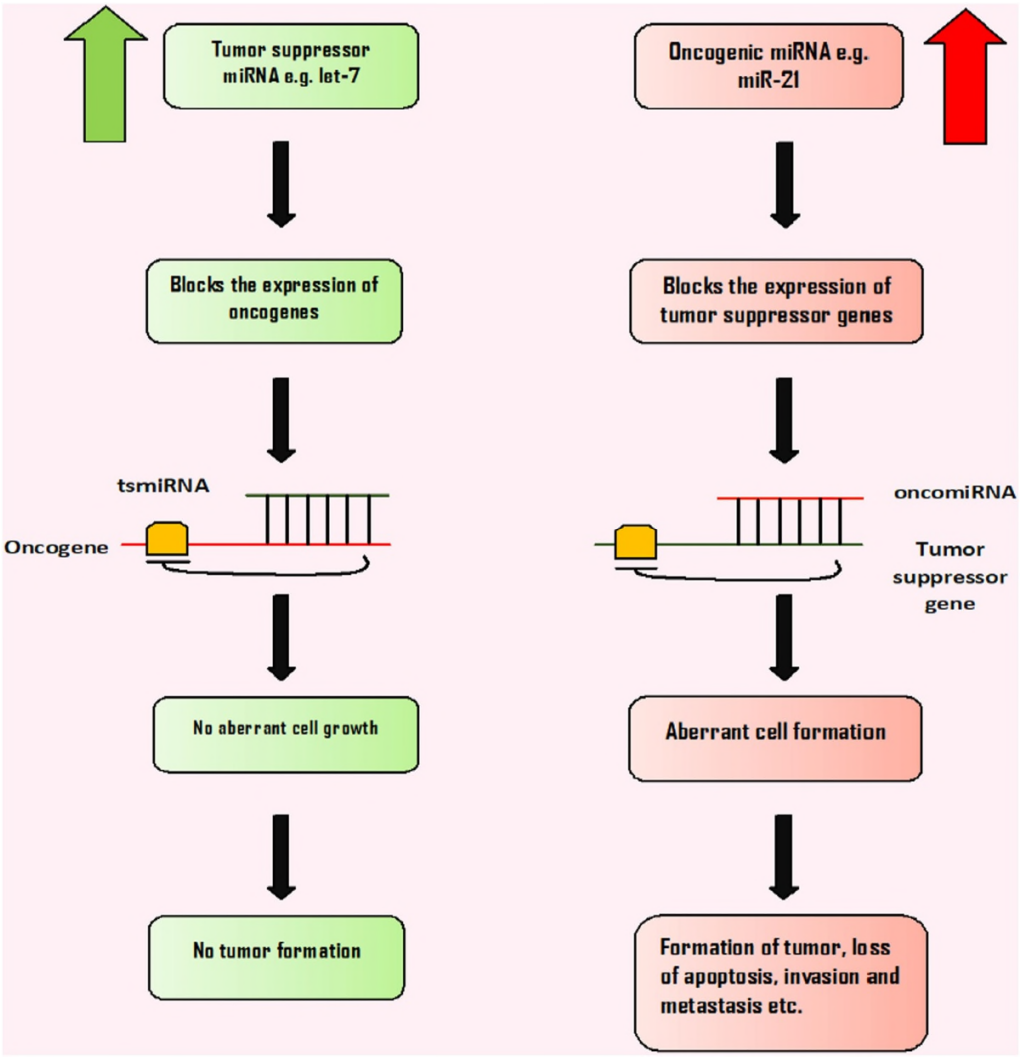


Figure 10. Rôle des microARN comme suppresseur de tumeur et oncogènes dans la formation des tumeurs (d'après Saikia *et al.*, 2020) (79).

On peut citer comme exemple de microARN agissant en tant qu'oncogène, le miR-21, qui semble avoir pour cible plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs à l'instar de Leucine zipper transcription factor like 1 (LZTFL1), ce qui expliquerait l'association décrite entre la surexpression de miR-21 et la prolifération des cellules tumorales et l'apparition de métastases (80). À l'inverse, miR-34a a un effet protecteur en agissant comme suppresseur de tumeur par induction de la réduction de l'expression de HER2, un oncogène appartenant à la famille *epidermal growth factor receptor* (EGFR), bien connu pour son implication

dans le développement des maladies cancéreuses notamment du cancer du sein (81). Le **Tableau VI** regroupe un plus grand nombre d'exemples de microARN impliqués dans le développement du cancer du sein avec leurs cibles et le sens de leur dérégulation.

Tableau VI. Expression dérégulée des microARN et de leurs cibles dans le cancer du sein (d'après Khan *et al.*, 2019) (82).

miARN	**Cible**	**Dérégulation**
miR-21	B-cell CLL/lymphoma 2 (BCL2), Programmed cell death 4 (PDCD4), Members RAS oncogene family (RAB6A & RAB6C), RAS p21 protein activator (RASA1), RAS homolog gene family member B (RHOB), Transforming growth factor-beta-induced protein (TGFBI), Transforming growth factor beta receptor II (TGFBR2) and v-ski sarcoma viral oncogene homolog (SKI)	Sur-régulation
miR-27b-3p	E3 ubiquitin protein ligase (CBLB) and Growth factor receptor bound protein 2 (GRB2)	Sous-régulation
miR-362-3p et miR-329	p130Cas	Sous-régulation
miR-138	Regulation of nuclear pre-mRNA (CREPT)	Sous-régulation
miR-539	Epidermal growth factor receptor (EGFR)	Sous-régulation
miR-539	Epidermal growth factor receptor (EGFR)	Sous-régulation
miR-494	p21 (RAC1) activated kinase 1 (PAK1)	Sous-régulation
miR-455	Cyclin dependent kinase 14 (CDK14)	Sous-régulation
miR-630	B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1 (BMI1)	Sous-régulation
miR-143-3p	Mitogen activated protein kinase 7 (MAPK7)	Sous-régulation
miR-20a-5p	Runt related transcription factor 3 (RUNX3)	Sur-régulation
miR-129	Lamin A/C (LMNA)	Sur-régulation
miR-183-5p	Programmed cell death 4 (PDCD4)	Sur-régulation

5. Arguments en faveur de l’utilisation des microARN comme biomarqueurs du cancer du sein

La recherche des acides nucléiques dans les liquides biologiques a constitué ces dernières années un moyen utile au diagnostic et au suivi des maladies cancéreuses. Ces acides nucléiques qui étaient autrefois recherchés uniquement sur les biopsies tissulaires, sont actuellement de plus en plus mesurés dans les liquides biologiques, offrant dans ce dernier cas l’avantage d’être non invasifs. La biopsie liquide se définit, comme le prélèvement d’un échantillon de sang ou d’un autre liquide biologique suivi de l’analyse des cellules anormales circulantes, des microvésicules (exosomes) libérées par ces cellules ou les tissus et des acides nucléiques libres circulants (ADN, ARN messager, microARN) (83). Les microARN émergent comme une nouvelle classe de biomarqueurs des maladies cancéreuses, dont l’expression peut être mesurée dans les tissus et mieux encore dans les biopsies liquides. Les cellules tumorales ainsi que les cellules non tumorales libèrent des microARN dans les milieux extracellulaires (**Figure 11**) et cette production peut se faire sous plusieurs formes. Environ 90% des microARN sont transportés sous forme non vésiculaire, associés à des protéines AGO, en particulier AGO2. Les microARN peuvent également être associés à des lipoprotéines de haute densité (HDL) ou à d'autres protéines telles que la nucléophosmine 1 (NPM1). En outre, les microARN sont contenus dans les exosomes. Ces derniers représentent une classe de vésicules de 30 à 100 nm qui sont sécrétées par les corps multi-vésiculaires et libérées suite à la fusion avec la membrane cellulaire. Les exosomes semblent être des messagers qui ont un impact fonctionnel sur les cellules receveuses et le contenu des exosomes représente une empreinte digitale des cellules sécrétoires et leur statut. Les microARN peuvent ensuite passer des milieux extracellulaires vers la circulation générale.

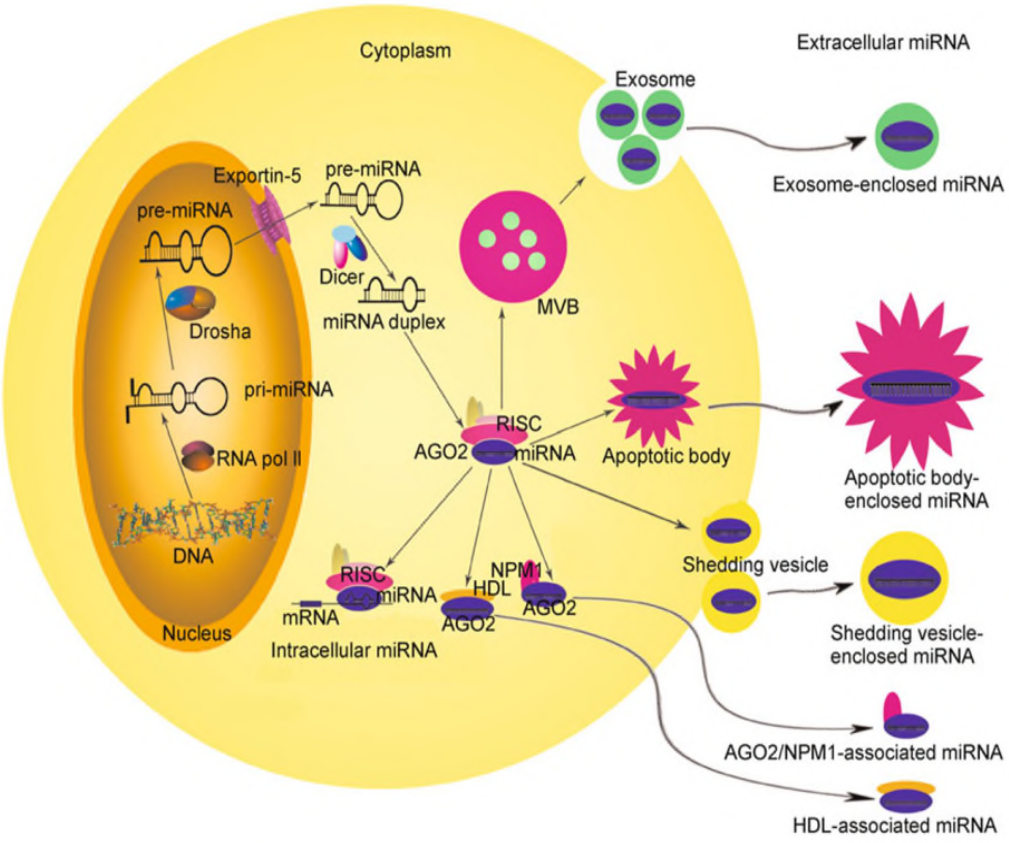


Figure 11. Sécrétion et libération des microARN dans le milieu extracellulaire (D'après Chen *et al.*, 2012) (73).

Ce mode de transport permet aussi d'expliquer un autre avantage majeur des microARN, leur stabilité exceptionnelle. En effet, les différentes formes de transports des microARN les préservent de la dégradation par les RNases, les rendant particulièrement stables par comparaison à d'autres acides nucléiques, comme les ARNm. Une preuve frappante de cette grande stabilité est la présence de microARN intacts dans des organes de momies cryoconservées de plus de 5 300 ans (84).

Si on compare les microARN aux biomarqueurs conventionnels souvent de nature protéique, le niveau de sensibilité atteint pour les microARN grâce à l'amplification par PCR est bien supérieur à ce qui est actuellement disponible pour les protéines. En effet, le seuil de détection de la spectrométrie de masse

est de l’ordre du µg/mL, alors qu’on pense que les marqueurs protéiques les plus intéressants se trouvent dans le sang à des concentrations inférieures à 10 ng/mL (85).

Dans une méta-analyse qui a inclus 11 études comparant l’expression des microARN dans les tissus de patientes atteintes du cancer du sein, deux microARN (miR-21 et miR-210) ont été exprimés à la hausse et six microARN (miR-145, miR-139-5p, miR-195, miR-99a, miR-497 et miR-205) ont été régulés à la baisse de manière consistante dans au moins trois études. miR-21 étant le microARN le plus régulièrement retrouvé à la hausse dans six études de profilage (86). Au niveau sanguin, un nombre croissant d’études décrit le potentiel des microARN sanguins comme biomarqueurs du cancer du sein (87,88).

Chapitre III : Aspects méthodologiques de l'analyse des microARN circulants

La mesure de l'expression des microARN dépend de plusieurs variables qui seront exposées en détail dans ce chapitre. Pour aboutir à des résultats de microARN reproductibles et potentiellement informatifs, il faut garantir une standardisation stricte de l'ensemble du processus, de l'obtention des échantillons à la communication des résultats. Quelle que soit la méthodologie utilisée dans une étude de recherche sur les microARN, il est indispensable de l'appliquer de manière rigoureuse à l'ensemble des échantillons appartenant aux malades et aux témoins, afin de s'assurer que les différences d'expression observées sont réellement dues à la pathologie étudiée et non pas à une variabilité dans le processus d'analyse.

1. Phase pré-analytique

La bonne maitrise de la phase pré-analytique au laboratoire est essentielle pour assurer la qualité des résultats. En effet, de manière générale, plus de 70 % des erreurs rencontrées au laboratoire se produisent durant cette phase (89).

1.1. Matrice

Les microARN peuvent être recherchés aussi bien dans les tissus que dans les liquides biologiques comme le sang, la salive, les urines et le liquide céphalorachidien (LCR). Même si les microARN sont en général plus abondants dans les tissus que dans les liquides biologiques, c'est dans ces derniers que la quantification des microARN semble être la plus intéressante. L'obtention d'un échantillon tissulaire nécessite la réalisation d'une biopsie, un acte invasif pouvant être lui-même à l'origine d'évènement néfaste pour le patient. À l'opposé, les liquides biologiques sont beaucoup plus accessibles, le

prélèvement est mieux toléré par le patient avec un risque pratiquement nul de survenu d'effets indésirables. Comme la plupart des examens biologiques, le sang représente le liquide biologique de choix pour l'analyse des microARN.

1.2. Choix de l'anticoagulant

L'analyse peut être réalisée sur sang total, plasma ou sérum. Plusieurs technologies ont été développées pour mieux préserver le contenu en espèces d'ARN du sang total à l'instar de PAXgene®, RNAlater® et Tempus® qui peuvent être utilisées pour la quantification des microARN. En ce qui concerne le sérum et le plasma, les résultats obtenus sur ces deux matrices ne sont pas similaires (90,91). Il n'existe actuellement aucune preuve de la supériorité de l'un sur l'autre, même si le plasma semble être préférable (92). En effet, il y a certes moins de contamination plaquettaire avec le sérum qu'avec le plasma, mais la formation du caillot lors de la coagulation peut entrainer la libération de microARN confondants à partir des cellules sanguines. Dans le cas du plasma, il est recommandé d'utiliser comme anticoagulant, l'acide éthylène diamine tétraacétatique (EDTA). L'héparine est à proscrire car elle pourrait inhiber la *polymerase chain reaction* (PCR) (93). Le citrate doit également être évité à cause de l'hémolyse qu'il pourrait générer.

1.3. Centrifugation

Les conditions de centrifugation ont un impact considérable sur les résultats. Il est recommandé de procéder rapidement à la centrifugation des échantillons, dans un délai n'excédant pas les deux heures après le prélèvement. Il est par la suite nécessaire de filtrer ou de centrifuger une seconde fois le plasma ou le sérum. La première centrifugation a pour but d'éliminer les leucocytes et les plaquettes qui sont très riches en microARN et peuvent constituer une source d'erreurs. En outre, les plaquettes affectent la conservation des échantillons (94), d'où la nécessité de les éliminer avant de congeler les échantillons. La seconde centrifugation ou encore la filtration permet de s'assurer de l'élimination des débris cellulaires et donc de l'obtention de plasmas appauvris en plaquettes et propices au dosage des microARN (95).

1.4. Influence de l'hémolyse

L'hémolyse est gênante dans le cadre du dosage des microARN sanguins, car elle est associée à une modification significative de l'expression de nombreux microARN, notamment ceux qui sont utilisés comme références endogènes (96). Il est également à noter que les échantillons hémolysés se conservent mal par congélation, avec une nette différence dans l'expression des microARN avant et après congélation. Pour s'assurer de l'absence d'hémolyse dans le sérum ou le plasma, il est possible d'évaluer le ratio miR-451/miR-23, une valeur élevée du ratio étant en faveur d'une hémolyse, ou bien tout simplement mesurer l'absorbance de l'hémoglobine par spectrophotométrie à 414 nm.

1.5. Conservation

Les sérums ou plasmas peuvent être conservés pendant 24 heures à température ambiante ou à 4°C. La conservation à long terme est possible durant au moins une année à -20°C ou à -80°C (97). Les températures basses réduisent de manière considérable l'activité des ribonucléases (RNases) permettant une bonne conservation des échantillons. Grâce à ces différentes formes de transport, les microARN sont beaucoup plus stables que d'autres acides nucléiques comme les ARNm. Les résultats de Grasedieck *et al.* (98) montrent que les échantillons congelés restent stables pendant plusieurs années et que le dosage des microARN sur des échantillons stockés à -20°C donnent des résultats similaires à ceux obtenus sur des échantillons conservés à -80°C. Ceci est un avantage majeur en faveur de l'utilisation des microARN comme biomarqueurs. En effet, tous les laboratoires ne sont pas dotés de congélateur à -80°C, tandis que des congélateurs avec des températures entre -15°C à -30°C sont largement disponibles. Les cycles de congélation/décongélation sont à éviter.

1.6. Extraction

Les méthodes classiques d'extraction des ARN totaux par le mélange thiocyanate de guanidinium/phénol/chloroforme ne sont pas appropriées pour l'extraction des microARN. D'une part, des contaminants sont souvent présents

lors de l'utilisation de ces méthodes. D'autre part, il a été constaté que les microARN à faible teneur en guanine-cytosine sont sélectivement perdus à cause de l'inefficacité de la précipitation des petits acides nucléiques par rapport aux acides nucléiques longs (99).

Certains auteurs ont proposé d'adapter l'extraction au phénol-chloroforme en procédant à quelques modifications, notamment en supprimant l'étape de lavage à l'éthanol 70% et en laissant sécher le culot d'ARN pendant au moins une heure à température ambiante (100). En pratique, on utilise plutôt des kits commercialisés adaptés aux microARN comme mirVana® (Thermo Fischer Scientific®) ou miRNeasy Serum/Plasma® (Qiagen®). Ces kits associent la séparation de phase par le phénol à une purification par adsorption sur colonne à membrane de silice (**Figure 12**). Des kits plus récents comme miRNeasy advanced kit® (Qiagen®) s'affranchissent de l'étape de séparation de phase, ce qui permet d'automatiser l'étape de l'extraction.

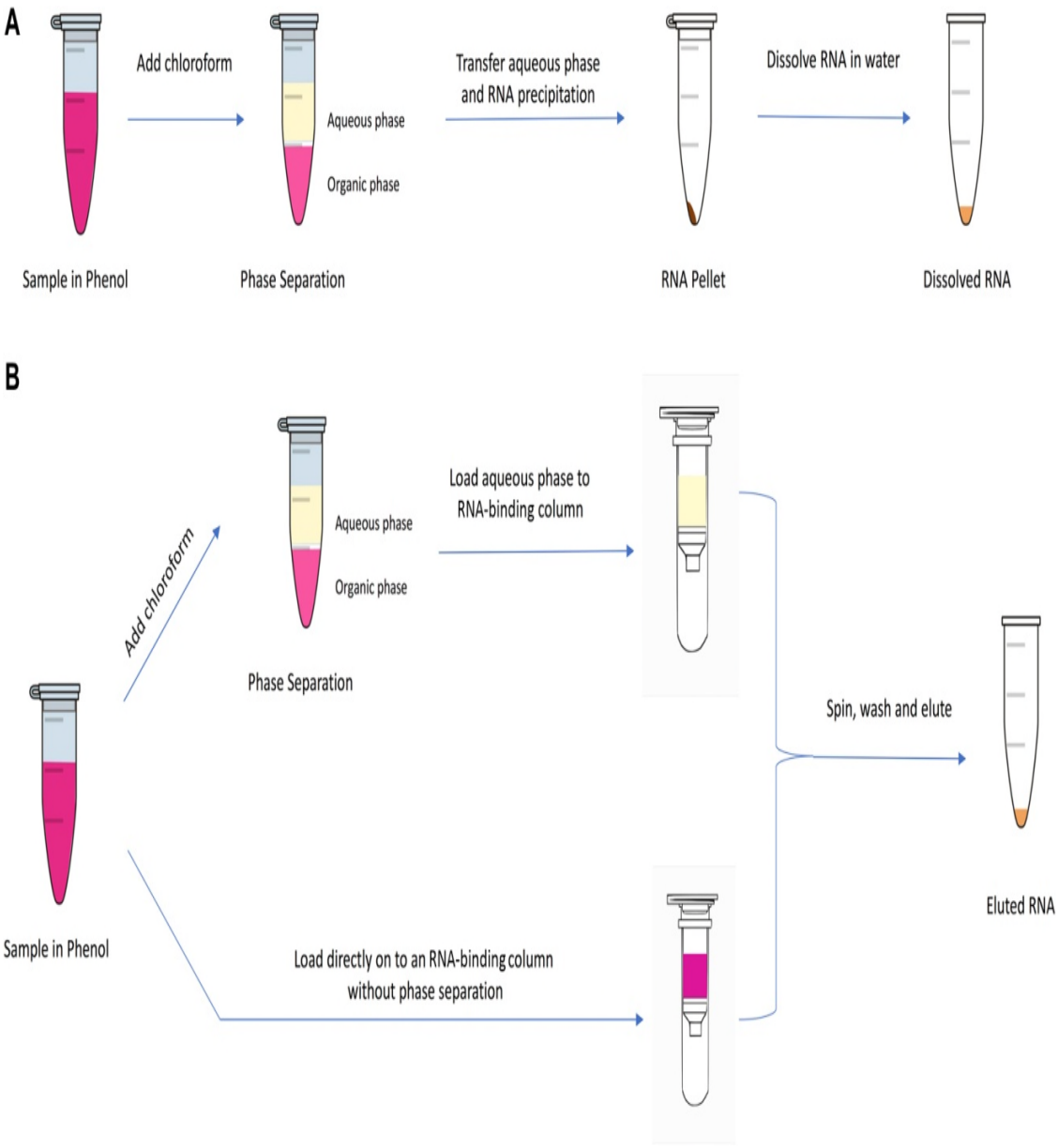


Figure 12. Méthodes d'extraction des microARN (101). **A/** Extraction au phénol-chloroforme. **B/** Extraction par adsorption sur colonne avec ou sans séparation de phase.

2. Phase analytique

Le *Northern blot* a été la première technique utilisée pour la détection des microARN (102). Toutefois, cette méthode est lente, laborieuse et n'a pas une bonne reproductibilité. L'intérêt croissant pour les microARN a conduit au

développement de techniques de détection mieux adaptées à ces acides nucléiques de petite taille. Actuellement, les méthodes les plus utilisées pour l'analyse des microARN (**Tableau VII**) sont la qRT-PCR (*quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*), les *microarrays* et le séquençage de nouvelle génération (NGS). A l'instar de la PCR digitale, des méthodes de développement plus récent ont également émergé durant ces dernières années.

Tableau VII. Avantages et inconvénients des méthodes actuelles utilisées pour détecter les microARN (adapté de Chandrasekaran *et al*., 2019) (103).

Méthode	**Avantages**	**Inconvénients**
qRT-PCR	Largement utilisée pour sa grande sensibilité.	Manque de multiplexage et de couverture à l'échelle du génome, biais et erreurs dus à l'amplification exponentielle.
Microarrays	Fournit une couverture à l'échelle du génome.	Nécessite des sondes spécifiques et un équipement spécialisé, la normalisation des données est difficile et manque de reproductibilité entre les différentes plates-formes.
NGS	Fournit une couverture à l'échelle du génome, identifie les nouveaux microARN et SNP dans les microARN.	Nécessite un équipement spécialisé et un bioinformaticien qualifié, analyse de données compliquée.

qRT-PCR : quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction ; NGS : séquençage de nouvelle génération ; SNP : *single nucleotide polymorphism.*

2.1. qRT-PCR

Grâce à sa grande sensibilité, son large domaine de mesure et sa grande spécificité de séquence, la qRT-PCR constitue la méthode de référence pour la mesure de l'expression des microARN (104). Un autre avantage majeur de la qRT-PCR est sa large disponibilité dans les laboratoires, car cet équipement est utilisé pour un grand nombre d'applications de routine, comme la recherche de virus ou d'ARNm d'intérêt clinique. La méthodologie consiste comme son nom l'indique en une réaction de transcription inverse suivie d'une étape de détection par réaction de polymérisation en chaine quantitative. À cause du faible nombre de nucléotides contenus dans les microARN, l'étape de transcription inverse diffère quelque peu de celle des ARN viraux ou des ARNm. Deux principales alternatives sont possibles pour résoudre le problème de la petite taille des microARN. La première solution, adoptée par Qiagen®, consiste à ajouter une queue poly(A) à l'extrémité 3' du microARN et la transcription inverse est réalisée grâce à une amorce oligo(dT). Pour garantir la spécificité du test, un tampon particulier (*HiSpec Buffer*) est ajouté au mélange réactionnel, afin d'inhiber la transcription inverse des longs ARN codants et non codants. L'ADN complémentaire (ADNc) formé est par la suite amplifié à partir de deux amorces, l'une universelle et l'autre spécifique du microARN à quantifier. Le produit de l'amplification est mesuré grâce à la fluorescence émise par le SYBR® Green. Ce dernier est un agent intercalent fluorescent qui se fixe aux acides nucléiques doubles brins avec une augmentation de la fluorescence d'environ 800 à 1 000 fois le signal de base.

La seconde approche est basée sur l'utilisation d'une amorce ayant une structure de type tige-boucle (en épingle à cheveux). L'amorce s'hybride à l'extrémité 3' du microARN par complémentarité de bases (**Figure 13**), tandis que la partie tige-boucle de l'amorce va se coller à l'extrémité 5' du microARN. Par la suite, une sonde Taqman s'hybride à l'ADNc formé. Au fur et à mesure que l'ADN polymérase avancera, la sonde s'hydrolyse, ce qui va libérer le *quencher* et entrainer l'apparition d'une lumière fluorescente. Le choix entre ces deux principales approches de quantification des microARN doit se baser sur la

nature de la cible recherchée. Ainsi, la stratégie utilisée par Qiagen® permet de quantifier l'ensemble des isomiR en 3' du microARN recherché, tandis que la méthode Taqman® est plus spécifique d'un seul ou d'un sous-groupe d'isomiR (105).

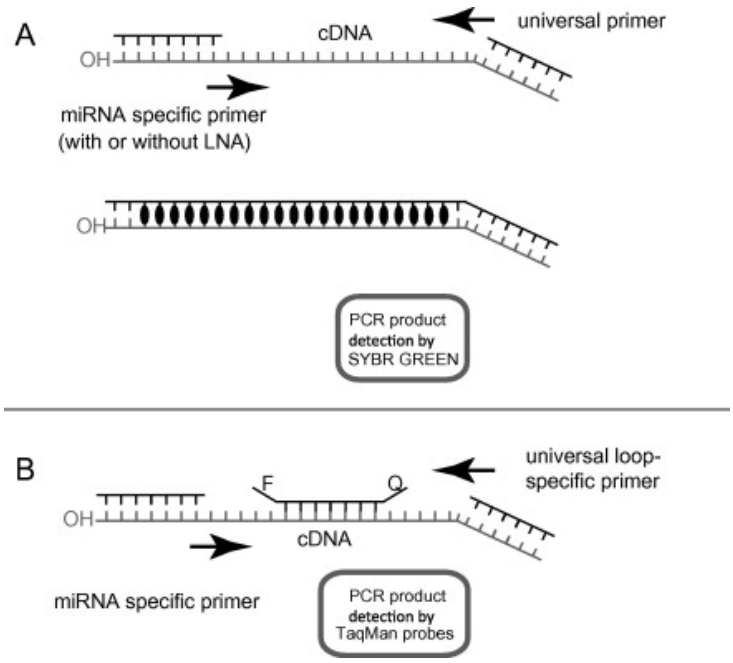


Figure 13. Détermination de l'expression des microARN par qRT-PCR. Détection de l'amplicon à l'aide des sondes SYBR® Green (A) ou TaqMan (B) (106).

2.2. PCR digitale

C'est une nouvelle technologie de biologie moléculaire qui a été appliquée à la quantification absolue des microARN. Le principe de la PCR digitale (**Figure 14**) consiste à compartimentaliser l'acide nucléique d'intérêt de manière que seulement une faible quantité de molécules soit présente dans chaque compartiment. Les compartiments peuvent se présenter en milieu solide sous forme de « micro-chambres » ou en milieu liquide sous forme d'émulsions. Cette dilution limite fait que chaque compartiment contient une ou zéro molécule cible. En présence de la molécule cible, l'amplification par PCR entraine l'apparition d'un signal de fluorescence qui est lu comme 1, si à l'inverse aucun signal

fluorescent n'est détecté, il est interprété comme 0. Les données obtenues sont analysées par la fonction de distribution de probabilité de Poisson, en fonction du nombre total de compartiments, du nombre de signaux fluorescents et du coefficient de dilution de l'échantillon, la valeur initiale de la concentration dans l'échantillon peut être obtenue (107).

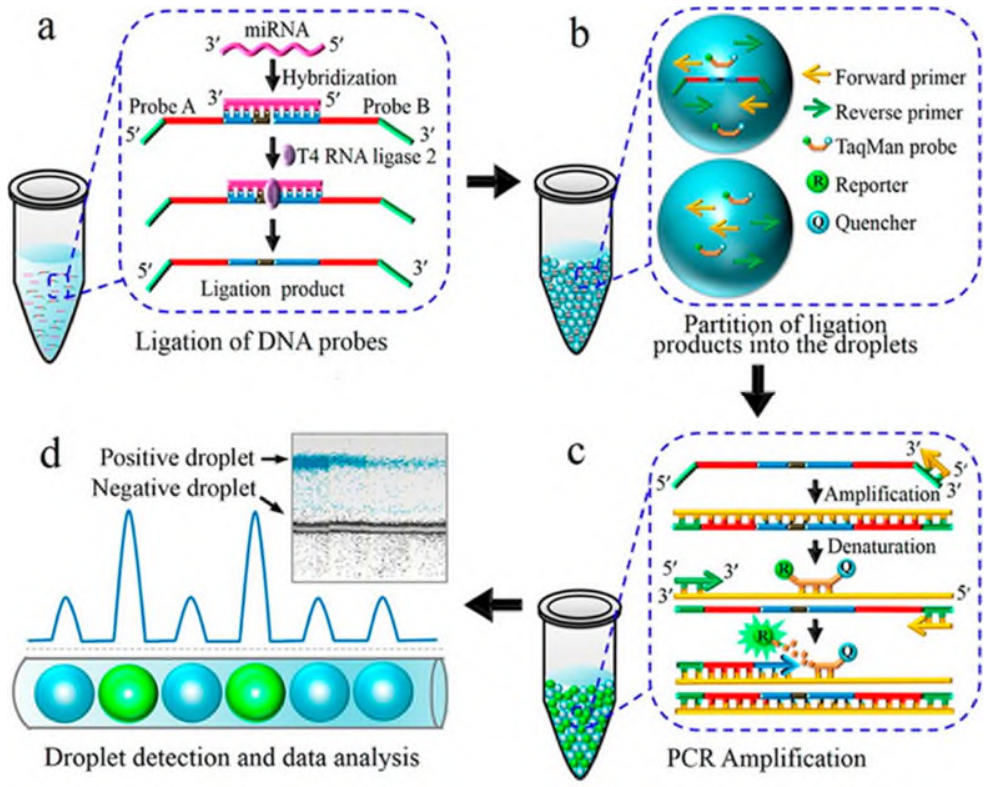


Figure 14. Principe de la PCR digitale pour le dosage des microARN (D'après Ouyang *et al*., 2019) (108).

La PCR digitale possède l'avantage de pouvoir s'affranchir du besoin, de réaliser une courbe d'étalonnage et par la même occasion de l'influence des stratégies de normalisation. Elle a aussi l'avantage d'être sensible et de présenter une bonne exactitude pour la mesure des microARN de faible abondance. Le dosage est précis et reproductible sur une gamme de concentrations de quatre ordres de grandeur avec une sensibilité permettant la détection d'un microARN cible à des niveaux allant jusqu'à 1 copie/µL (109). L'inconvénient majeur de cette méthode est la nécessité d'instruments, réactifs et consommables spécifiques dont le coût reste conséquent.

2.3. Microarrays

Les *microarrays* sont constituées d'un support solide sur lesquelles sont déposés ou synthétisés in situ de courts oligonucléotides ayant la même séquence que les microARN recherchés (**Figure 15**). Par transcription inverse, des sondes marquées par un fluorochrome ou par de la biotine vont être produites en phase liquide à partir des microARN présents dans l'échantillon. Ces sondes sont incubées pendant plusieurs heures et subissent plusieurs lavages avant que le signal émis ne soit mesuré. Afin d'améliorer l'analyse, des sondes contenant des acides nucléiques bloqués (*Locked Nucleic Acids* ou LNA) ont été développées. Ce sont des dérivés d'oligonucléotides dans lesquelles les atomes de carbone 2' et 4' sont reliés par un groupement méthylène. Ayant des températures de fusion (Tm) plus élevées, l'utilisation des LNA comme sondes offre une plus grande stabilité thermique lors de l'hybridation moléculaire, ce qui augmente considérablement la sensibilité de la technique et diminue le temps d'incubation (110).

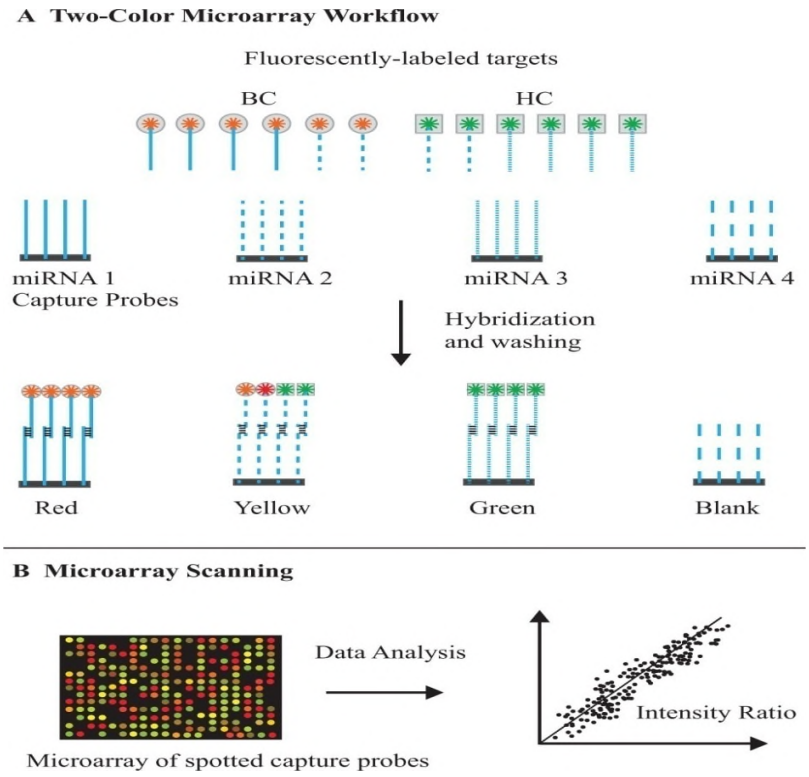


Figure 15. Analyse des microARN par *microarrays* (30).

Les *microarrays* ont l'avantage d'avoir un débit élevé et une grande capacité de multiplexage. Cependant, leur faible sensibilité et la nécessité d'une longue incubation empêchent leur utilisation en pratique courante. En outre, les *microarrays* ne représentent pas vraiment une technique d'analyse quantitative. Il est donc indispensable de valider les résultats des microARN d'intérêts par qRT-PCR.

2.4. Séquençage de nouvelle génération (NGS)

Le NGS permet de déterminer le profil de milliers de microARN lors d'une même expérience et la découverte de nouveaux microARN (111). C'est ici l'avantage majeur du NGS, la possibilité de quantifier des microARN connus et ceux dont la séquence n'est pas encore connue. Un autre avantage du NGS, est la possibilité de mesurer l'expression de milliers de microARN en même temps et dans une même expérience, sachant que certains d'entre eux sont très abondants et d'autres sont peu abondants dans l'échantillon. Malgré ces avantages, le NGS présente de nombreuses limites qui freinent considérablement son utilisation. Premièrement, sa précision n'est pas aussi bonne que celle de la qRT-PCR ou des *microarrays*. Deuxièmement, son coût élevé, sa faible capacité à être automatisée et sa consommation excessive de temps empêchent l'utilisation de la NGS en pratique courante. Le **Tableau VIII** compare différentes plateformes analytiques de NGS.

Tableau VIII. Comparaison entre différentes plateformes de NGS (112).

	454 Sequencing® (Roche®)	**Solexa® (Illimunina®)**	**ABI SOLiD® (Life technologies®)**
Principe	Pyroséquençage	Séquençage par synthèse	Séquençage par ligation
Amplification	PCR en émulsion	Amplification en pont	PCR en émulsion
Distance entre *paired-end*	3 kb	200-500 pb	3 kb
Mb par lecture	100 Mb	1300 Mb	3000 Mb
Temps pour la lecture de *paired-end*	<0.5 jour	4 jours	5 jours
Taille de la lecture	100-400 pb	15-200 pb	15, 35 et 50 pb

Kb : kilo-bases ; Mb : méga-bases ; pb : paires de bases.

3. Phase post-analytique

Pour pallier les effets des différentes variables tout au long du processus de la détermination de l'expression des microARN comme la qualité des microARN extraits et l'efficacité de la transcription inverse, les résultats sont exprimés par rapport à un standard, c'est la normalisation des résultats. Il existe trois types de stratégies de normalisation : les contrôles exogènes, les contrôles endogènes et la normalisation par la valeur d'expression moyenne.

3.1. Contrôles exogènes

Les liquides biologiques comme le plasma étant beaucoup moins riches en ARN que les tissus, l'ajout d'un microARN exogène lors de l'extraction permet d'évaluer le rendement de cette étape et de s'assurer de l'efficacité de la RT-PCR. Le microARN de *Caenorhabditis elegans* cel-miR-39 est fréquemment utilisé dans cette indication comme contrôle exogène pour la normalisation des données. Les snoARN (*small nucleolar* ARN) et snARN (*small nuclear* ARN) ne

doivent pas être utilisés comme contrôles pour plusieurs raisons : ils ont un plus grand nombre de nucléotides, leurs propriétés physico-chimiques et leurs fonctions différent de celles des microARN et enfin, les niveaux d'expression de ces acides nucléiques sont décrits comme étant perturbés dans de nombreux cancers.

L'utilisation d'un contrôle exogène contribue à diminuer les écarts dus au processus d'analyse pour fournir des résultats plus fiables. Cependant, l'utilisation d'un tel contrôle ne corrige pas les écarts dus à la qualité des échantillons. Actuellement, ces molécules sont presque exclusivement utilisées pour le contrôle de la qualité et du rendement de l'isolement d'ARN, de la synthèse d'ADNc et de l'amplification par PCR (113).

3.2. Contrôles endogènes

Parmi les microARN endogènes, miR-16, est l'un des plus utilisés. Kloten *et al.* (114) ont comparé 5 procédés d'extraction des microARN circulants et 2 protocoles d'extraction des microARN contenus dans des exosomes. L'efficacité des méthodes d'extraction a été évaluée par la mesure dans le plasma d'un contrôle exogène, cel-miR-39, et 6 microARN endogènes. Parmi ces derniers, le miR-16 s'est révélé être le plus performant. D'une part, il est abondamment représenté par rapport aux autres microARN testés, et d'autre part, son utilisation comme contrôle endogène pour la normalisation des valeurs du cycle seuil a entrainé une importante baisse de la variabilité entre les différentes méthodes d'extraction.

OBJECTIFS

Objectif principal

- Identifier un profil plasmatique de microARN, capable de discriminer les patientes atteintes du cancer du sein des femmes saines.

Objectifs secondaires

- Rechercher d’éventuelles associations entre l’expression des microARN et les caractéristiques cliniques des patientes.

- Comparer les performances diagnostiques des microARN à celles des marqueurs tumoraux sériques classiques.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Type et population d’étude

Dans cette étude prospective, des échantillons sanguins ont été prélevés sur 120 personnes, comprenant 60 patientes atteintes d'un cancer du sein en tant que groupe de cas et 60 femmes en bonne santé appariées sur l’âge en tant que groupe témoin (**Figure 16**). Les participantes sont recrutées depuis le mois de janvier 2020 jusqu’en juin 2021 au niveau du Service de Gynécologie Obstétrique de l’Etablissement Hospitalier Universitaire (EHU) d’Oran. Les patientes incluses dans le premier groupe sont des femmes atteintes du cancer du sein nouvellement diagnostiqué de stade I, II ou III programmées pour tumorectomie ou mastectomie. En plus de l’examen clinique et de la mammographie, le diagnostic est confirmé par examen anatomo-pathologique. Ne sont pas incluses les patientes ayant des métastases (stade IV), présentant un autre cancer que celui du sein, traitées par chimiothérapie ou radiothérapie avant l’obtention des échantillons sanguins, et les femmes enceintes ou allaitantes. Les échantillons sanguins des témoins ont été prélevés sur des femmes alignées sur l’âge, d’apparence clinique en bonne santé avec une mammographie normale, sans antécédents de maladies malignes et en l’absence d’épisode inflammatoire de moins de trois mois. Cette étude a été approuvée par le Conseil Scientifique de la Faculté de Médecine d’Oran (attestation d’inscription n°436 délivrée le 15/01/2020) et a été menée conformément aux principes éthiques de la déclaration d’Helsinki (115). En outre, le consentement écrit fut obtenu pour chacune des participantes.

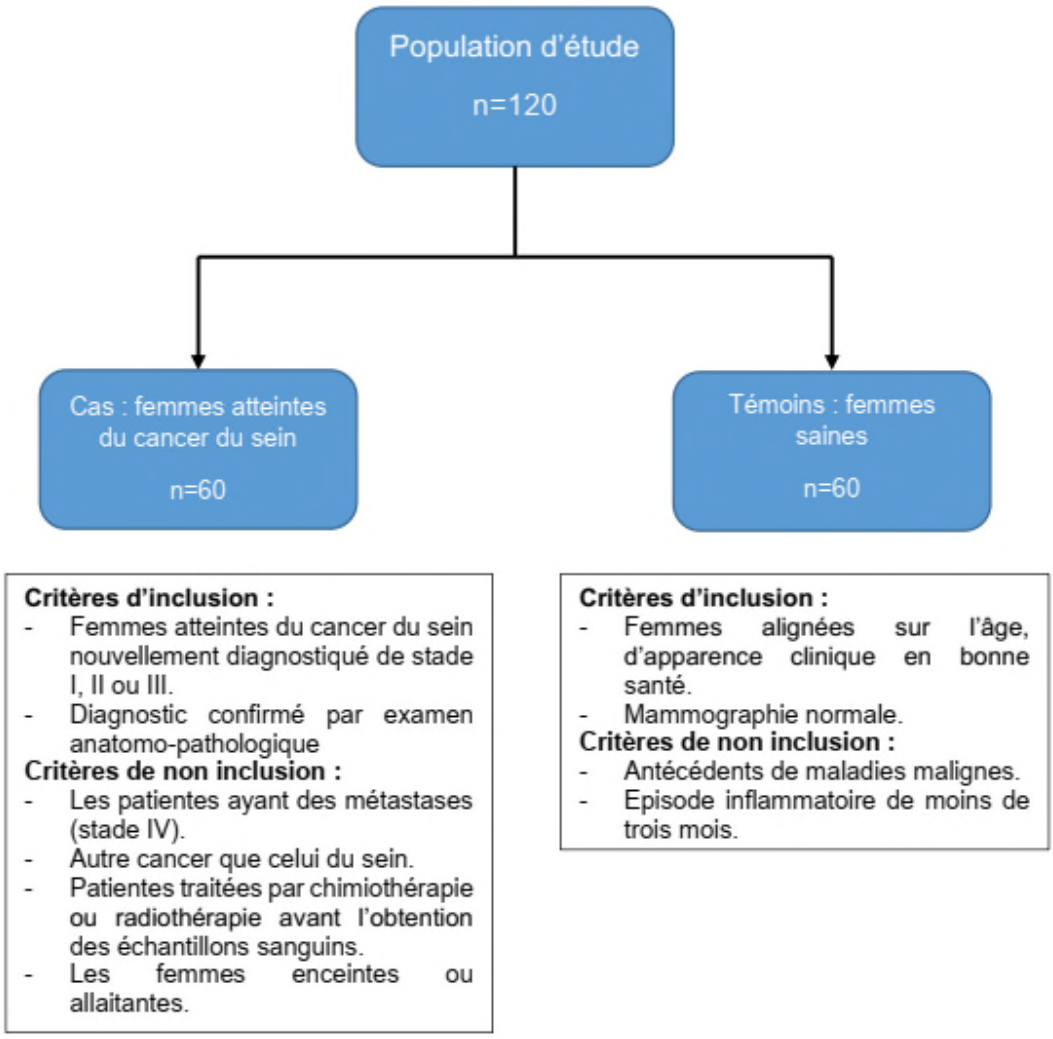


Figure 16. Organigramme de la population d'étude.

2. Recueil des données cliniques

Les caractéristiques démographiques et les données cliniques ont été renseignées sur des fiches (**Annexe 1**). La 8ème édition du système de classification tumeur-ganglion-métastase (TNM) de *l'American Joint Committee on Cancer* (AJCC) est adoptée pour la classification clinique des patientes au moment de l'intervention (116) et le grade histo-pronostic est évalué par la modification d'Elston et Ellis de la classification de Scarff-Bloom-Richardson (117).

3. Prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins sont réalisés avec des aiguilles de 22 gauges et les deux premiers mL de sang prélevés sont éliminés dans le but d'éviter une contamination par les cellules épithéliales lors de la ponction cutanée initiale. Le sang est ensuite collecté sous vide sur deux types de tubes en verre de 4 mL, le premier est un tube sec avec gel séparateur Vacumed® (FL Medical®, Torreglia, Italie, référence 42612), tandis que le second tube contient de l'acide éthylène diamine tétraacétatique tripotassique (EDTA, K3) comme anticoagulant (AFCO®, Amman, Jordanie, référence AF10019BB). L'ordre de remplissage du sang débute par le tube sec suivi de l'EDTA afin d'éviter une éventuelle contamination par l'anticoagulant. Le tube EDTA sert à quantifier les microARN plasmatiques, tandis que le tube sec est destiné au dosage des marqueurs tumoraux CA 15-3 et ACE.

4. Centrifugation et conservation des échantillons

Les échantillons sont acheminés dans l'heure qui suit le prélèvement au Service de Biochimie de l'EHU d'Oran. Les tubes primaires EDTA sont centrifugés (**Figure 17**) à 1 900 g (3 500 rpm) pendant 10 minutes à température ambiante dans une centrifugeuse Centrifuge 5702 R® (Eppendorf®, Hambourg, Allemagne) (**Figure 18**). Ensuite, 1 500 µL sont pipetés à partir du surnageant et sont transférés dans un microtube (Deltalab®, Barcelone, Espagne, référence 200400PK) en prenant soin de ne pas perturber la couche intermédiaire riche en leucocytes et en plaquettes qui peuvent représenter une importante source de contamination par des microARN/ARN cellulaires (95). Afin de s'assurer de l'élimination des débris cellulaires, une seconde centrifugation est réalisée à 12 000 g (11 500 rpm) pendant 15 min à température ambiante dans une microcentrifugeuse Digicen 20® (Orto Alresa®, Madrid, Espagne) (**Figure 19**). Le surnageant est transféré sans déranger le culot et aliquoter en deux fois 500 µL dans deux nouveaux microtubes à fond conique. En ce qui concerne les tubes secs, on procède uniquement à une seule centrifugation à 1900 g pendant 10 minutes, également dans l'heure qui suit le prélèvement.

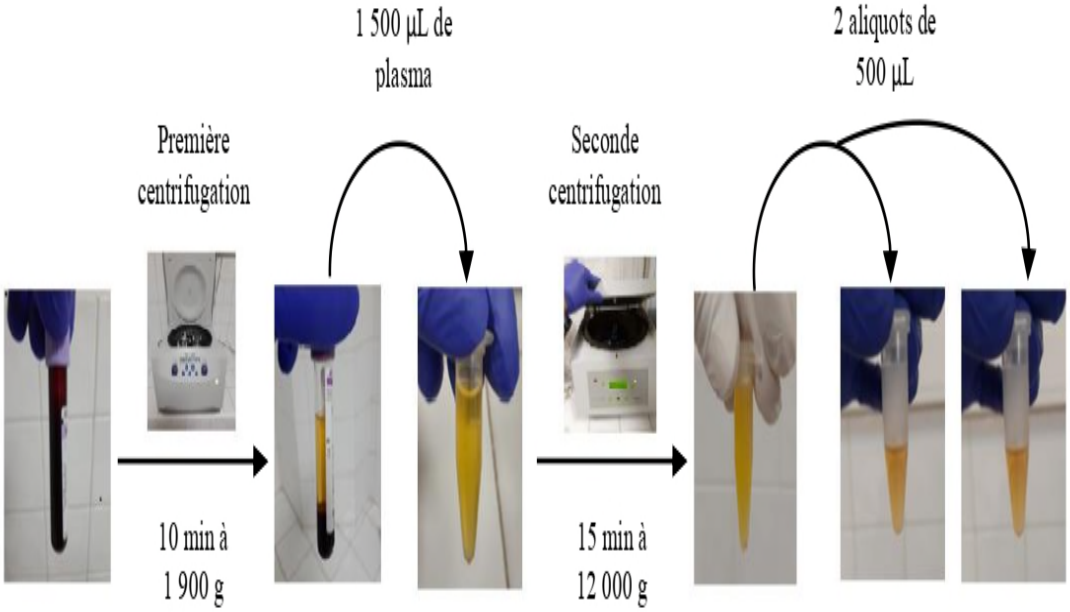


Figure 17. Double centrifugation des échantillons sanguins.



Figure 18. Centrifugation des tubes primaires.



Figure 19. Seconde centrifugation sur microcentrifugeuse.

Outre l'inspection visuelle des échantillons, on s'assure de l'absence d'hémolyse en mesurant l'absorbance de l'hémoglobine libre à 414 nm. Une valeur d'absorbance supérieure à 0.2 permet d'identifier les échantillons hémolysés (118). Ces derniers sont considérés comme étant non conformes et un second prélèvement sanguin est alors réalisé. Les sérums et plasmas obtenus sont conservés à -20°C. Il est clairement démontré que les microARN restent stables pendant plusieurs années à cette température (97,98). En effet, les différentes formes de transports des microARN les préservent de la dégradation par les ARNases, les rendant particulièrement stables par comparaison à d'autres acides nucléiques, comme les ARNm. Une preuve frappante de cette grande stabilité est la présence de microARN intacts dans des organes de momies cryoconservées de plus de 5 300 ans (84).

5. Extraction des microARN plasmatiques

L'analyse de l'expression des microARN a été réalisée au niveau du Service de Biologie Moléculaire et Cytogénétique et du Service de Microbiologie de l'EHU d'Oran. L'ARN total a été isolé de manière à préserver les microARN, à partir de 200 µL des échantillons plasmatiques, à l'aide du kit spécialisé mirVana®

miRNA Isolation Kit (Invitrogen®, Vilnius, Lituanie, référence AM1561) (**Figure 20**) en suivant les instructions du fabricant (**Annexe 2**).

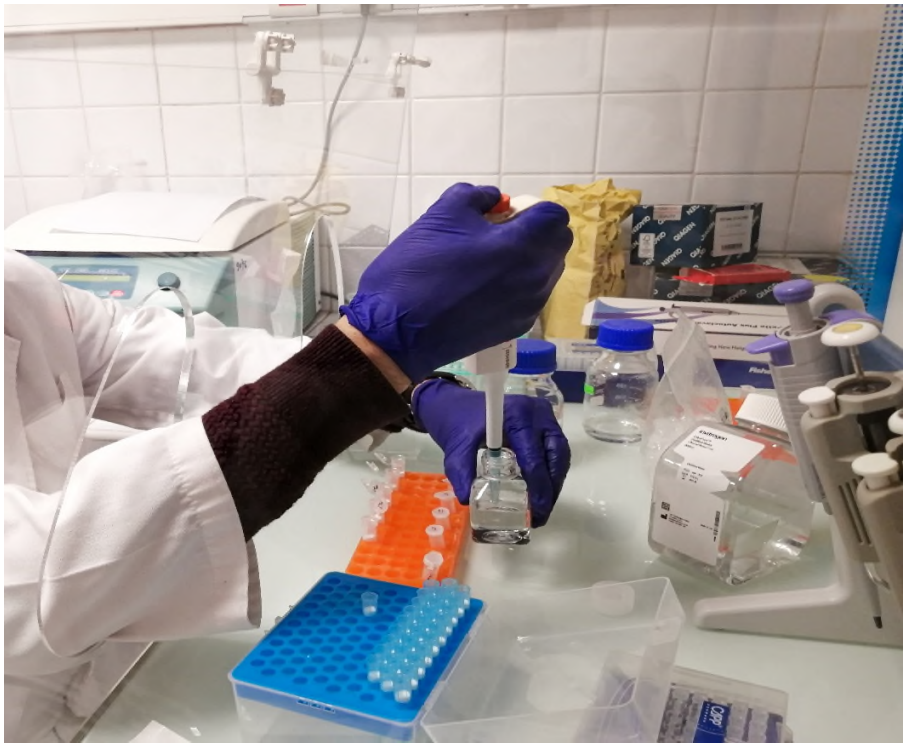


Figure 20. Extraction des ARN sous une hotte de laboratoire.

Le kit d'extraction des microARN mirVana® est basé sur une extraction organique suivie d'une purification par adsorption sur une colonne dans des conditions de liaison et de lavage spécialisées (**Figure 21**). L'échantillon est d'abord lysé dans une solution de lyse dénaturante qui stabilise l'ARN et inactive les RNases. Le lysat est alors extrait une première fois à l'aide du mélange phénol-chloroforme qui élimine la plupart des molécules d'ADN. Ensuite, une seconde étape d'extraction est réalisée sur un filtre en fibre de verre dans lequel les petits ARN s'immobilisent. Cet ARN est lavé plusieurs fois et élué dans une solution de faible force ionique. La procédure de filtration utilise des solutions formulées spécifiquement pour la rétention des microARN afin d'éviter la perte de ces petits ARN, contrairement à ce qui est généralement observé avec les méthodes classiques de filtre en fibre de verre.

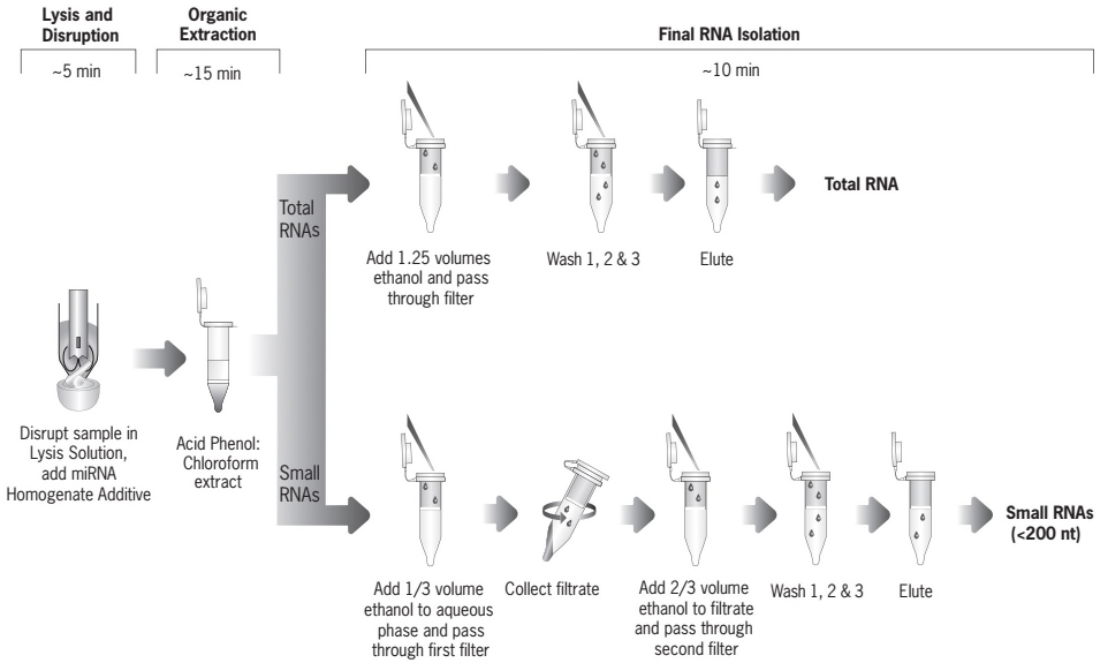


Figure 21. Vue d'ensemble sur la procédure d'extraction des microARN par le kit mirVana® (https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/AM1561).

Nous avons suivi un protocole « *RNase free* » tout au long de la procédure analytique. Une hotte à flux d'air laminaire dédiée au travail sur l'ARN a été utilisée pour l'isolement des microARN. La surface de travail et les pipettes ont été soigneusement nettoyées avec une solution de décontamination aux RNases RNase*Zap*® (ThermoFisher Scientific®, Waltham, Massachusetts, États-Unis d'Amériques, référence AM9780). Des gants ont été portés et changés régulièrement tout au long de la manipulation. Des pointes de pipettes à barrières certifiées sans RNase ont également été utilisées.

L'évaluation de la pureté et de la concentration des ARN a été réalisée par la mesure de l'absorbance en UV selon les instructions du fournisseur, sur un spectrophotomètre Cary 60 Agilent spectrophotometer® (Agilent Technologies®, Milan, Italie) (**Figure 22**). Chaque échantillon est dilué à 1:50 dans de l'eau exempte de RNase pour amener la concentration dans la plage linéaire du spectrophotomètre. Les absorbances sont lues à 260 nm et 280 nm contre un

blanc composé d'eau pour quantifier et évaluer la pureté de l'ARN en calculant le rapport A260/A280.



Figure 22. Spectrophotomètre utilisé pour l'évaluation de la pureté de l'ARN obtenu après extraction.

6. Détermination de l'expression des microARN

Le nombre de microARN présents dans le plasma étant très important, nous ne pouvons les quantifier tous par qRT-PCR. Nous avons choisi de déterminer l'expression des microARN suivants : miR-21-3p, miR-96-5p et miR-155-5p, comme biomarqueurs candidats pour ce dosage plasmatique. Ce choix a été orienté par le fait que ces microARN sont fréquemment associés dans la littérature au cancer du sein (119–123). Nous avons également analysé l'expression plasmatique de miR-16-5p pour servir de référence endogène. Le kit TaqMan® microRNA Assay (Applied Biosystems®, Pleasonton, Californie, États-Unis d'Amérique, référence : 4427975) a été utilisé pour déterminer l'expression de ces microARN : hsa-miR-16-5p (Assay ID : 000391), hsa-miR-21-3p (Assay ID : 002438), hsa-miR-96-5p (Assay ID : 000434), hsa-miR-155-5p (Assay ID : 000479).

Les réactions de transcription inverse (**Annexe 3**) des microARN en ADNc, ont été initiées à partir de 10 ng d'ARN en utilisant le kit TaqMan® MicroRNA

Reverse Transcription (Applied Biosystems®, Vilnius, Lituanie, référence 4366596) et des amorces spécifiques de type « tige-boucle ». La réaction de transcription inverse de 7 µL contenait 0,15 µL de dNTP 100 mM, 1 µL de transcriptase inverse MultiScribe (50 U/µL), 1.50 µL de tampon de transcription inverse 10x, 0,19 µL d'inhibiteur de RNase (20 U/µL), 3 µL d'une amorce TaqMan RT 5x, 4.16 µL d'eau exempte de nucléase et 5 µL d'ARN. La réaction de transcription inverse (**Figure 23**) a été effectuée à 16°C pendant 30 minutes, 42°C pendant 30 minutes et 85°C pendant 5 minutes sur un thermocycleur C1000 Touch Thermal Cycler® (Bio-Rad®, Hercules, Californie, États-Unis d'Amérique). Les échantillons d'ADNc sont ensuite analysés dans la demi-heure qui suit.



Figure 23. Transcription inverse sur thermocycleur C1000 Touch Thermal Cycler® (Bio-Rad®).

L'amorce universelle est un oligonucléotide qui forme une structure « tige-boucle » contenant une séquence d'amorce inverse universelle sur la boucle et plusieurs bases spécifiques (généralement six) à l'extrémité 3' qui sont complémentaires à l'extrémité 3' du microARN mature spécifique (**Figure 24**).

Après la réaction de transcription inverse, l'ADNc du microARN peut être amplifié quantitativement avec des amorces sens spécifiques et inverses universelles. Cette méthode a l'avantage d'être capable de discriminer les microARN matures de l'ADN génomique, du pri-miARN et du pré-miARN.

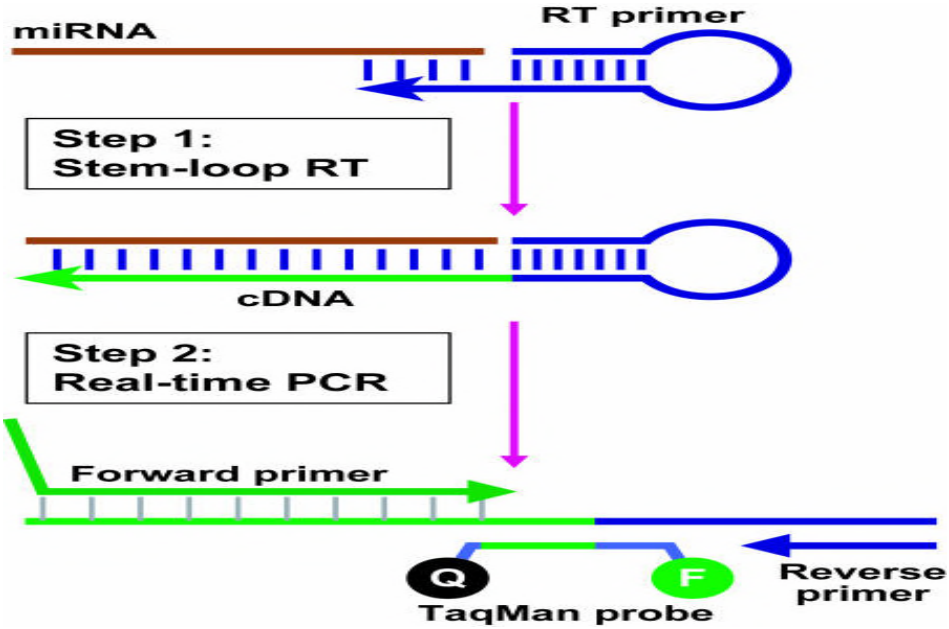


Figure 24. Principe de la détermination de l'expression des microARN par la méthode Taqman® MicroRNA Assay (Thermo Fisher®) (124).

La RT-qPCR (**Annexe 4**) a été réalisée au moyen du système en temps réel (**Figure 25**) Rotor-Gene Q® (Qiagen®, Hilden, Allemagne). Chaque tube se composait de 10.00 µL de TaqMan® Universal Master Mix II avec Uracil N-glycosylase (UNG) (Applied Biosystems®, Vilnius, Lituanie, référence 4440038), 7.67 µL d'eau sans RNase, 0.5 µL de sonde microARN 20x correspondante et 1.33 µL d'ADNc. Les réactions ont été réalisées en triplicate pour chaque sonde de microARN. Les réactions ont été réalisées en triple selon les conditions suivantes : incubation à 50°C pendant 2 minutes et à 95°C pendant 10 minutes, suivie de 40 cycles à 95°C pendant 15 secondes et 60°C pendant 60 secondes.



Figure 25. Amplification des microARN par qRT-PCR.

Au cours de la PCR, les amorces directe et inverse s'hybrident à des séquences complémentaires le long des brins de matrice d'ADNc dénaturé. La sonde TaqMan® s'hybride spécifiquement à une séquence complémentaire entre les sites d'amorce directe et inverse. La sonde possède un colorant rapporteur à l'extrémité 5' et un « *quencher* » en 3'. Lorsque la sonde est intacte, la proximité du colorant rapporteur et du « *quencher* » supprime la fluorescence du rapporteur, principalement par transfert d'énergie de type Förster. Au cours de la polymérisation, l'ADN polymérase ne clive que les sondes qui s'hybrident à la séquence cible. Le clivage sépare le colorant rapporteur de la sonde. La séparation du colorant rapporteur du « *quencher* » entraîne une fluorescence accrue du colorant rapporteur. Cette augmentation de fluorescence ne se produit que si la sonde est complémentaire à la séquence cible et si la séquence cible est amplifiée lors de la PCR. En raison de ces conditions, cette méthode présente une grande spécificité pour le microARN recherché.

L'évaluation des données obtenues à partir de l'expression des microARN a été effectuée en utilisant la méthode du seuil de cycle (Ct). Ce dernier est défini

comme le nombre de cycles nécessaires pour que le signal fluorescent franchisse lors de la qRT-PCR un seuil supérieur au bruit de fond (**Figure 26**). Le niveau d'expression de chaque microARN cible a été rapporté en tant que valeur de ΔCt et les niveaux d'expression relatifs des microARN d'intérêt ont été calculés à l'aide de la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$, avec ΔCt = la valeur Ct du microARN d'intérêt moins la valeur Ct de miR16, et ΔΔCt = la valeur Ct des patientes atteintes d'un cancer du sein moins la valeur Ct des volontaires sains. Les niveaux d'expression de miR-16 ont été utilisés pour normaliser l'expression des microARN d'intérêts en raison de sa grande stabilité d'expression chez les individus normaux et les patientes atteintes du cancer du sein (125–127).

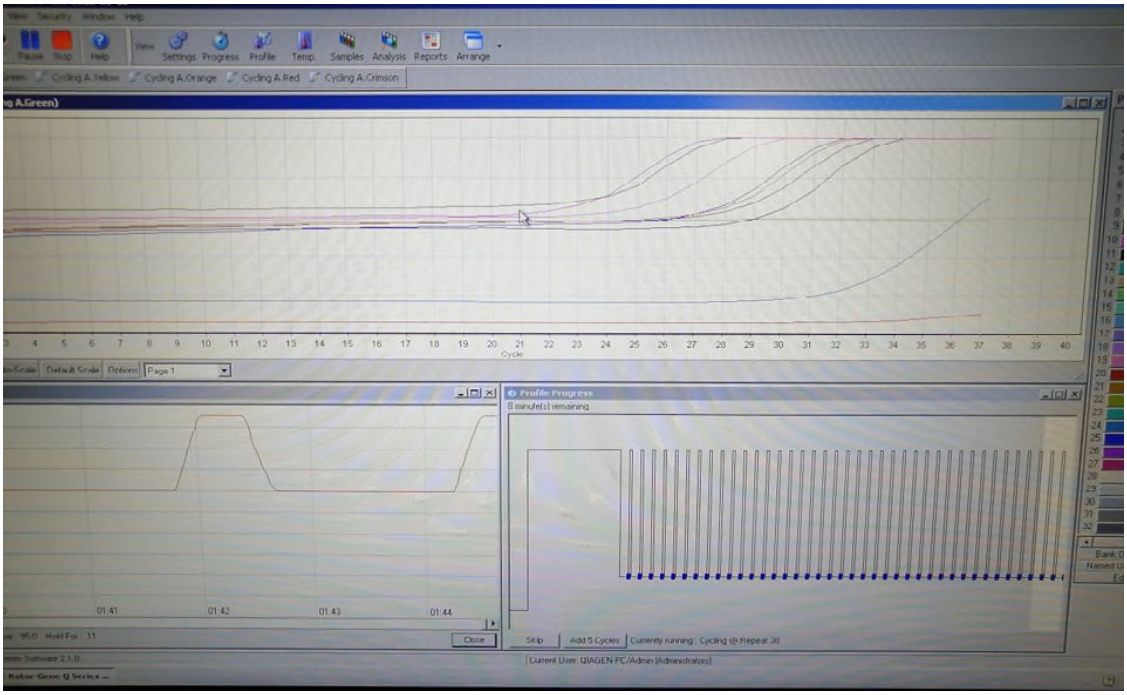


Figure 26. Courbes d'amplification par PCR.

7. Dosage des marqueurs tumoraux CA 15-3 et ACE

Le dosage des marqueurs tumoraux CA 15-3 et ACE (**Figure 27**) est réalisé sur l'automate d'immunoanalyse Immulite 2000 XPi® (Siemens Healthcare Diagnostics®, Frimley, Surrey, Royaume-Uni) en utilisant les kits du fournisseur : CA 15-3 (Siemens Healthcare Diagnostics Products®, Glyn Rhonwy, Llanberis, Gwynedd, Royaume-Uni, référence : L2KBR2) et ACE

(Siemens Healthcare Diagnostics Products®, Glyn Rhonwy, Llanberis, Gwynedd, Royaume-Uni, référence : L2KCE2).



Figure 27. Dosage des marqueurs tumoraux sériques CA 15-3 et ACE sur l'automate Immulite 2000 XPi®.

Le dosage est immunométrique chimiluminescent de type séquentiel. La phase solide (billes) est revêtue du premier anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'épitope cible. L'échantillon sérique est incubé avec les billes, ce qui entraîne une réaction antigène-anticorps. Après une étape de lavage pour éliminer le sérum non lié, un anticorps polyclonal (secondaire) de chèvre conjugué à la phosphatase alcaline (intestin de veau bovin) est ajouté pour se fixer à l'antigène lié aux billes et conduit à la formation d'un complexe d'anticorps de type sandwich. Après une autre étape de lavage pour éliminer le conjugué enzymatique non lié, la révélation s'effectue par ajout d'un substrat devenant luminescent sous l'action de la phosphatase alcaline. Le signal mesuré est directement proportionnel à la concentration en marqueur tumoral. Les

caractéristiques analytiques des dosages sont résumées dans le **Tableau IX**. Des sérums de contrôle interne de la qualité à trois niveaux de concentrations (Lyphocheck® Tumor Marker Plus Control, Bio-Rad, États-Unis d'Amérique, référence : 368X) ont été utilisés pour s'assurer de la fiabilité des résultats.

Tableau IX. Principales caractéristiques des trousses utilisées pour le dosage du CA 15-3 et de l'ACE.

Marqueur tumoral	Volume d'échantillon	Domaine de mesure	Effet-crochet	Temps d'analyse	Valeur seuil du laboratoire
CA 15-3	5 µL	1 à 300 UI/mL	Aucun jusqu'à 80 000 UI/mL	65 min	39 UI/mL
ACE	15 µL	0.15 à 550 ng/mL	Aucun jusqu'à 250 000 ng/mL	65 min	4.0 ng/mL

8. Analyse statistique

La taille de l'échantillon a été déterminée en utilisant le logiciel G*Power®, version 3.1.9.7 (Université Heinrich Heine, Düsseldorf, Allemagne). La puissance statistique (1-β) a été fixée à 0.95 et l'erreur alpha à 0.05. La taille de l'effet a été fixée à 0.7129213 en se basant sur une étude précédente (128). L'analyse du logiciel G*power montre qu'au moins 56 participantes, réparties en deux groupes de 28 personnes, sont nécessaires pour constituer une taille d'échantillon acceptable. Afin d'obtenir des résultats ayant une meilleure signification statistique, nous avons décidé d'inclure un nombre plus important de sujets, soit 60 personnes par groupe (120 au total).

L'analyse statistique a été réalisée sur le logiciel IBM SPSS Statistics for Windows®, version 20.0 (IBM Corp., Armonk, New York, États-Unis d'Amérique). Le test de Shapiro-Wilk a été utilisé pour évaluer la normalité de la distribution des paramètres. Les variables qualitatives sont exprimées sous forme de

fréquences et de pourcentages. Les variables quantitatives normalement distribuées sont présentées sous forme de moyenne ± écart-type, tandis que les données qui n'ont pas une distribution gaussienne sont présentées sous forme de médiane (valeur minimale – valeur maximale).

La comparaison des caractéristiques démographiques entre les malades et les témoins a été réalisée par le test (t) bilatéral de Student pour échantillons appariés dans le cas des variables quantitatives et le test de Chi-deux pour les variables catégorielles. Les différences d'expression des microARN entre les patientes atteintes du cancer du sein et les témoins ont été évaluées par le test des rangs signés de Wilcoxon. L'association entre les microARN et les caractéristiques clinicopathologiques a été déterminé par le test U de Mann-Whitney lorsqu'il s'agit de la comparaison de deux groupes et par le test de Kruskal-Wallis pour les paramètres cliniques catégoriels avec plus de deux niveaux (par exemple, le grade). La valeur $p < 0.05$ est considérée comme statistiquement significative.

La capacité des marqueurs à prédire la présence du cancer du sein a été analysée par courbe ROC (*receiver operating characteristics*). La valeur seuil optimale a été identifiée pour chaque test, par analyse de l'indice de Youden sur la courbe ROC (129). L'effet des microARN sur les gènes et les réseaux d'interaction ont été évalué à l'aide du logiciel miRTargetLink 2.0 (130).

9. Liste de l'équipement et des réactifs utilisés

L'équipement et les réactifs utilisés pour la réalisation de cette étude sont répertoriés dans les tableaux qui se trouvent ci-dessous (**Tableau X** et **Tableau XI**) :

Tableau X. Liste de l'équipement utilisé.

Équipement	**Utilisation**	**Fournisseur**
Centrifuge 5702 R®	Centrifugation des tubes primaires	Eppendorf® (Allemagne)
Digicen 20®	Centrifugation des microtubes	Orto Alresa® (Espagne)
Immulite 2000 XPi®	Automate d'immunoanalyse utilisé pour le dosage des marqueurs tumoraux CA 15-3 et ACE	Siemens Healthcare Diagnostics® (Royaume-Uni)
Spectrophotomètre UV-visible Cary 60®	Évaluation de la pureté en ARN	Agilent Technologies® (Italie)
Thermocycleur C1000 Touch Thermal Cycler®	Réaction de transcription inverse	Bio-Rad® (États-Unis d'Amérique)
Rotor-Gene Q®	Amplification et détection des microARN	Qiagen® (Allemagne)

Tableau XI. Liste des réactifs et consommables.

Réactifs ou consommables	**Utilisation**	**Fournisseur**
Tubes secs avec gel séparateur	Recueil des échantillons pour le dosage des marqueurs tumoraux	Vacumed®, FL Medical® (Italie)
Tubes EDTA	Recueil des échantillons pour le dosage des microARN	AFCO® (Jordanie)
Microtubes	Recueil des sérums et plasmas	Deltalab® (Espagne)
RNase*Zap*®	Solution de décontamination aux RNases	Thermo Fisher Scientific® (États-Unis d'Amérique).
Mélange phénol-chloroforme-alcool iso-amylique (125:24:1) à pH 4.5	Contribue à éliminer l'ADN et les protéines lors de l'extraction	Invitrogen® (Lituanie)
mirVana® miRNA Isolation Kit	Kit d'extraction des microARN	Invitrogen® (Lituanie)
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription	Transcription inverse des microARN en ADNc	Applied Biosystems® (Lituanie)
TaqMan® Universal Master Mix II avec Uracil N-glycosylase (UNG)	Composants nécessaires à la réalisation de la qRT-PCR	Applied Biosystems® (Lituanie)

Suite du **Tableau XI**

TaqMan® microRNA Assay Assay ID : - 000391 - 002438 - 000434 - 000479	Détermination de l'expression des microARN suivants : hsa-miR-16-5p, hsa-miR-21-3p, hsa-miR-96-5p et hsa-miR-155-5p	Applied Biosystems® (États-Unis d'Amérique)
Kit de dosage du CA 15-3	Réactif pour le dosage du CA 15-3	Siemens Healthcare Diagnostics Products® (Royaume-Uni)
Kit de dosage de l'ACE	Réactif pour le dosage de l'ACE	Siemens Healthcare Diagnostics Products® (Royaume-Uni)
Lyphocheck Tumor Marker Plus Control®	Sérums de contrôle qualité interne pour marqueurs tumoraux, à trois niveaux	BioRad® (Etats-Unis d'Amérique)

RÉSULTATS

1. Caractéristiques démographiques des deux groupes

1.1. Age

L'âge moyen des cas est de 51 ans avec des extrêmes allant de 28 à 75 ans et l'âge moyen du groupe témoin est de 49 ans avec des extrêmes allant de 27 à 73 ans (**Figure 28**). Les deux groupes étant appariés dès l'inclusion, il n'existe pas de différence statistiquement significative sur l'âge (p=0.440).

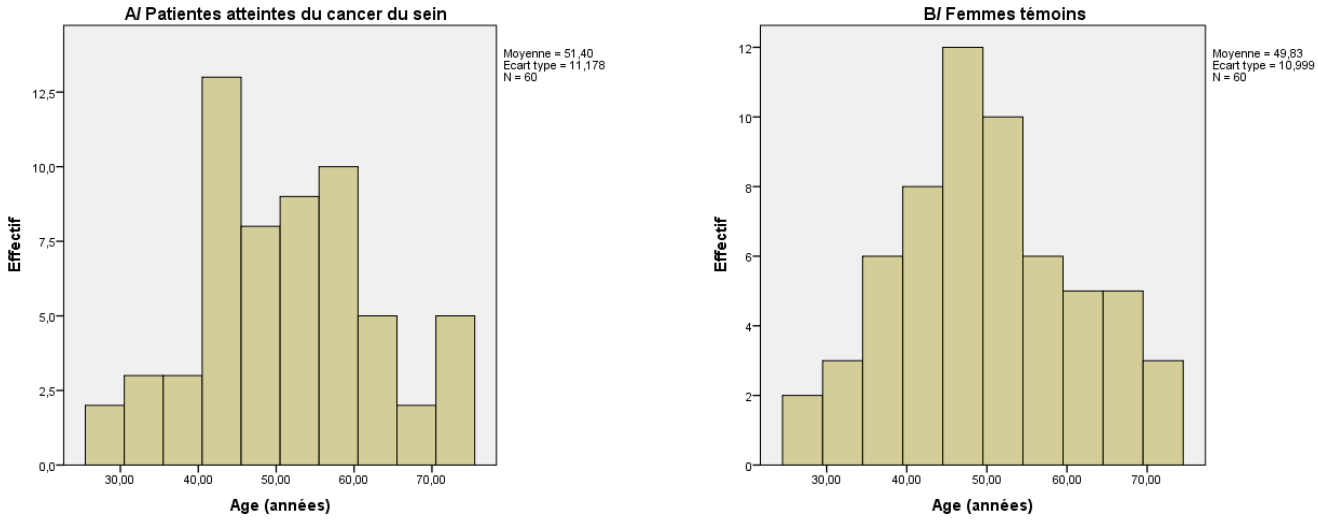


Figure 28. Histogrammes de la répartition en fonction de l'âge. A gauche, les femmes atteintes du cancer du sein et à droite, les femmes contrôles.

1.2. Indice de masse corporelle

L'étude de la répartition des sujets en fonction de l'indice de masse corporelle (IMC), montre que la majorité des femmes incluses sont en surpoids à la fois dans le groupe des malades et dans le groupe des contrôles (**Tableau XII**). Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les deux groupes sur ce point (p=0.641).

Tableau XII. Répartition des deux groupes selon les tranches d'IMC.

IMC (kg/m²)	État nutritionnel	Malades (n=60)	Saines (n=60)
<18.5	Maigreur	0	1
18.5 – 24.9	Normal	13	15
25 – 29.9	Surpoids	34	26
30 – 34.9	Obésité modérée	6	13
≥ 35	Obésité sévère	7	5

1.3. Statut ménopausique

La majorité des femmes incluses dans notre étude est en post ménopause avec 60% et 65% (**Figure 29**) dans le groupe des malades et dans le groupe contrôle respectivement.

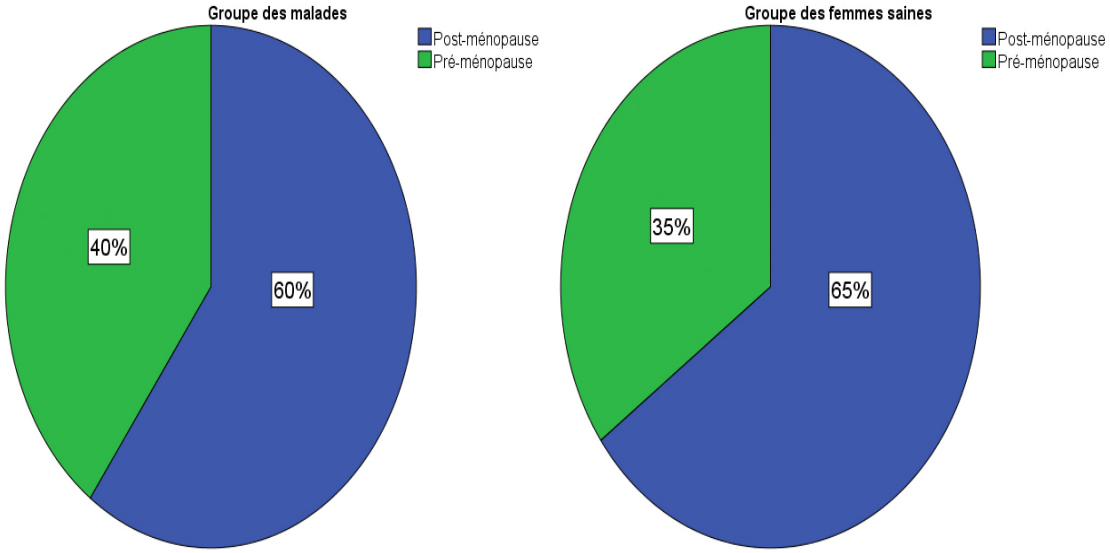


Figure 29. Représentation en secteurs de la répartition en fonction du statut ménopausique. À gauche, les femmes atteintes du cancer du sein et à droite, les femmes contrôles.

1.4. Parité

Les femmes incluses dans l'étude sont essentiellement multipares avec des pourcentages de 63.3 % et 70.0% chez les malades et les témoins respectivement (**Tableau XIII**).

Tableau XIII. Classification des malades et des témoins selon la parité.

Parité	Malades (n=60)	Témoins (n=60)
Nullipare (0)	11 (18.3%)	8 (13.3%)
Primipare (1)	4 (6.7%)	6 (10.0%)
Multipare (3 à 5)	38 (63.3%)	42 (70.0%)
Grande multipare (>5)	7 (11.7%)	4 (6.7%)

1.5. Antécédents familiaux de cancer du sein

36.7 % des malades ont des proches atteints du cancer du sein, contre 13.3% chez les femmes contrôles (**Figure 30**).

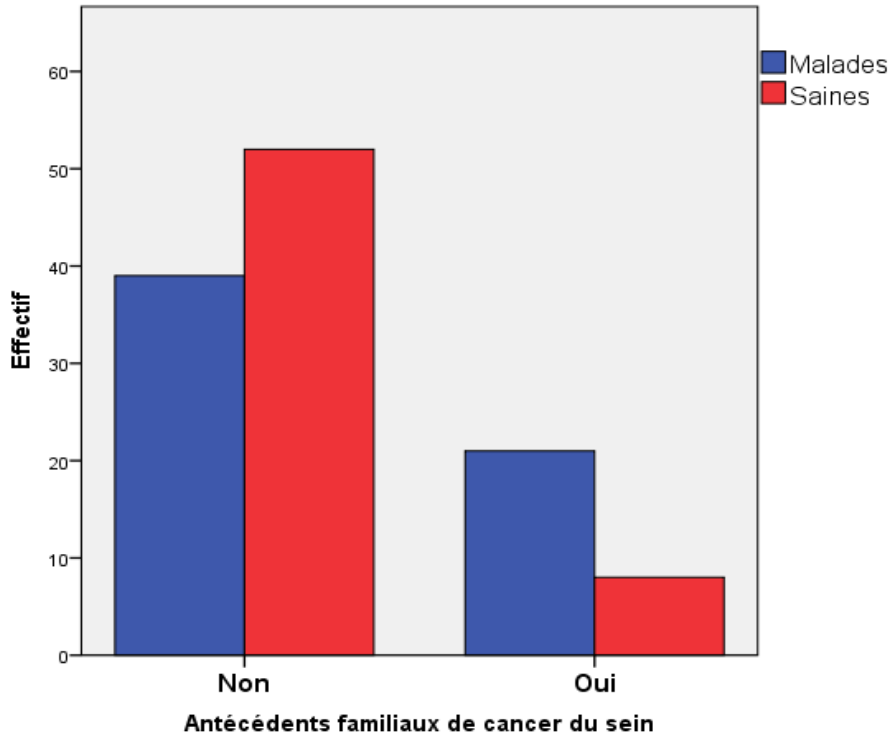


Figure 30. Répartition des deux groupes selon la présence ou l'absence d'antécédents familiaux de cancer du sein.

1.6. Récapitulatif des caractéristiques démographiques

Aucune différence statistiquement significative n'a été retrouvée pour l'âge, l'IMC, la parité, le statut ménopausique et les antécédents familiaux de cancer du sein (**Tableau XIV**).

Tableau XIV. Comparaison des données démographiques et obstétriques des deux groupes.

Caractéristique	**Cancer du sein (n=60)**	**Contrôles (n=60)**	**p**
Age (années)	51 (28-75)	49 (27-73)	0.440
Taille (cm)	161.6 ± 7.8	163.7 ± 5.3	0.162
Poids (Kg)	72.7 ± 13.6	75.1 ± 16.1	0.474
IMC (Kg/m^2)	27.7 ± 4.3	27.9 ± 5.1	0.852
Parité	3 ± 2	3 ± 2	0.721
Statut ménopausique			
Pré-ménopause	24 (40%)	21 (35%)	0.439
Post-ménopause	36 (60%)	39 (65%)	
Antécédents familiaux de cancer du sein			
Oui	22 (36.7%)	8 (13.3%)	0.462
Non	38 (63.3%)	52 (86.7%)	

2. Caractéristiques cliniques des patientes

2.1. Localisation de la tumeur

Dans notre échantillon, 51.7 % des atteintes sont localisées au niveau du sein droit, suivies du sein gauche (43.3%) et seulement 5 % des atteintes sont bilatérales (**Figure 31**).

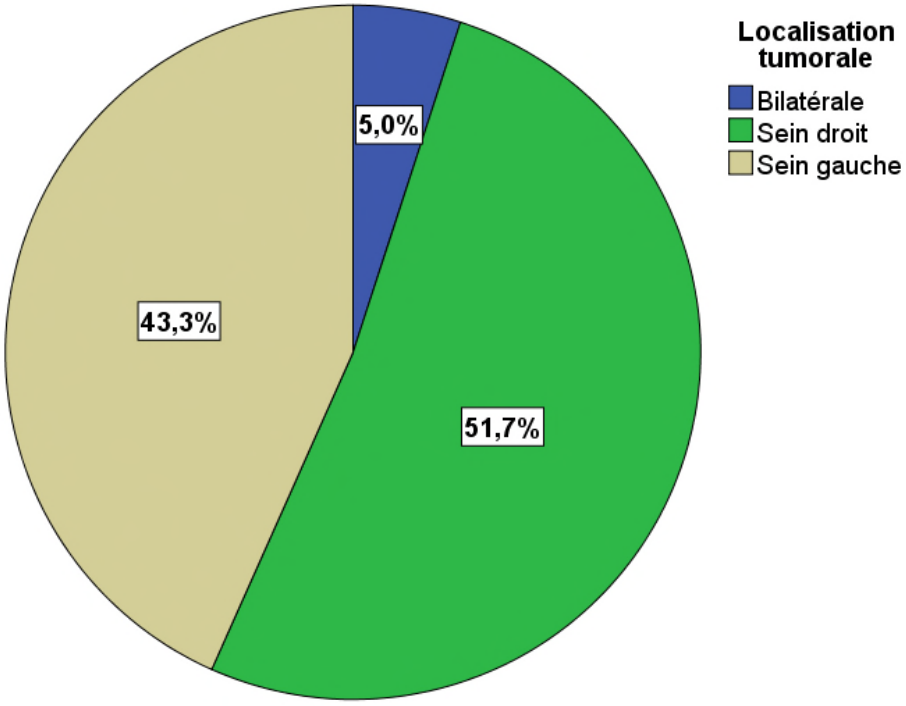


Figure 31. Répartition des patientes en fonction de la localisation de l'atteinte tumorale.

2.2. Type de carcinome

Le type histologique le plus fréquent dans notre série est le carcinome infiltrant non spécifique, dans 90.0 % des cas (**Figure 32**).

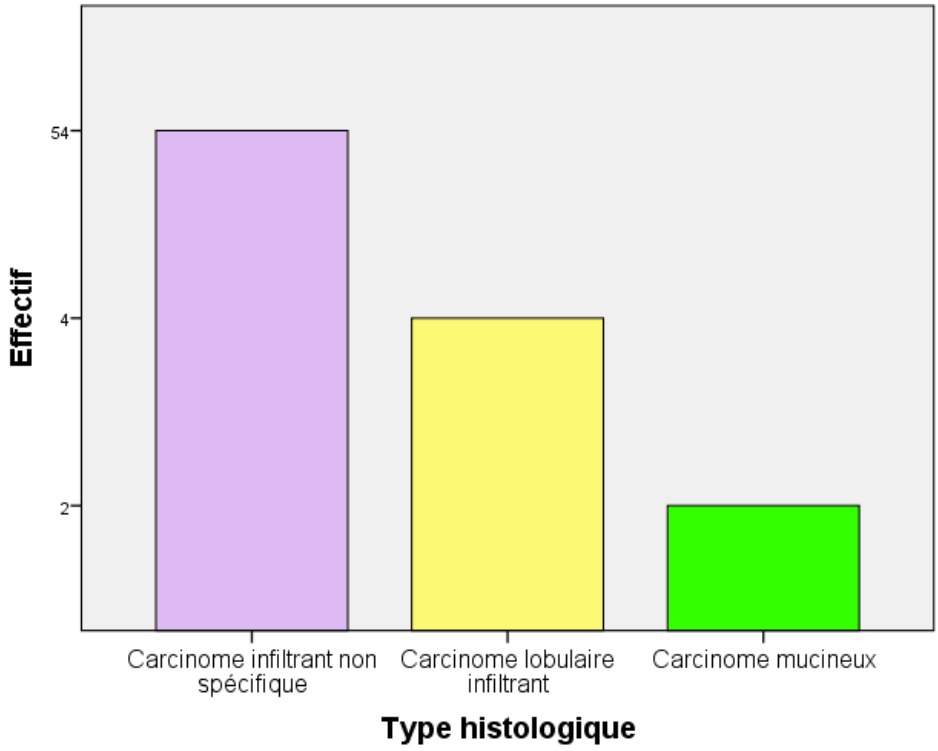


Figure 32. Types histologiques des carcinomes mammaires.

2.3. Taille de la tumeur

La taille tumorale est comprise entre 2 et 5 cm (T2) chez la majorité des patientes (**Figure 33**).

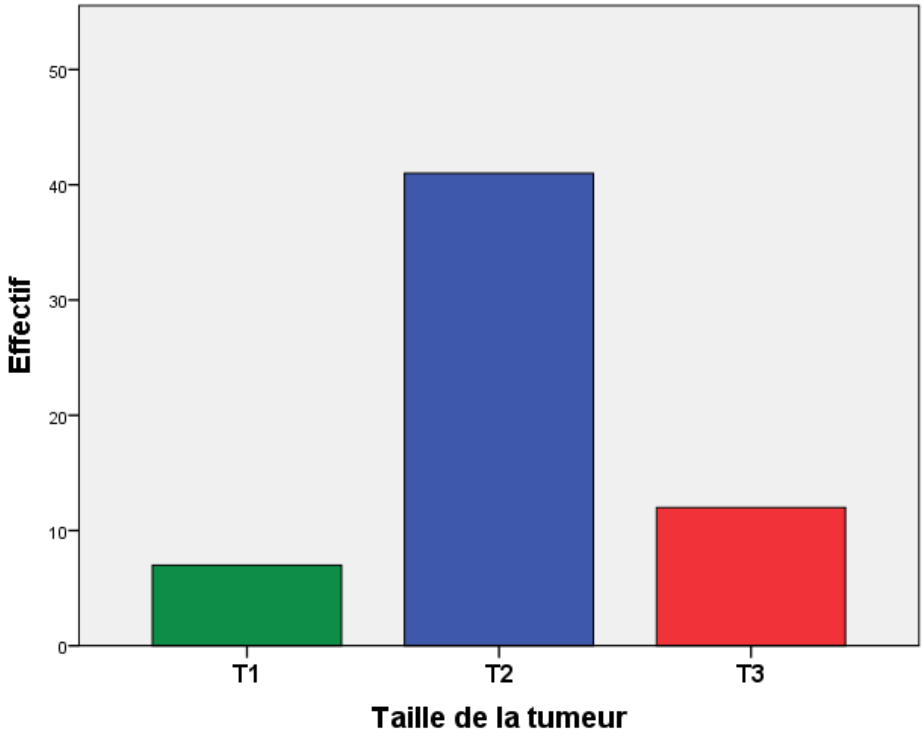


Figure 33. Distribution des patientes selon la taille de la tumeur.

2.4. Atteinte des ganglions lymphatiques

81.7% des patientes ont une atteinte des ganglions lymphatiques régionaux (**Figure 34**).

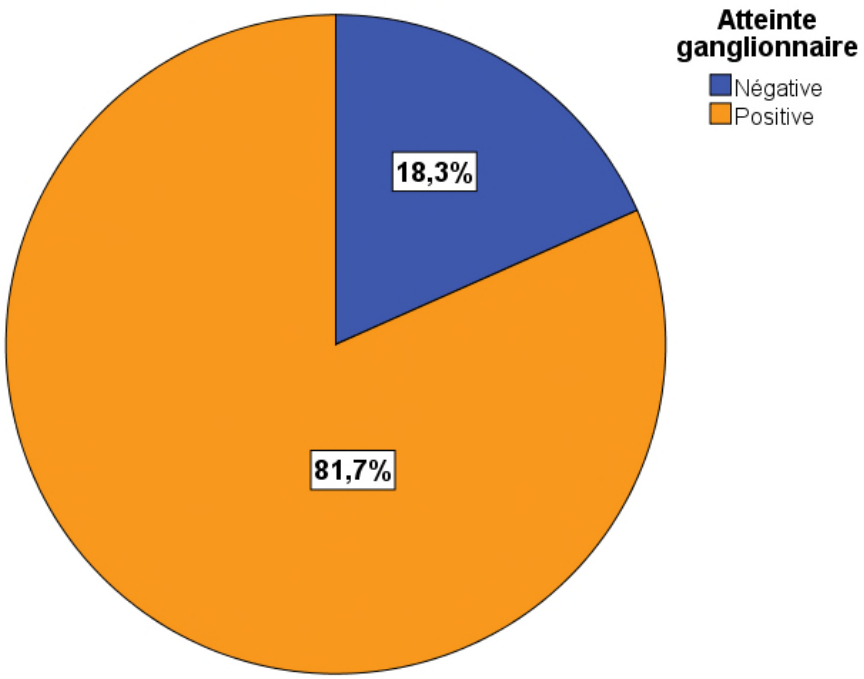


Figure 34. Répartition des patientes en fonction de la présence ou de l'absence d'une atteinte des ganglions lymphatiques.

2.4. Stade TNM

Le stade TNM le plus fréquent dans notre échantillon est le stade IIA (**Tableau XV**).

Tableau XV. Classification des patientes selon le stade TNM.

Stade	Fréquence	Pourcentage (%)
IA	5	8.3
IIA	27	45.0
IIB	16	26.7
IIIA	12	20.0

2.5. Grade histo-pronostic

Le grade histo-pronostic de Scarff Bloom et Richardson II est le plus représenté dans notre série (**Figure 35**).

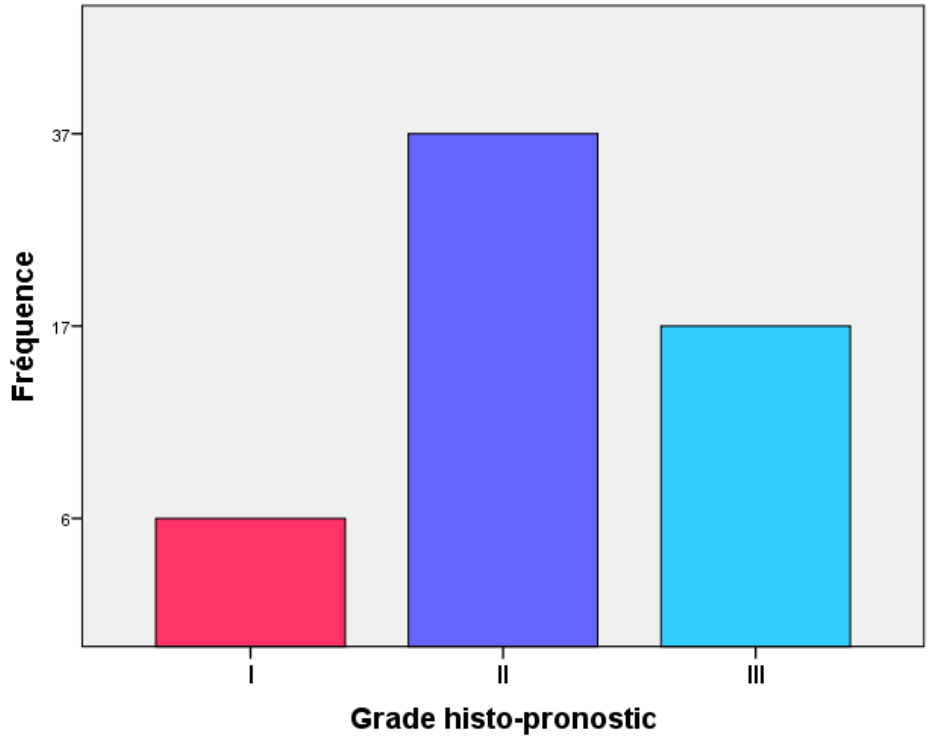


Figure 35. Distribution des patientes selon le grade histo-pronostic de Scarff Bloom et Richardson

2.6. Profil immunohistochimique

Le statut hormonal des patientes représenté dans la **Figure 36**.

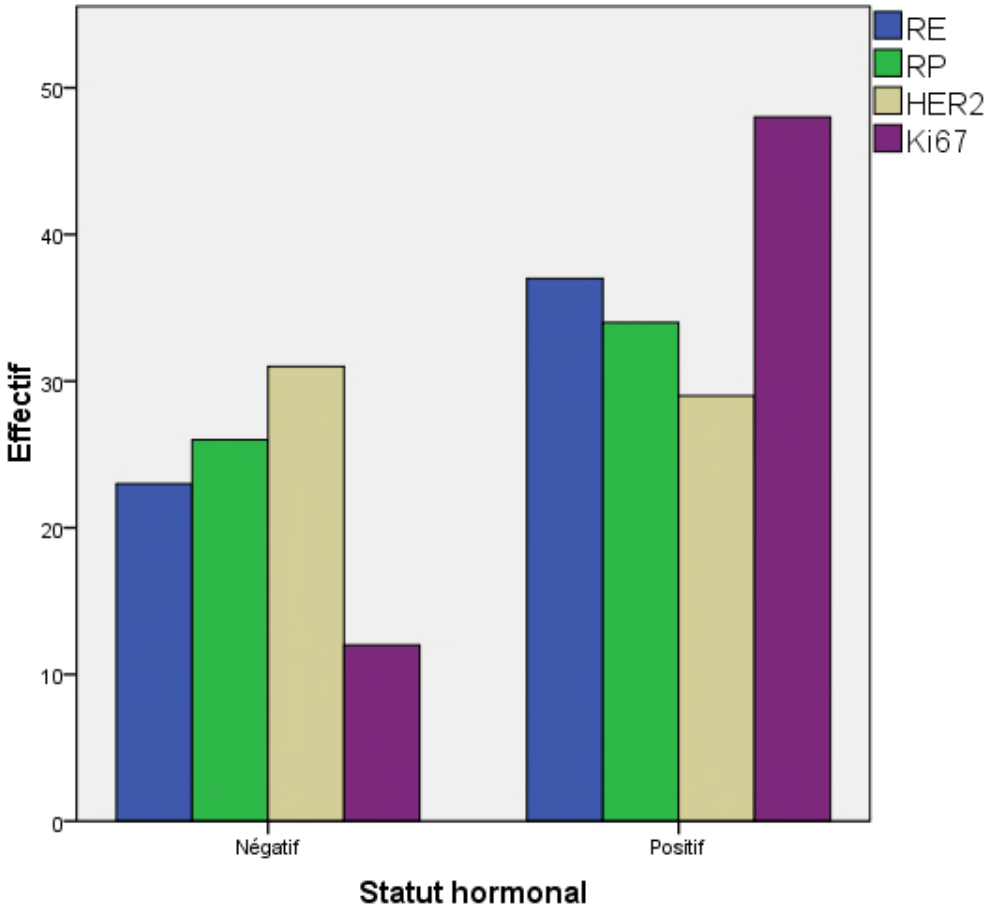


Figure 36. Profil immunohistochimique des patientes.

RE : récepteurs de l'œstrogène ; RP : récepteurs de la progestérone ; HER2 : *human epidermal growth factor receptor 2*.

2.7. Pathologies associées

58 % des patientes n'avaient pas d'autres pathologies que le cancer du sein au moment du diagnostic (**Figure 37**). Chez les autres patientes, on retrouve comme maladies associées, principalement l'hypertension artérielle (HTA), le diabète sucré de type 2 suivie de l'hypothyroïdie.

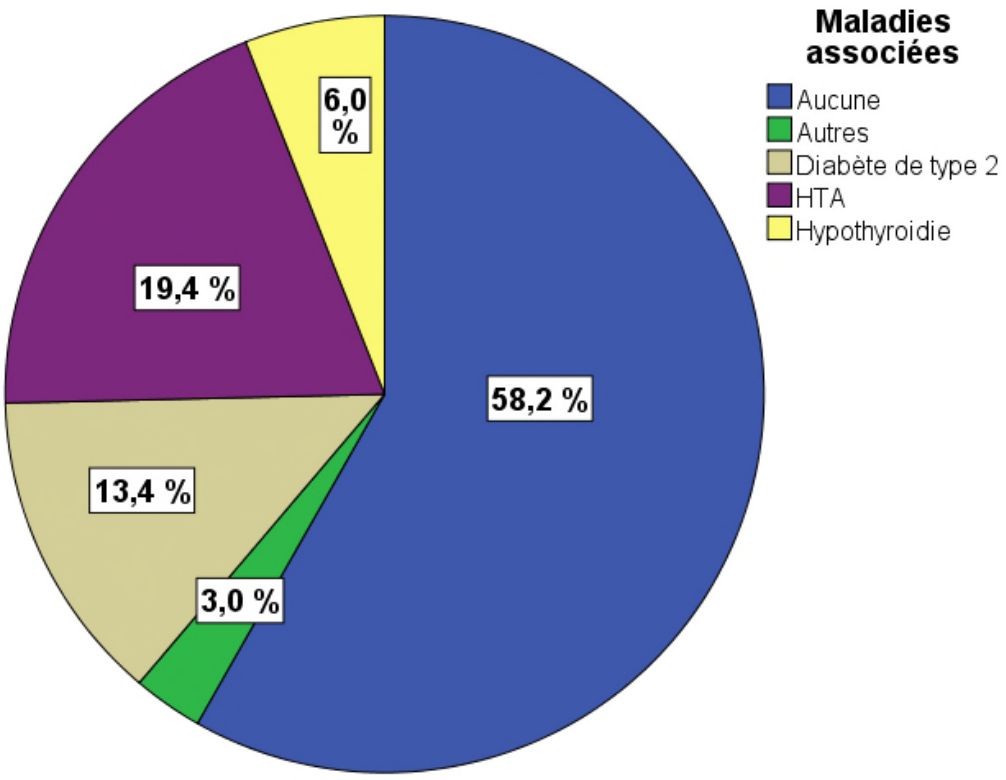


Figure 37. Pathologies présentes chez les patientes au moment du diagnostic du cancer du sein.

2.8. Résumé des données cliniques des patientes

Les principales caractéristiques cliniques des patientes sont résumées dans le **Tableau XVI**.

Tableau XVI. Caractéristiques clinico-pathologiques des patientes atteintes du cancer du sein (n=60).

Caractéristique	Fréquence	Pourcentage (%)
Localisation tumorale		
Sein droit	31	51.7
Sein gauche	26	43.3
Bilatéral	3	5.0
Taille de la tumeur		
T1	7	12.0
T2	41	68.0
T3	12	20.0
Atteinte des ganglions lymphatiques		
Négative	11	18.3
Positive	49	81.7
Stade TNM		
IA	5	8.3
IIA	27	45.0
IIB	16	26.7
IIIA	12	20.0
Grade histo-pronostic		
I	6	10.0
II	37	61.7
III	17	28.3
Type histologique		
Carcinome infiltrant non spécifique	54	90.0
Carcinome lobulaire infiltrant	4	6.7
Carcinome mucineux	2	3.3
RE		
Négatif	23	38.3
Positif	37	61.7
RP		
Négatif	26	43.3
Positif	34	56.7
HER2		
Négatif	31	51.7
Positif	29	48.3
Ki67		
Bas (≤14%)	12	20.0
Elevé (>14%)	48	80.0

TNM : *Tumor-Node-Metastasis* ; RE : récepteurs de l'œstrogène ; RP : récepteurs de la progestérone ; HER2 : *human epidermal growth factor receptor 2*.

3. Analyse de l'expression des microARN plasmatiques

Nous avons retrouvé une surexpression des trois microARN (miR-21, miR-96 et miR-155) dans le plasma des patientes atteintes du cancer du sein par comparaison aux témoins (**Figure 38**).

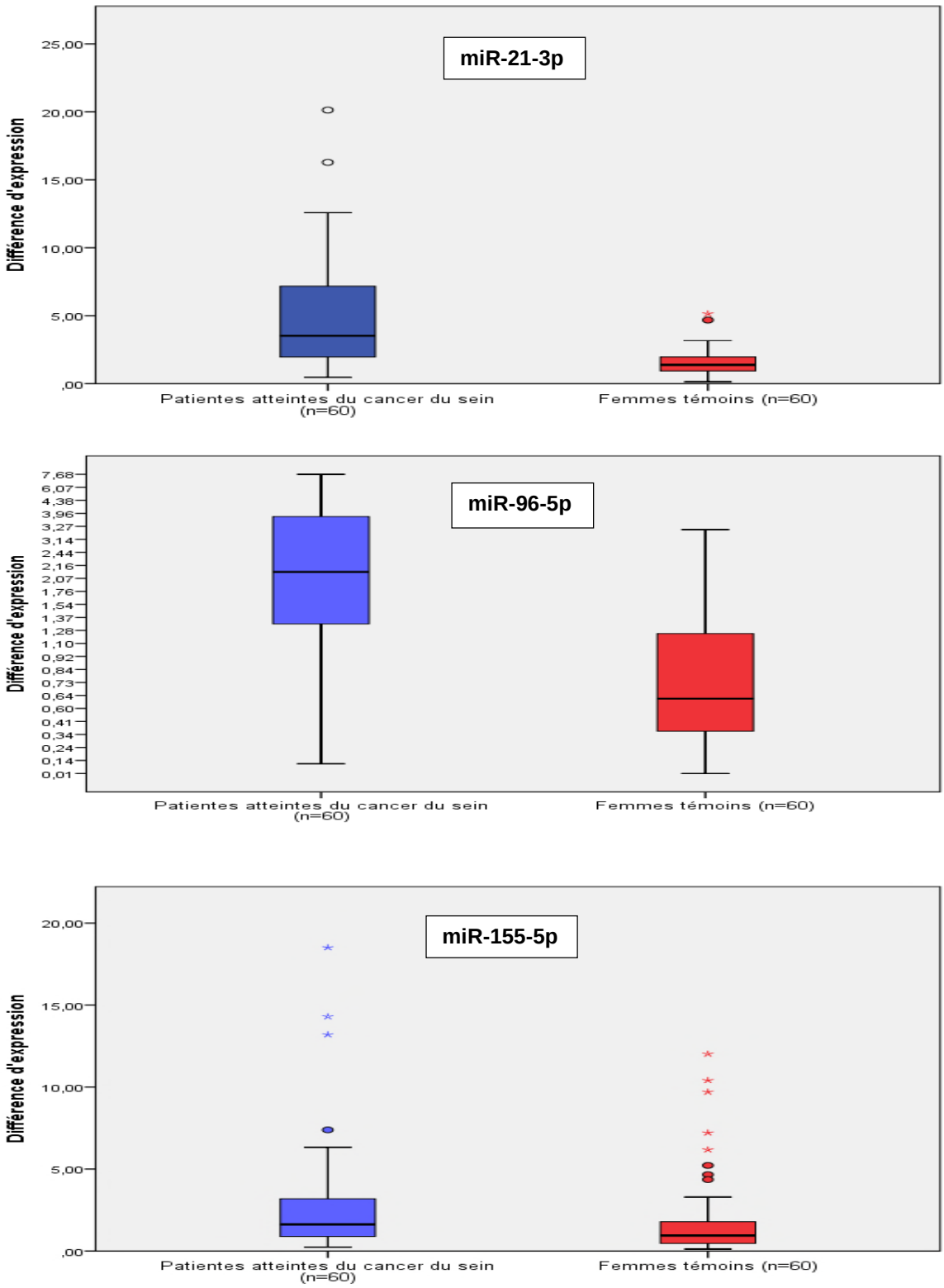


Figure 38. Comparaison du niveau d'expression des microARN plasmatiques entre les malades et les témoins. A/ miR-21-3p, B/ miR-96-5p et C/ miR-155-5p.

Le **Tableau XVII** regroupe les résultats de l'évaluation de l'expression relative des microARN plasmatiques normalisés par miR-16. On note une différence statistiquement significative pour les trois microARN testés ($p < 0.05$).

Tableau XVII. Comparaison de l'expression relative des microARN entre les deux groupes.

MicroARN	Malades (n=60)	Témoins (n=60)	p
miR-21	3.52 (0.46 – 20.13)	1.38 (0.14 – 5.14)	< 0.001
miR-96	2.12 (0.13 -7.68)	0.63 (0.01 – 3.21)	< 0.001
miR-155	1.62 (0.24 – 18.51)	0.94 (0.12 – 12.02)	0.004

Les résultats des microARN sont exprimés sous forme de ΔCt avec ΔCt = la valeur Ct du microARN d'intérêt moins la valeur Ct de miR16.

L'analyse de la corrélation de Pearson entre les différents microARN révèle la présence d'une forte corrélation ($r = 0.892$) entre miR-21 et miR-155 ; la corrélation entre miR-96 et les deux autres microARN est faible.

4. Association entre les microARN plasmatiques et les données clinicopathologiques des patientes

La relation entre le niveau d'expression des microARN et les paramètres clinicopathologiques a été évaluée. Comme le montre le **Tableau XVIII**, miR-21 est associé uniquement au type histologique de la tumeur. MiR-96 est quant à lui associé à la fois au grade histo-pronostic et au type histologique. Enfin, l'expression de miR-155 présente des différences statistiquement significatives en fonction de la localisation tumorale, du stade TNM, du grade histo-pronostic et du type histologique.

Le test de Chi-deux ne montre pas de différence d'expression des microARN en fonction du profil immunohistochimique des récepteurs hormonaux.

Tableau XVIII. Association entre les microARN testés et les caractéristiques cliniques des patientes atteintes du cancer du sein.

Caractéristique	miR-21-3p		miR-96-5p		miR-155-5p	
	Médiane (min-max)	p	Médiane (min-max)	p	Médiane (min-max)	p
Localisation tumorale						
Sein droit	0.23 (0.0000030-2.14)		1.12 (0.19-1.71)		1.32 (0.00017-2.94)	
Sein gauche	0.36 (0.00048-1.61)	0.694	0.99 (0.51-1.61)	0.265	0.89 (0.0000096-3.05)	**0.047**
Bilatéral	0.066 (0039-0.88)		1.53 (0.98-1.57)		2.47 (1.94-2.63)	
Taille de la tumeur						
T1	0.26 (0.019-1.61)		1.31 (1.09-1.56)		1.48 (0.00038-2.80)	
T2	0.34 (0.00037-2.14)	0.491	1.11 (0.19-1.71)	0.080	1.16 (0.0000096-3.05)	0.605
T3	0.15 (0.0000030-0.32)		0.81 (0.51-1.29)		1.10 (0.00017-2.60)	
Atteinte des ganglions lymphatiques						
Négative	0.16 (0.00048-1.53)	0.561	1.13 (0.19-1.61)	0.676	0.98 (0.0000096-3.05)	0.293
Positive	0.26 (0.0000030-2.14)		1.10 (0.51-1.71)		1.32 (0.00017-2.94	
Stade TNM						
IA	0.75 (0.003-1.61)		1.32 (0.80-1.57)		1.38 (0.89-2.63)	
IIA	0.26 (0.000037-2.14)	0.663	1.12 (.66-1.66)	0.057	1.48 (0.0000096-3.05)	**0.022**
IIB	1.09 (0.0013-1.53)		0.77 (0.51-1.38)		1.28 (0.00038-2.80)	
IIIA	0.28 (0.0000030-1.13)		1.22 (0.19-1.71)		0.33 (0.00017-2.56)	
Grade histo-pronostic						
I	0.45 (0.000037-0.88)		1.32 (0.68-1.66)		2.04 (0.68-2.94)	
II	0.26 (0.00048-2.14)	0.642	1.12 (0.51-1.71)	**0.012**	1.30 (0.0000096-3.05)	**0.044**
III	0.16 (0.0000030-1.13)		0.75 (0.19-1.56)		0.89 (0.00017-2.56)	
Type histologique						
Carcinome infiltrant non spécifique	0.32 (0.0032-2.14)		1.12 (0.19-1.71)		1.31 (0.00038-3.05)	
Carcinome lobulaire invasif	0.00048 (0.0000030-0.0018)	**0.001**	0.59 (0.51-0.66)	**0.015**	0.84 (0.0000096-0.89)	**0.021**
Carcinome mucineux	0.20 (0.15-0.26)		0.79 (0.51-1.08)		0.78 (0.24-1.31)	

TNM : *Tumor-Node-Metastasis* ; min : valeur minimale ; max : valeur maximale. Les résultats des microARN sont exprimés sous la forme $2^{-\Delta\Delta Ct}$, avec ΔCt = la valeur Ct du microARN d'intérêt moins la valeur Ct de miR16, et ΔΔCt = la valeur Ct des patientes atteintes d'un cancer du sein moins la valeur Ct des volontaires sains.

5. Marqueurs tumoraux sériques CA 15-3 et ACE

Le test des rangs signés de Wilcoxon pour échantillons appariés révèle que les concentrations sériques en CA 15-3 sont significativement plus élevées chez les patientes atteintes du cancer du sein par rapport aux femmes témoins (**Tableau XIX**). Par contre, il n'existe pas de différence significative entre les deux groupes pour l'ACE.

Dans notre série, les concentrations sériques du CA 15-3 sont élevées au moment du diagnostic du cancer du sein que dans 4 cas sur 60, soit 6.7 % des cas. Par ailleurs, les valeurs de l'ACE dépassent la valeur seuil du laboratoire dans 9 cas sur 60, soit 15 % des cas.

Tableau XIX. Résultats du dosage des marqueurs tumoraux sériques CA 15-3 et ACE chez les deux groupes.

Marqueur	**Cancer du sein (N=60)**	**Contrôle (N=60)**	**p**
CA 15-3 (UI/mL)	20.9 (13.7 – 26.4)	17.3 (11.4 – 21.5)	0.010
ACE (ng/mL)	1.47 (0.94 – 2.19)	1.38 (1.01 – 2.13)	0.541

6. Performances diagnostiques des microARN et comparaison aux marqueurs tumoraux CA15-3 et ACE

Des courbes ROC (*Receiver Operating Characteristics*) et les ASC (aires sous la courbe) ont été établies pour évaluer la valeur diagnostique des microARN pour la différenciation entre les patientes atteintes d'un cancer du sein et les femmes témoins saines (**Figure 39**). Pour les trois microARN retrouvés surexprimés à un niveau statistiquement significatif (miR-21-3p, miR-96-5p et miR-155-5p), les ASC sont de 0.838, 0.654, 0.854 respectivement. De plus, la valeur diagnostique de ces trois microARN a été examinée en combinaison. La combinaison de miR-21-3p et miR-96-5p est de loin la plus intéressante, offrant une ASC de 0,933 avec une sensibilité diagnostique de 91.7 % et une spécificité de 83.3 % (**Tableau XX**).

Les performances diagnostiques des microARN sont supérieures à ceux des marqueurs tumoraux sériques. En effet, l'ASC du CA 15-3 est de 0.623 (IC à 95% : 0.522 – 0.723). A la valeur seuil de 18.7 UI/mL, la sensibilité est de 58,3 % et la spécificité est de 61.7 %. Pour l'ACE, l'ASC est de 0.520 (IC à 95% : 0.415 – 0.624). A la valeur seuil de 1.40 ng/mL, la sensibilité est de 55.0 % et la spécificité est de 53.3 %. L'association des marqueurs tumoraux sériques aux microARN sous forme de score ne montre pas d'amélioration des performances diagnostiques par comparaison aux microARN seuls.

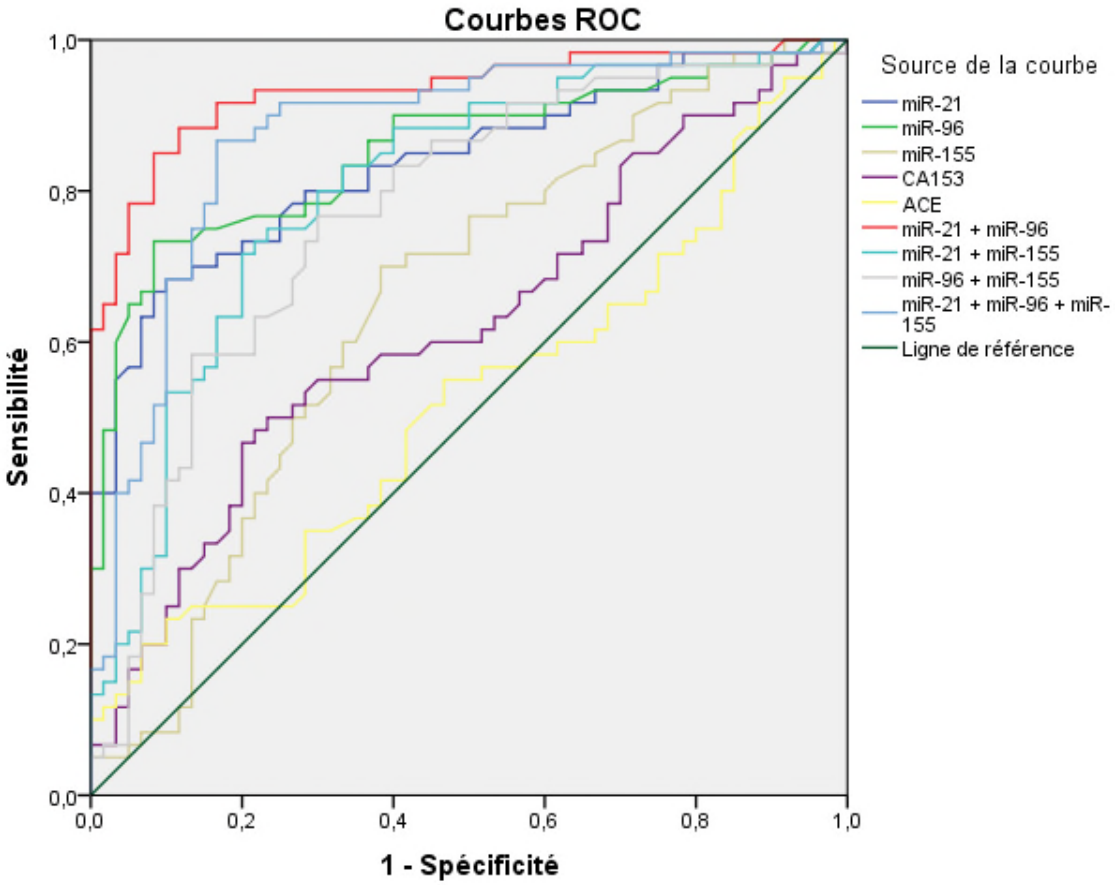


Figure 39. Courbes ROC (*Receiver Operating Characteristics*) des microARN et des marqueurs tumoraux sériques.

Tableau XX. Comparaison des performances diagnostiques des microARN et des deux marqueurs tumoraux sériques pour le diagnostic du cancer du sein.

Paramètre	ASC	IC 95%	Sensibilité	Spécificité	VPP	VPN
miR-21-3p	0.838	0.766 – 0.910	80.0 %	71.7 %	80.0 %	71.6 %
miR-155-5p	0.654	0.555 – 0.752	56.7 %	68.3 %	64.2 %	61.2 %
miR-96-5p	0.854	0.784 - 0924	75.0 %	85.0 %	88.3 %	77.3 %
CA 15-3	0.623	0.522 – 0.723	48.3 %	81.3 %	69.0 %	60.3 %
ACE	0.522	0.415 – 0.624	23.3 %	88.3 %	66.7 %	53.5 %
miR-21-3p + miR-155-5p	0.804	0.724 – 0.884	85.0%	61.7 %	68.9 %	80.4 %
miR-21-3p + miR-96-5p	0.933	0.887 – 0.980	91.7 %	83.3 %	87.9 %	88.3 %
miR-96-5p + miR-155-5p	0.772	0.686 – 0.857	76.7 %	70.0 %	71.9 %	75.0 %
miR-21-3p + miR-96-5p+miR-155-5p	0.875	0.809 – 0.941	88.3 %	78.3 %	80.3 %	87.0 %

ASC : aire sous la courbe ; IC 95% : intervalle de confiance à 95 % ; VPP : valeur prédictive positive ; VPN : valeur prédictive négative.

7. Analyse comparative des voies d'interaction géniques

MiRTargetLink 2.0 a indiqué (**Figure 40**) la présence d'une forte interaction entre miR-21-3p et miR-155-5p avec le gène PTEN. Par ailleurs, miR-155-5p et miR-96-5p agissent sur 4 gènes communs (FOXO3, RAD51, MITF et TP53INP1).

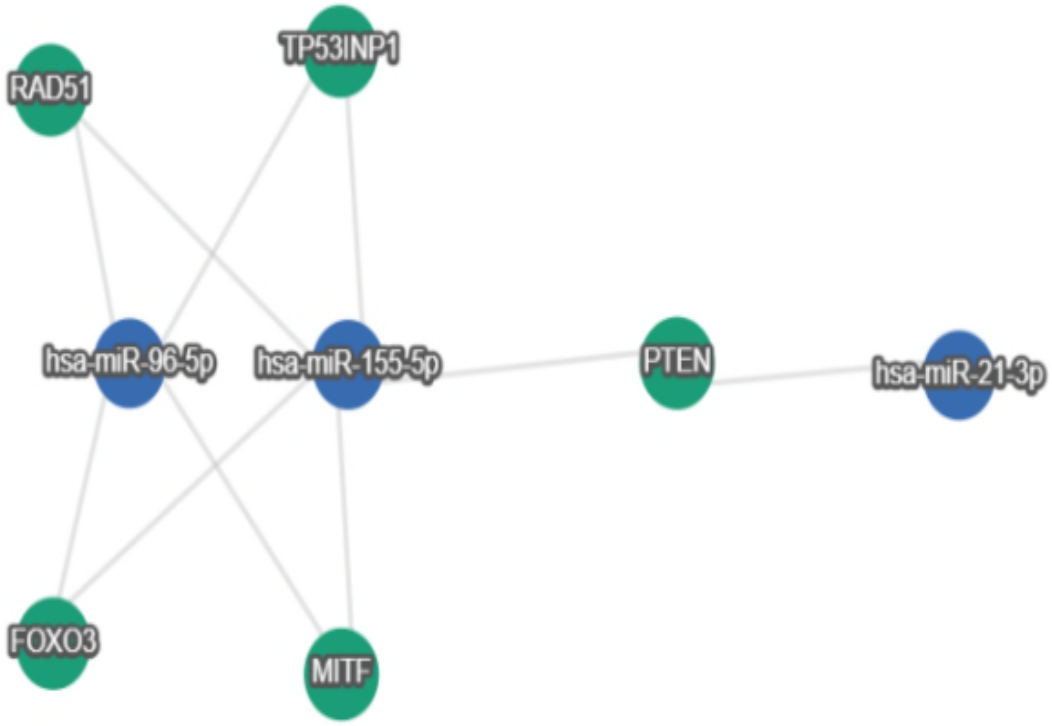


Figure 40. Réseau génétique commun des trois microARN (hsa-miR-21-3p, hsa-miR-96-5p et hsa-miR-155-5p) déterminé par l'algorithme miRTargetLink 2.0.

Les microARN sont représentés en bleu, les gènes cibles en vert et les interactions sont schématisées par des lignes.

DISCUSSION

Dans le but d’identifier un profil plasmatique de microARN capable de discriminer les patientes atteintes du cancer du sein des femmes saines, nous avons sélectionné à partir de la littérature actuelle trois microARN (miR-21, miR-96 et miR-155) comme candidats biomarqueurs du cancer du sein, et leurs niveaux d'expression plasmatiques ont été évalués chez 60 patientes atteintes d'un cancer du sein et 60 femmes saines alignées sur l’âge. Nos résultats montrent que ces trois microARN sont surexprimés au niveau des plasmas des malades par comparaison aux témoins. L’expression de ces microARN est associée à certaines caractéristiques cliniques des patientes, notamment le type histologique de la tumeur. L’analyse des performances diagnostiques de ces microARN pris séparément ou sous forme de combinaisons, a révélé que la signature moléculaire offrant la meilleure performance est l’association de miR-21 avec miR-96 qui présente une sensibilité et une spécificité de 91.7 % et 83.3 % respectivement. Ces résultats dépassent de loin ceux des marqueurs tumoraux classiques CA 15-3 et ACE.

Le dépistage du cancer du sein par mammographie a entrainé une réduction de la mortalité pouvant aller jusqu'à 30 % (131). Cependant, un nombre conséquent de patientes atteintes du cancer du sein n’est pas détecté par la mammographie en raison de différents facteurs. De plus, la détection de faux positifs par la mammographie peut causer un surtraitement un stress psychologique, ainsi qu'une maladie radio-induite (132–134). Même si la mammographie a beaucoup apporté en tant qu’examen de référence pour le dépistage du cancer du sein, il est nécessaire de rechercher de nouveaux biomarqueurs non invasifs complémentaires pour surmonter les limites liées aux approches diagnostiques conventionnelles.

Selon la *Food and Drug Administration* (FDA) et les *National Institutes of Health* (NIH), un biomarqueur (ou marqueur biologique) est défini comme étant : « une caractéristique définie qui est mesurée comme un indicateur des processus biologiques normaux, des processus pathogènes ou des réactions à une exposition ou une intervention, y compris les interventions thérapeutiques »

(135). Selon cette définition largement acceptée, les biomarqueurs peuvent être potentiellement utilisés pour l'une ou plusieurs de ces applications : dépistage, diagnostic, stratification, pronostic et suivi thérapeutique de la maladie (136).

L'analyse de la tumeur à travers des échantillons tissulaires obtenus par ponction biopsie représente un instantané unique qui ne reflète pas l'évolution de la tumeur dans le temps. Ces échantillons sont aussi soumis à un biais de sélection spatiale en raison de l'hétérogénéité tumorale. La biopsie liquide est apparue comme une nouvelle opportunité non invasive de détecter et de surveiller le cancer à partir des liquides biologiques comme le sang. Les cellules tumorales circulantes (CTC), l'ADN tumoral circulant (ADNtc), les ARNm et les microARN constituent une importante source d'information génomique reflétant tous les sous-clones présents dans les lésions primaires et métastatiques ; ce qui permet un suivi séquentiel de l'évolution de la maladie (137).

Parmi les avantages majeurs de l'utilisation des microARN comme biomarqueurs, on compte la stabilité exceptionnelle de ces acides nucléiques. En raison de leur petite taille et de leur encapsulation dans des protéines et des lipides, les microARN sont intrinsèquement moins sensibles à la dégradation que les autres ARN. Les microARN sont stables dans le sang à des pH et des températures extrêmes, résistent mieux à la dégradation par les ribonucléases et peuvent subir un stockage prolongé (93,138). Li *et al.* ont comparé la stabilité des microARN à celle des ARNm dans des échantillons sanguins sous différentes conditions environnementales. Les microARN se sont montrés beaucoup plus stables que les ARNm, notamment sous l'action de la lumière et des températures élevées (139).

Dans le but d'évaluer l'intérêt des microARN comme biomarqueurs du cancer du sein, nous avons effectué cette étude prospective de type cas témoins. L'âge moyen de nos patientes est de 51 ans. Cette moyenne d'âge est comparable à celle d'autres pays du Maghreb (17,140), mais plus basse d'au moins une dizaine d'années à celles rencontrées dans les pays occidentaux (15,141). Lors du recrutement de la population d'étude, nous avons rencontré

deux principales difficultés. La première est que peu de patientes se trouvaient à un stade précoce du cancer du sein au moment du diagnostic, ce qui était un critère de non inclusion dans notre étude. La seconde difficulté est celle de la sélection du groupe de témoins. Les femmes constituant ce groupe devant avoir des caractéristiques démographiques semblables aux malades, en particulier pour l'âge, afin que la comparaison entre les deux groupes puisse aboutir sur des conclusions fiables.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux microARN présents au niveau du sang, car c'est le liquide biologique le plus accessible et le plus utilisé en biologie médicale. En ce qui concerne le choix entre sérum et plasma, nous avons opté pour le plasma. Le sérum est le liquide surnageant obtenu après coagulation du sang, suivi d'une centrifugation du tube ne contenant aucun anticoagulant. Tandis que le plasma est obtenu après centrifugation d'un tube contenant un anticoagulant qui empêche la transformation du fibrinogène en fibrine. Le contenu en microARN diffère peu ou prou de celui du sérum. Dufourd *et al.* recommande l'utilisation du plasma (92).

Étant donné qu'il existe plus de 2300 microARN matures (68), nous ne pouvions pas les quantifier tous au niveau sanguin par qRT-PCR. Dans cette étude, nous avons choisi de mesurer l'expression de trois microARN (miR-21-3p, miR-96-5p et miR-155-5p), en plus de miR-16-5p qui a servi à la normalisation des résultats. Ce choix a été orienté par le fait que ces trois microARN semblent agir en tant qu'oncogène dans le cancer du sein, en ciblant des gènes suppresseurs de tumeurs.

MiR-21 est le microARN le plus couramment surexprimé dans les maladies cancéreuses, agissant comme un oncogène. MiR-21 est impliqué dans la régulation de l'expression de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs et joue un rôle crucial dans l'apparition et le développement de diverses maladies cancéreuses. Parmi les cibles de miR-21, on retrouve l'homologue de la phosphatase et de la tensine (PTEN) qui est un gène suppresseur de tumeur.

Une expression élevée de ce microARN est associée à une perte de la PTEN dans les cancers du sein, du pancréas et du côlon (142).

Le microARN, miR-96, se comporte comme un oncogène en diminuant l'expression dans les cellules cancéreuses du sein du facteur de transcription FOXO3 (*forkhead box O 3*) (143). FOXO 3 est une protéine connue pour son action de suppresseur de tumeur grâce à sa capacité de réguler des gènes essentiels à la prolifération cellulaire, l'apoptose, le métabolisme, la migration cellulaire et les métastases (144). MiR-96 joue aussi un rôle dans la promotion de la migration des cellules du cancer du sein par l'activation de la voie de signalisation MEK/ERK (*mitogen-activated protein kinase kinase*/*extracellular signal-regulated kinase*) en ciblant le gène AK3 (arginine kinase 3) (145).

MiR-155 joue un rôle essentiel dans le développement du cancer du sein en affectant différentes cibles et en modifiant les voies de signalisation, favorisant les voies oncogènes dans les cellules transformées. Il est impliqué dans divers processus physiologiques et pathologiques, et sa dérégulation peut entraîner une résistance apoptotique et déclencher des cascades oncogènes. MiR-155 joue agit notamment sur la prolifération et la migration des cellules cancéreuses du sein en régulant à la baisse l'expression de SOCS1 (*suppressor of cytokine signaling 1*) et en régulant à la hausse l'expression de MMP16 (*matrix metallopeptidase 16*) (146).

Les résultats de cette étude mettent en évidence une surexpression des trois microARN (miR-21, miR-96 et miR-155) chez les patientes atteintes du cancer du sein comparativement au groupe contrôle. Ces résultats apportent un nouvel éclairage, dans un contexte où les données de la littérature sont contradictoires. En effet, si miR-21 est largement décrit comme étant surexprimé durant la maladie, les résultats sont contradictoires pour miR-155. Dans une étude menée sur une population turque, Aksan *et al.* ont retrouvé des valeurs élevées de miR-21 et des valeurs basses de miR-155 chez les patientes par rapport aux témoins (147). À l'inverse, dans une étude menée sur une population chinoise de 90 patientes atteintes du cancer du sein et 21 femmes saines,

l'expression de cinq microARN sériques (miR-21, miR-125b, miR-145, miR-155, et miR-365) a été évaluée. Parmi eux, miR-21 et miR-155 étaient tous deux significativement surexprimés chez les malades par rapport aux témoins (148). Raghu *et al.* quant à eux n'ont pas retrouvé de différence d'expression pour miR-155 chez une population indienne (149).Très peu d'études ont évalué l'intérêt de miR-96 pour l'exploration du cancer du sein, néanmoins celles-ci ont rapporté des résultats concordants avec les nôtres, à savoir une surexpression de miR-96 chez les malades (119,150). Les différences de résultats observées dans la littérature pour miR-155 peuvent être dues, d'une part, à une variabilité dans la méthode d'analyse, notamment la stratégie de normalisation adoptée et d'autre part, à l'origine ethnique de la population.

La plupart des études ayant évalué l'intérêt des microARN comme biomarqueurs du cancer du sein ont été réalisées sur des populations européennes et asiatiques. Or l'on sait que l'expression des microARN est dépendante de l'origine ethnique (151). Il est donc indispensable d'évaluer ces biomarqueurs sur notre population et de ne pas transposer les résultats obtenus ailleurs sur notre population. À notre connaissance, ce travail représente la première étude en Algérie à avoir évalué l'intérêt des microARN comme biomarqueurs du sein au niveau du plasma. Nous avons retrouvé dans la littérature uniquement une étude algérienne, réalisée sur des tissus (prélèvement invasif) et non pas sur des prélèvements sanguins. Comparativement à notre étude, celle de Tfaily *et al.* (152) comporte de nombreuses insuffisances. Premièrement, le nombre d'échantillons est beaucoup moins important, 22 malades et 8 femmes témoins seulement. Ce faible nombre ne leur a pas permis d'étudier le lien entre l'expression des microARN et les caractéristiques cliniques des patientes. Deuxièmement, la méthodologie de recrutement des malades n'est pas clairement définie avec des critères d'inclusion. Troisièmement, la normalisation des résultats est basée sur l'utilisation de RNU6B qui n'est pas une référence adéquate.

En raison de l'impact critique de la stratégie de normalisation sur l'interprétation des résultats, le choix de l'agent de normalisation a une grande importance. La normalisation des résultats de cette étude a été réalisée en utilisant miR-16 comme référence. MiR-16 est le microARN le plus couramment utilisé comme référence endogène dans la littérature (153). Cette large utilisation s'explique par le fait que miR-16 est fortement exprimé dans le plasma ou le sérum et a été décrit comme étant relativement stable dans les échantillons sanguins. Toutefois, certains travaux ont remis en question cette stabilité avec des résultats contradictoires, tantôt à la hausse, tantôt à la baisse. Stückrath *et al.* (154) ont décrit des concentrations plasmatiques de miR-16 significativement augmentées chez les patientes sans atteintes des ganglions lymphatiques et des valeurs diminuées voir normales chez les patientes présentant des métastases ganglionnaires. Toutefois, rien ne prouve que la référence endogène utilisée dans cette étude, miR-1207, soit meilleure que miR-16. En effet, miR-1207 semble favoriser la prolifération des cellules cancéreuses du sein en ciblant le gène STAT6 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 6*) et pourrait être une cible potentielle pour le traitement du cancer du sein (155). MiR-1207 a également été décrit comme étant dérégulé dans les tissus des patientes atteintes du cancer du sein (156). Shin *et al.* (157) ont rapporté que miR-16 était régulé à la baisse dans les échantillons plasmatiques de patientes atteintes d'un cancer du sein triple négatif par rapport aux témoins sains ($p < 0.001$). Ils ont proposé miR-16 comme biomarqueur pour le diagnostic des patientes atteintes du cancer du sein triple négatif ; miR-484 avait été utilisé comme référence endogène. Dans l'étude de Hu *et al.* (158), miR-16 était exprimé différemment dans les échantillons sériques des patientes atteintes d'un cancer du sein par rapport aux témoins ($p < 0.0001$). Là aussi, le choix de la stratégie de normalisation est contestable. Ainsi, les microARN utilisés pour la normalisation, miR-484 et miR-191, n'ont pas été décrits par d'autres études comme étant stables. Holubekova *et al.* (125) ont réalisé une étude qui a porté sur des échantillons plasmatiques de 65 patients atteintes du cancer du sein et 34 femmes volontaires saines. Les microARN sélectionnés ont été criblés dans des

tests pilotes par la méthode qRT-PCR, et les gènes de référence les plus appropriés ont été sélectionnés pour la normalisation par l'algorithme geNorm. MiR-16 présentait la plus grande stabilité et a été recommandé par les auteurs comme étant le contrôle endogène le plus approprié pour le cancer du sein. À l'inverse, miR-484 était considérablement régulé à la hausse dans les échantillons des malades ($p < 0.05$) par rapport aux témoins et miR-191 a aussi été exclu, car il avait un Ct supérieur à 30 cycles ; dans ces conditions, la variabilité de la quantité du microARN augmente et les résultats peuvent ne pas être représentatifs. Rinnerthaler *et al.* ont constaté que, miR-16 est exprimé de manière stable à la fois dans les échantillons des tumeurs primaires et des sites métastatiques et recommande l'utilisation de miR-16 comme contrôle endogène pour la normalisation de l'expression des microARN utilisant des tissus de cancer du sein (159). McDermott *et al.* (127) ont analysé l'expression d'un grand nombre de microARN sur les échantillons sanguins de dix patientes atteintes d'un cancer du sein et de dix témoins. L'algorithme geNorm a déterminé que miR-425 et miR-16 étaient les références les plus stables parmi les candidats. L'expression de miR-425 et miR-16 a été secondairement vérifiée dans une cohorte plus importante de 40 patientes atteintes d'un cancer du sein et de 20 femmes en bonne santé. Les résultats ont confirmé l'expression stable de miR-16 et miR-425 dans les deux groupes. Les résultats de cette étude montrent d'autre part que miR-16 présente une plus grande stabilité que miR-484.

RNU6B est un petit ARN nucléolaire (snoARN) qui fait partie de la petite ribonucléoprotéine nucléaire U6, un composant du splicéosome responsable de l'épissage du pré-miARN. L'utilisation de RNU6B et d'autres snoARN dans la recherche liée aux microARN est controversée. Ces molécules plus grosses sont susceptibles d'être moins fiables que les microARN car leur expression est moins stable que les microARN avec des études montrant une dégradation plus fréquente dans les échantillons de sérum. Il est donc difficile de tirer des conclusions concernant l'expression des microARN lorsque les snoARN sont utilisés comme contrôles endogènes. Plusieurs études ont employé RNU6B comme référence endogène pour la quantification des microARN (128,160,161).

Pourtant, RNU6B ne devrait pas servir à normaliser les résultats. D'une part, les niveaux sanguins de RNU6B présentent une grande variabilité interindividuelle, allant jusqu'à huit cycles dans la qRT-PCR (162). D'autre part, la détermination de l'expression de RNU6B et miR-16 dans le sérum soumis à différents cycles de congélation/décongélation a révélé que l'expression de RNU6B diminue progressivement après 1, 2 et 4 cycles de congélation/décongélation, tandis que l'expression de miR-16 reste relativement stable (163).

Pour s'assurer que la quantification des microARN n'est pas affectée par la variabilité technique qui peut être introduite lors du processus d'analyse, des microARN synthétiques peuvent être utilisés. Parmi ces microARN exogènes non humains, on retrouve cel-miR-39 et cel-miR-54. Cette méthode de normalisation repose sur l'ajout avant l'étape d'extraction d'une quantité connue de microARN synthétique à un volume défini de sérum, plasma ou sang total ; une quantité stable de gène de référence est alors obtenue. Cependant, cette technique laisse place à l'erreur technique et humaine. Récemment, la communauté scientifique a commencé à considérer ces molécules comme inadaptées, en raison de leur stabilité apparente réduite et parce que ces molécules exogènes sont étrangères aux échantillons de liquides biologiques, et ne sont donc pas parfaitement comparables aux microARN endogènes (153).

En ce qui concerne l'évaluation de l'association entre l'expression des microARN et les caractéristiques cliniques, nous n'avons pas retrouvé de lien entre l'expression plasmatique de miR-21 et la plupart des données cliniques, seule une association avec le type histologique a été observée. Elghoroury *et al.* n'ont pas observé de corrélation entre le niveau d'expression sérique de miR-21 et les caractéristiques clinicopathologiques des patientes atteintes du cancer du sein (164). Pour miR-96, nous avons constaté une corrélation avec le grade histo-pronostic et le type histologique, mais pas avec les autres données comme le stade TNM ou encore le statut en récepteurs hormonaux. Xie *et al.* ont retrouvé que l'expression de miR-96 était presque équivalente dans les types de cancer ER+, PR+ et HER+ par rapport aux ER-, PR- et HER-. Il n'y avait pas non

plus de différence en fonction du stade du cancer du sein ; l'association avec les autres paramètres cliniques n'a pas été évaluée (165).

Nous avons retrouvé des différences statistiquement significatives de l'expression plasmatique de miR-155 en fonction de la localisation tumorale, du stade TNM, du grade histo-pronostic et du type histologique. Han *et al,* ont aussi constaté que miR-155 était significativement plus élevé aux stades I et II par rapport au stade III ; ce qui concorde avec notre étude. À l'opposé, Canatan *et al.* (166) n'ont pas observé de différence d'expression de miR-155 en fonction du stade clinique. L'absence de cette observation pourrait être due au faible nombre de patientes incluses dans leur étude, 20 patientes atteintes du cancer du sein contre 60 dans notre étude. Il existe des discordances dans la littérature concernant la corrélation entre l'expression de miR-155 et le statut des récepteurs hormonaux. Ainsi, Jang *et al.* n'ont pas retrouvé d'association entre l'expression tissulaire de miR-155 et le statut en récepteurs hormonaux ER/PR (167). Tandis que Gwak *et al.* ont constaté que les niveaux tissulaires de miR-155 étaient inversement corrélés avec le statut de ces récepteurs (168). Pour notre part, nous n'avons pas trouvé de lien entre l'expression plasmatique de miR-155 et le profil immunohistochimique des malades.

Le CA 15-3 et l'ACE sont les deux principaux marqueurs biologiques du cancer du sein (169). Dans notre étude, l'évaluation de l'aire sous la courbe montre que l'ACE n'a pas de valeur prédictive pour le diagnostic du cancer du sein (ASC proche de 0.5). Le CA 15-3 quant à lui, est un paramètre peu informatif (ASC compris entre 0.5 et 0.7). Malgré sa spécificité relativement bonne, la faible sensibilité du CA 15-3 empêche son utilisation comme test diagnostic du cancer du sein. Notre étude confirme donc que le CA 15-3 et l'ACE ne peuvent pas servir d'outils diagnostics du cancer du sein. Le dosage initial de ces deux marqueurs possède cependant un intérêt pour prédire la présence de métastases à distance. Lors du bilan d'extension initial, une valeur seuil de CA 15-3 à 50 UI/mL permet de détecter la présence de métastases à distance avec une sensibilité de 62 %. L'association de l'ACE au CA 15-3 augmente en

moyenne cette sensibilité de 9 % (38,170). Chacun des trois microARN testés, montre des performances diagnostiques supérieures à celles du CA 15-3 et de l'ACE. La combinaison des deux microARN miR-21 et miR-96 est une « signature » moléculaire qui présente la plus importante ASC : 0.933 (IC95% : 0.887 – 0.980). Un avantage de notre étude est que la plupart des patientes avaient un cancer du sein à un stade précoce au moment du prélèvement de l'échantillon, ce qui met en évidence la pertinence des microARN identifiés dans la détection précoce du cancer du sein.

En ce qui concerne les limites de ce travail, une validation des résultats de cette étude pilote est nécessaire sur une population plus large. En outre, nous avons évalué l'expression de trois microARN plasmatiques, en dehors du miR-16 qui a servi à la normalisation des résultats. Il serait intéressant d'étendre cette étude à d'autres microARN pouvant potentiellement présenter un intérêt pour l'exploration du cancer du sein.

CONCLUSION

Nous avons évalué dans cette étude prospective l'expression de trois microARN (miR-21, miR-96 et miR-155) dans les échantillons plasmatiques de 60 patientes atteintes du cancer du sein et 60 femmes témoins. Le dosage a été réalisé par qRT-PCR qui représente la méthode de référence pour la détermination de l'expression des microARN. Un quatrième microARN, miR-16 a servi à la normalisation des résultats. Nous avons retrouvé une surexpression statistiquement significative pour les trois microARN dans les plasmas des patientes atteintes du cancer du sein nouvellement diagnostiquées. Ces résultats apportent un nouvel éclairage, dans un contexte où les données actuelles de la littérature sont discordantes. Il faut également savoir que l'expression des microARN est dépendante de l'origine ethnique. Cette étude est la première à avoir évalué l'intérêt des microARN circulants comme biomarqueurs du cancer du sein chez la population algérienne.

La dérégulation observée de ces microARN, y compris aux premiers stades du cancer du sein, suggère un intérêt dans la prédiction de la maladie avant la manifestation des symptômes ou des complications. La variation de ces molécules au niveau sanguin pouvant être précoce et mesurable avant même l'apparition d'anomalies sur l'imagerie ou l'analyse anatomopathologique. Le dosage des microARN n'a pas pour objectif de remplacer ces méthodes d'exploration dont l'intérêt est bien établi, mais de leur être complémentaire, dans le but d'offrir aux cliniciens un nouvel outil servant à la prévention de la maladie et à une meilleure prise en charge des patientes.

Cette étude pilote a permis de découvrir une signature moléculaire, n'ayant pas encore été décrite à ce jour, consistant en l'association de deux microARN (miR-21 + miR-96) qui offre des performances diagnostiques exceptionnelles (ASC : 0.933, IC95% : 0.887 – 0.980). Il serait intéressant de valider l'intérêt de ce panel sur une population plus large.

D'autre part, ce travail met en évidence la relation entre l'expression des microARN testés et certaines caractéristiques cliniques des patientes. C'est notamment le cas de miR-155 dont l'expression dépend de la localisation tumorale, du stade TNM, du grade histo-pronostic et du type histologique de la

tumeur. Pour pouvoir expliquer ce lien, des études expérimentales complémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre l'origine et le rôle fonctionnel de ces microARN dans le cancer du sein.

Par ailleurs, la comparaison des résultats des microARN à ceux des marqueurs tumoraux sériques classiques CA 15-3 et ACE, révèle que la sensibilité et la spécificité des microARN pris séparément ou sous forme de panel sont nettement supérieures.

Ainsi, les microARN émergent en tant que nouveaux biomarqueurs non invasifs pour le dépistage précoce, le diagnostic, le pronostic et le suivi thérapeutique des patientes atteintes du cancer du sein. Toutefois, il est nécessaire de standardiser les procédures de traitement des échantillons, les méthodes de dosage et surtout les stratégies de normalisation pour rendre les résultats transférables et permettre l'utilisation de ces nouveaux biomarqueurs en pratique clinique.

ANNEXES

Annexe 1. Fiche de renseignements des données cliniques et démographiques des patientes

Fiche de Renseignements Cliniques

Patientes atteintes du CS non métastatique

Nom et prénom de la patiente :

Age : ans

Taille : cm

Poids : kg

Nombre de grossesses et de parturitions :

Statut ménopausal : ☐ Pré-ménopause ☐ Post-ménopause

Antécédents familiaux : ☐ Oui ☐ Non

Sein(s) affecté(s) : ☐ Droit ☐ Gauche ☐ Les deux

Taille de la tumeur : ☐ <2 cm ☐ 2-5 cm ☐ >5 cm

Nombre de ganglions : ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ >3

Type de carcinome : ☐ Canalaire ☐ Lobulaire ☐ Autre, à préciser

Grade histologique : ☐ I ☐ II ☐ III ☐ Inconnu

Récepteurs hormonaux, si connus : RE RP HER2 Ki67

Autres pathologies (diabète, HTA, dysthyroïdie…) :

Thérapeutiques en cours :

N.B : Les prélèvements sanguins doivent être recueillis sur un tube sec et un tube EDTA.

Oran, le / /

Annexe 2. Protocole d’extraction des microARN plasmatiques

1. **Préparation des solutions de lavage**
    - Ajouter 21 ml d'éthanol à la solution de lavage 1.
    - Ajouter 40 ml d'éthanol à la solution de lavage 2/3.
2. **Extraction organique**
    - 200 µL de plasma sont utilisés pour l'extraction des microARN. Deux volumes de tampon de lyse (400 µL) sont ajoutés au plasma. Incuber pendant 5 minutes sur paillasse.
    - Ajouter 60 µL de volume d'additif homogénat microARN aux 600 µL précédents et bien mélanger en vortexant ou en inversant le tube plusieurs fois.
    - Laissez reposer le mélange sur de la glace pendant 10 min.
    - Ajouter 600 µL de mélange phénol-chloroforme.
    - Mélanger au vortex pendant 30 à 60 secondes.
    - Centrifuger pendant 5 min à vitesse élevée (10 000 x g) à température ambiante pour séparer les phases aqueuse et organique. Après centrifugation, l'interphase doit être compacte ; si ce n'est pas le cas, répéter la centrifugation.
    - Retirer délicatement 300 µL de la phase aqueuse (supérieure) sans perturber la phase inférieure et transférez-la dans un nouveau tube.
3. **Enrichissement des ARN**
    - Préchauffer la solution d'élution à 95 °C pour l'élution de l'ARN du filtre à la fin de la procédure. L'éthanol à 100 % doit être à température ambiante.
    - Ajouter 1.25 de volume d'éthanol à 100 % à la phase aqueuse récupérée de l'extraction organique (ajouter 375 µL d'éthanol à 100 % à 300 µL de phase aqueuse). Bien mélanger en vortexant ou en retournant le tube plusieurs fois.

- Pour chaque échantillon, placez une cartouche filtrante dans l'un des tubes fournis dans le kit.
- Pipeter le mélange lysat/éthanol (issu de l'étape précédente) sur la cartouche de filtre.
- Centrifuger pendant environ 15 secondes à 10 000 x g pour faire passer le mélange à travers le filtre. Centrifuger plus fort que cela peut endommager les filtres.
- Jeter l'écoulement et répéter jusqu'à ce que tout le mélange lysat/éthanol passe par le filtre. Réutilisez le tube de collecte pour les étapes de lavage.
- Appliquer 700 µL de miRNA Wash Solution 1 (solution de travail mélangée à de l'éthanol) sur la cartouche filtrante et centrifugez pendant environ 5 à 10 secondes. Jetez le flux de collecte et replacez la cartouche filtrante dans le même tube de collecte.
- Appliquer 500 µL de solution de lavage 2/3 (solution de travail mélangée à de l'éthanol) et aspirez-la à travers la cartouche filtrante comme dans l'étape précédente.
- Répéter avec une deuxième aliquote de 500 µL de solution de lavage 2/3.
- Après avoir jeté le flux du dernier lavage, replacer la cartouche filtrante dans le même tube de collecte et faire tourner l'ensemble pendant 1 min pour éliminer le liquide résiduel du filtre.
- Transférer la cartouche filtrante dans un nouveau tube (fourni avec le kit). Appliquer 100 µL de solution d'élution préchauffée (95 °C). Faire centrifuger pendant environ 20 à 30 secondes à vitesse maximale pour récupérer les ARN.
- Recueillir l'éluat (qui contient les ARN) et le conserver à -20°C.

Annexe 3. Protocole de la transcription inverse

• Décongeler les composants du kit de transcription inverse sur de la glace.

• Décongeler les amorces RT (*reverse transcription*) sur de la glace, vortexer, puis centrifuger brièvement pour récupérer le contenu au fond du tube.

1. **Préparation du mélange réactionnel RT**

- Dans un tube de microcentrifugation de taille appropriée, préparer le mélange réactionnel RT selon le tableau suivant :

Composant	**Volume (1 réaction)**	**Volume (10 réactions)** (1)
100mM dNTPs (avec dTTP)	0.15 µL	1.65 µL
MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 50 U/µL	1.00 µL	11.00 µL
10× Reverse Transcription Buffer (tampon)	1.50 µL	16.50 µL
Inhibiteur de RNase, 20 U/µL	0.19 µL	2.09 µL
Eau exempte de nucléase	4.16 µL	45.76 µL
Volume total du mélange réactionnel RT	**7.00 µL**	**77.00 µL**

(1) Comprend un excédent de 10 %.

- Retourner pour mélanger, puis centrifuger brièvement pour récupérer le contenu au fond du tube.

2. **Préparation de la réaction RT**

- Combiner 7 µL de mélange réactionnel RT et 5 µL d'ARN total dans un tube conique. 5 µL doivent contenir 1 à 10 ng d'ARN total.
- Bien mélanger, puis centrifuger brièvement pour récupérer le contenu au fond des tubes.

- Ajouter 3 µL de 5× RT Primer dans chaque tube de réaction.
- Sceller les tubes.
- Centrifuger brièvement pour recueillir le contenu au fond des tubes.
- Placer sur de la glace.

3. Réalisation de la transcription inverse

- Placer les tubes dans un thermocycleur, puis incuber un volume de réaction de 15,0 µL selon les étapes suivantes :

Etape	Température	Temps
Transcription inverse	16°C	30 minutes
	42°C	30 minutes
Arrêt de la réaction	85°C	5 minutes
Conservation	4°C	Conservation à court terme

- Le produit de réaction RT peut être conservé entre –25 et –15 °C pendant une semaine au maximum.

Annexe 4. Protocole de l’amplification

Décongeler les réactifs de dosage (20 X) et l'ADNc sur de la glace, vortexer doucement, puis centrifuger brièvement et récupérer le contenu au fond du tube.

Préparer le mélange réactionnel PCR

- Mélangez le PCR Master Mix en remuant doucement le flacon.
- Préparez le mélange réactionnel PCR dans des tubes de microcentrifugation de taille appropriée, conformément au tableau suivant :

Composant	**Volume par réaction**
TaqMan™ Small RNA Assay (20X)	1.00 µL
PCR Master Mix	10.00 µL
Eau exempte de nucléase	7.67 µL
Volume total du mélange réactionnel PCR	**18.67 µL**

- Vortexer pour bien mélanger, puis centrifuger brièvement pour recueillir le contenu au fond du tube.

Préparer la plaque de réaction PCR

- Transférer le volume approprié de mélange réactionnel PCR dans chaque microtube (0,2 mL) : 18,67 µL
- Ajouter une matrice d'ADNc dans chaque microtube : 1,33 µL
- Sceller la plaque avec un film adhésif optique, puis centrifuger brièvement la plaque pour amener le mélange réactionnel PCR au fond des tubes.

Configurer et exécuter l'instrument de PCR en temps réel

- Configurez le protocole thermique pour l’instrument selon le tableau suivant :

Activation	**Température**	**Temps**	**Cycles**
Activation avec UNG	50°C	2 minutes	1
Activation enzymatique	95°C	10 minutes	1
Dénaturation	95°C	15 secondes	40
Polymérisation	60°C	60 secondes	

- Configurez le protocole thermique de l’instrument.
- Chargez la plaque dans l'instrument PCR en temps réel.
- Démarrez l'analyse.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

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

2. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Cancer Today. Disponible sur : https://gco.iarc.fr/today/home (Consulté le 04 juin 2022).

3. US Cancer Statistics Working Group. US Cancer Statistics (1975–2017). Disponible sur : https://seer.cancer.gov/csr/1975_2017/results_merged/sect_04_breast.pdf (Consulté le 3 mai 2020).

4. Bannour I, Briki R, Zrairi F, Zahmoul T, Hamchi H, Kammoun Belajouza S, *et al*. Breast cancer in the Maghreb : epidemiology and control strategies. Review. Tunis Med 2018;96(10- 11):658- 64.

5. Delaloge S, Bachelot T, Bidard FC, Espie M, Brain E, Bonnefoi H, *et al*. Dépistage du cancer du sein : en route vers le futur. Bull Cancer (Paris) 2016;103(9):753- 63.

6. Nargis HF, Nawaz H, Ditta A, Mahmood T, Majeed MI, Rashid N, *et al*. Raman spectroscopy of blood plasma samples from breast cancer patients at different stages. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 2019;222:117210.

7. Abbou O, Zendjabil M. Apport du CA15-3 dans la prise en charge des patientes atteintes d'un cancer du sein. Revue Médicale de l'EHU 1er Novembre d'Oran 2015(02):14- 5.

8. Zendjabil M. Identification d'un profil de marqueurs tumoraux sériques pour le diagnostic du cancer du sein métastatique. Algerian J Health Sci 2020;2(4):23- 7.

9. Du T, Zamore PD. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. Dev Camb Engl 2005;132(21):4645- 52.

10. Sohel MMH. Circulating microRNAs as biomarkers in cancer diagnosis. Life Sci 2020;248:117473.

11. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, *et al*. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. Br J Haematol 2008;141(5):672- 5.

12. Zendjabil M. Circulating microRNAs as novel biomarkers of Alzheimer's disease. Clin Chim Acta 2018;484:99- 104.

13. Khalife H, Skafi N, Fayyad-Kazan M, Badran B. MicroRNAs in breast cancer: New maestros defining the melody. Cancer Genet 2020;246- 247:18- 40.

14. Fang R, Zhu Y, Hu L, Khadka VS, Ai J, Zou H, *et al*. Plasma MicroRNA Pair Panels as Novel Biomarkers for Detection of Early Stage Breast Cancer. Front Physiol 2018;9:1879.

15. US Preventive Services Task Force, Owens DK, Davidson KW, Krist AH, Barry MJ, Cabana M, *et al*. Medication Use to Reduce Risk of Breast Cancer: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. JAMA 2019;322(9):857- 67.

16. Sancho-Garnier H, Colonna M. Épidémiologie des cancers du sein. Presse Médicale 2019;48(10):1076- 84.

17. Ben Abdelaziz A, Melki S, Nouira S, Ben Abdelaziz A, Khelil M, Azzaza M, *et al*. Cancers in the Central Maghreb: epidemiology from 1990 to 2017 and trends in 2040. Tunis Med 2019;97(6):739- 70.

18. Hammouda PD. Registre des Tumeurs de la wilaya d'Alger. 2017, p:33.

19. MacGrogan G. Chapitre5 - Anatomie pathologique des cancers du sein en phase précoce. In : Classe JM, Campone M, Lefebvre-Lacœuille C, Elsevier Masson ; 2016, p. 35- 48.

20. Jesinger RA. Breast Anatomy for the Interventionalist. Tech Vasc Interv Radiol 2014;17(1):3- 9.

21. Antoine M, Teilhac MF, Poulet B, Cros J. De la cellule mammaire normale à la cellule cancéreuse. Médecine Nucl 2010;34(1):14- 22.

22. Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, Phillips KA, Mooij TM, Roos-Blom MJ, *et al*. Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. Jama 2017;317(23):2402- 16.

23. de Boer MC, Wörner EA, Verlaan D, van Leeuwen PAM. The Mechanisms and Effects of Physical Activity on Breast Cancer. Clin Breast Cancer 2017;17(4):272- 8.

24. Li H, Terry MB, Antoniou AC, Phillips KA, Kast K, Mooij TM, *et al*. Alcohol Consumption, Cigarette Smoking, and Risk of Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers: Results from The BRCA1 and BRCA2 Cohort Consortium. Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol 2020;29(2):368- 78.

25. Jones ME, Schoemaker MJ, Wright LB, Ashworth A, Swerdlow AJ. Smoking and risk of breast cancer in the Generations Study cohort. Breast Cancer Res BCR 2017;19(1):118.

26. Nagykálnai T, Landherr L. Alcohol and breast cancer. A short survey. Magy Onkol 2018;62(1):68- 71.

27. Liaw YY, Loong FS, Tan S, On SY, Khaw E, Chiew Y, *et al*. A retrospective study on breast cancer presentation, risk factors, and protective factors in patients with a positive family history of breast cancer. Breast J 2020;26(3):469- 73.

28. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Type and timing of menopausal hormone therapy and breast cancer risk: individual participant meta-analysis of the worldwide epidemiological evidence. Lancet Lond Engl 2019;394(10204):1159- 68.

29. Gompel A. Hormones et cancers du sein. Presse Médicale 2019;48(10):1085- 91.

30. Pimentel F, Bonilla P, Ravishankar YG, Contag A, Gopal N, LaCour S, *et al*. Technology in MicroRNA Profiling: Circulating MicroRNAs as Noninvasive Cancer Biomarkers in Breast Cancer. J Lab Autom 2015;20(5):574- 88.

31. Bevers TB, Helvie M, Bonaccio E, Calhoun KE, Daly MB, Farrar WB, *et al*. Breast Cancer Screening and Diagnosis, Version 3.2018, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. J Natl Compr Cancer Netw JNCCN 2018;16(11):1362- 89.

32. Henderson JA, Duffee D, Ferguson T. Breast Examination Techniques. In: StatPearls. Treasure Island (FL) : StatPearls Publishing ; 2022: p.1-23.

33. Šašková P, Pavlišta D. Breast self-examination. Yes or no?. Ceska Gynekol. Winter 2016;81(6):463- 9.

34. Koc G, Gulen-Savas H, Ergol S, Yildirim-Cetinkaya M, Aydin N. Female university students' knowledge and practice of breast self-examination in Turkey. Niger J Clin Pract 2019;22(3):410- 5.

35. Klevos G, Ezuddin NS, Vinyard A, Ghaddar T, Gort T, Almuna A, *et al*. A Breast Cancer Review: Through the Eyes of the Doctor, Nurse, and Patient. J Radiol Nurs 2017;36(3):158- 65.

36. Théberge I, Chang SL, Vandal N, Daigle JM, Guertin MH, Pelletier E, *et al*. Radiologist interpretive volume and breast cancer screening accuracy in a Canadian organized screening program. J Natl Cancer Inst 2014;106(3):djt461.

37. Miglioretti DL, Lange J, van den Broek JJ, Lee CI, van Ravesteyn NT, Ritley D, *et al*. Radiation-Induced Breast Cancer Incidence and Mortality From Digital Mammography Screening: A Modeling Study. Ann Intern Med 2016;164(4):205- 14.

38. Gonssaud B, Goussot V, Berriolo-Riedinger A, Saïtta-Aribau E, Coutant C, Cochet A, *et al*. Clinical value of CA 15-3 for detection of distant metastases in newly diagnosed breast cancer. Ann Biol Clin (Paris) 2017;75(4):421- 9.

39. Hing JX, Mok CW, Tan PT, Sudhakar SS, Seah CM, Lee WP, *et al*. Clinical utility of tumour marker velocity of cancer antigen 15-3 (CA 15-3) and carcinoembryonic antigen (CEA) in breast cancer surveillance. Breast Edinb Scotl 2020;52:95- 101.

40. Choi JW, Moon BI, Lee JW, Kim HJ, Jin Y, Kim HJ. Use of CA15- 3 for screening breast cancer: An antibody- lectin sandwich assay for detecting glycosylation of CA15- 3 in sera. Oncol Rep 2018;40(1):145- 54.

41. Li J, Liu L, Feng Z, Wang X, Huang Y, Dai H, *et al*. Tumor markers CA15-3, CA125, CEA and breast cancer survival by molecular subtype: a cohort study. Breast Cancer Tokyo Jpn 2020;27(4):621- 30.

42. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, *et al*. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more « personalized » approach to cancer staging. CA Cancer J Clin 2017;67(2):93- 9.

43. Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, Solin LJ, *et al*. Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. CA Cancer J Clin 2017;67(4):290- 303.

44. Peila R, Arthur R, Rohan TE. Risk factors for ductal carcinoma in situ of the breast in the UK Biobank cohort study. Cancer Epidemiol 2020;64:101648.

45. Badve SS, Gökmen-Polar Y. Ductal carcinoma in situ of breast: update 2019. Pathology (Phila) 2019;51(6):563- 9.

46. Hong YK, McMasters KM, Egger ME, Ajkay N. Ductal carcinoma in situ current trends, controversies, and review of literature. Am J Surg 2018;216(5):998- 1003.

47. Wen HY, Brogi E. Lobular Carcinoma In Situ. Surg Pathol Clin 2018;11(1):123- 45.

48. Eliyatkın N, Yalçın E, Zengel B, Aktaş S, Vardar E. Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way. J Breast Health 2015;11(2):59- 66.

49. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. Histopathology 2002;41(3A):154- 61.

50. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ, *et al*. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol 2011;22(8):1736- 47.

51. Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment: A Review. JAMA 2019;321(3):288- 300.

52. Barzaman K, Karami J, Zarei Z, Hosseinzadeh A, Kazemi MH, Moradi-Kalbolandi S, *et al*. Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. Int Immunopharmacol 2020;84:106535.

53. Völker HU, Weigel M, Strehl A, Frey L. Levels of uPA and PAI-1 in breast cancer and its correlation to Ki67-index and results of a 21-multigene-array. Diagn Pathol 2018;13:67.

54. Mathelin C, Bruant-Rodier C. Les indications des reconstructions mammaires après mastectomie selon la situation carcinologique. Ann Chir Plast Esthét 2018;63(5):580- 4.

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

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

57. Lee A, Kim HY, Kim TH, Ahn KJ, Cho H, Park SK, *et al*. Hypofractionated Radiotherapy for Early-Stage Breast Cancer: A Propensity Score Matched Analysis. J Korean Med Sci 2022;37(8):e64.

58. Fisusi FA, Akala EO. Drug Combinations in Breast Cancer Therapy. Pharm Nanotechnol 2019;7(1):3- 23.

59. Clere N. Les traitements du cancer du sein. Actual Pharm 2016;55(558):20- 5.

60. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. Lancet Lond Engl 2005;365(9472):1687- 717.

61. Loibl S, Gianni L. HER2-positive breast cancer. The Lancet 2017;389(10087):2415- 29.

62. Veronesi U, Boyle P. Breast Cancer. In: Quah SR, éditeur. International Encyclopedia of Public Health (Second Edition). Oxford : Academic Press ; 2017, p. 272- 80.

63. Bardia A, Hurvitz SA, Tolaney SM, Loirat D, Punie K, Oliveira M, *et al*. Sacituzumab Govitecan in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. N Engl J Med 2021;384(16):1529- 41.

64. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell 1993;75(5):843- 54.

65. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans. Cell 1993;75(5):855- 62.

66. Flynt AS, Lai EC. Biological principles of microRNA-mediated regulation: shared themes amid diversity. Nat Rev Genet 2008;9(11):831- 42.

67. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, *et al*. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci 2002;99(24):15524- 9.

68. Alles J, Fehlmann T, Fischer U, Backes C, Galata V, Minet M, *et al*. An estimate of the total number of true human miRNAs. Nucleic Acids Res 2019;47(7):3353- 64.

69. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. Front Endocrinol 2018;9:402.

70. Michlewski G, Cáceres JF. Post-transcriptional control of miRNA biogenesis. RNA N Y N 2019;25(1):1- 16.

71. Wu K, He J, Pu W, Peng Y. The Role of Exportin-5 in MicroRNA Biogenesis and Cancer. Genomics Proteomics Bioinformatics 2018;16(2):120- 6.

72. Yamada Y, Koshizuka K, Hanazawa T, Kikkawa N, Okato A, Idichi T, *et al*. Passenger strand of miR-145-3p acts as a tumor-suppressor by targeting MYO1B in head and neck squamous cell carcinoma. Int J Oncol 2018;52(1):166- 78.

73. Chen X, Liang H, Zhang J, Zen K, Zhang CY. Horizontal transfer of microRNAs: molecular mechanisms and clinical applications. Protein Cell 2012;3(1):28- 37.

74. Adlakha YK, Seth P. The expanding horizon of MicroRNAs in cellular reprogramming. Prog Neurobiol 2017;148:21- 39.

75. Macfarlane LA, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. Curr Genomics 2010;11(7):537- 61.

76. Stavast CJ, Erkeland SJ. The Non-Canonical Aspects of MicroRNAs: Many Roads to Gene Regulation. Cells 2019;8(11).

77. Zendjabil M, Favard S, Tse C, Abbou O, Hainque B. Les microRNA comme biomarqueurs : quelles perspectives ? C R Biol 2017;340(2):114- 31.

78. Chong ZX, Yeap SK, Ho WY. Roles of circulating microRNA(s) in human breast cancer. Arch Biochem Biophys 2020;695:108583.

79. Saikia M, Paul S, Chakraborty S. Role of microRNA in forming breast carcinoma. Life Sci 2020;259:118256.

80. Wang H, Tan Z, Hu H, Liu H, Wu T, Zheng C, *et al*. microRNA-21 promotes breast cancer proliferation and metastasis by targeting LZTFL1. BMC Cancer 2019;19(1):738.

81. Wang Y, Zhang X, Chao Z, Kung HF, Lin MC, Dress A, *et al*. MiR-34a modulates ErbB2 in breast cancer. Cell Biol Int 2017;41(1):93- 101.

82. Khan AQ, Ahmed EI, Elareer NR, Junejo K, Steinhoff M, Uddin S. Role of miRNA-Regulated Cancer Stem Cells in the Pathogenesis of Human Malignancies. Cells 2019;8(8):E840.

83. Debré P, Ardaillou R, Galibert F. La biopsie liquide : alternative ou complément à la biopsie tissulaire ? Bull Académie Natl Médecine 2020;204(4):416- 20.

84. Keller A, Kreis S, Leidinger P, Maixner F, Ludwig N, Backes C, *et al*. miRNAs in Ancient Tissue Specimens of the Tyrolean Iceman. Mol Biol Evol 2017;34(4):793- 801.

85. Baudin B. Spectrométrie de masse et protéomique clinique. Ann Biol Clin (Paris) 2015;73(1):39- 48.

86. Adhami M, Haghdoost AA, Sadeghi B, Malekpour Afshar R. Candidate miRNAs in human breast cancer biomarkers: a systematic review. Breast Cancer 2018;25(2):198- 205.

87. Swellam M, Zahran RFK, Ghonem SA, Abdel-Malak C. Serum MiRNA-27a as potential diagnostic nucleic marker for breast cancer. Arch Physiol Biochem 2019;1- 7.

88. Zaleski M, Kobilay M, Schroeder L, Debald M, Semaan A, Hettwer K, *et al*. Improved sensitivity for detection of breast cancer by combination of miR-34a and tumor markers CA 15-3 or CEA. Oncotarget 2018;9(32):22523- 36.

89. Jafri L, Abid MA, Rehman J, Ahmed S, Abbas G, Ali H, *et al*. Development of a virtual classroom for pre-analytical phase of laboratory medicine for undergraduate medical students using the Delphi technique. PloS One 2022;17(4):e0264447.

90. Foye C, Yan IK, David W, Shukla N, Habboush Y, Chase L, *et al*. Comparison of miRNA quantitation by Nanostring in serum and plasma samples. PloS One 2017;12(12):e0189165.

91. Mompeón A, Ortega-Paz L, Vidal-Gómez X, Costa TJ, Pérez-Cremades D, Garcia-Blas S, *et al*. Disparate miRNA expression in serum and plasma of patients with acute myocardial infarction: a systematic and paired comparative analysis. Sci Rep 2020;10(1):5373.

92. Dufourd T, Robil N, Mallet D, Carcenac C, Boulet S, Brishoual S, *et al*. Plasma or serum? A qualitative study on rodents and humans using high-throughput microRNA sequencing for circulating biomarkers. Biol Methods Protoc 2019;4(1):bpz006.

93. Glinge C, Clauss S, Boddum K, Jabbari R, Jabbari J, Risgaard B, *et al*. Stability of Circulating Blood-Based MicroRNAs - Pre-Analytic Methodological Considerations. PloS One 2017;12(2):e0167969.

94. Mitchell AJ, Gray WD, Hayek SS, Ko YA, Thomas S, Rooney K, *et al*. Platelets confound the measurement of extracellular miRNA in archived plasma. Sci Rep 2016;6:32651.

95. Binderup HG, Houlind K, Madsen JS, Brasen CL. Pre-storage centrifugation conditions have significant impact on measured microRNA levels in biobanked EDTA plasma samples. Biochem Biophys Rep 2016;7:195- 200.

96. Myklebust MP, Rosenlund B, Gjengstø P, Bercea BS, Karlsdottir Á, Brydøy M, *et al*. Quantitative PCR Measurement of miR-371a-3p and miR-372-p Is Influenced by Hemolysis. Front Genet 2019;10:463.

97. Khan J, Lieberman JA, Lockwood CM. Variability in, variability out: best practice recommendations to standardize pre-analytical variables in the detection of circulating and tissue microRNAs. Clin Chem Lab Med 2017;55(5):608- 21.

98. Grasedieck S, Schöler N, Bommer M, Niess JH, Tumani H, Rouhi A, *et al*. Impact of serum storage conditions on microRNA stability. Leukemia 2012;26(11):2414- 6.

99. Kim YK, Yeo J, Kim B, Ha M, Kim VN. Short structured RNAs with low GC content are selectively lost during extraction from a small number of cells. Mol Cell 2012;46(6):893- 5.

100. Choi C, Yoon S, Moon H, Bae YU, Kim CB, Diskul-Na-Ayudthaya P, *et al*. mirRICH, a simple method to enrich the small RNA fraction from over-dried RNA pellets. RNA Biol 2018;15(6):763- 72.

101. Lu TX, Rothenberg ME. MicroRNA. J Allergy Clin Immunol 2018;141(4):1202- 7.

102. Várallyay E, Burgyán J, Havelda Z. MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes. Nat Protoc 2008;3(2):190- 6.

103. Chandrasekaran AR, Punnoose JA, Zhou L, Dey P, Dey BK, Halvorsen K. DNA nanotechnology approaches for microRNA detection and diagnosis. Nucleic Acids Res. 2019;47(20):10489- 505.

104. Kappel A, Keller A. miRNA assays in the clinical laboratory: workflow, detection technologies and automation aspects. Clin Chem Lab Med 2017;55(5):636- 47.

105. Dellett M, Simpson DA. Considerations for optimization of microRNA PCR assays for molecular diagnosis. Expert Rev Mol Diagn 2016;16(4):407- 14.

106. Benes V, Castoldi M. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. Methods San Diego Calif 2010;50(4):244- 9.

107. Denis JA, Nectoux J, Lamy PJ, Rouillac Le Sciellour C, Guermouche H, Alary AS, *et al*. Development of digital PCR molecular tests for clinical practice: principles, practical implementation and recommendations. Ann Biol Clin (Paris) 2018;76(5):505- 23.

108. Ouyang T, Liu Z, Han Z, Ge Q. MicroRNA Detection Specificity: Recent Advances and Future Perspective. Anal Chem 2019;91(5):3179- 86.

109. Ferracin M, Negrini M. Quantification of Circulating MicroRNAs by Droplet Digital PCR. Methods Mol Biol Clifton NJ 2018;1768:445- 57.

110. Ye J, Xu M, Tian X, Cai S, Zeng S. Research advances in the detection of miRNA. J Pharm Anal 2019;9(4):217- 26.

111. Liu P. MicroRNA Expression Analysis: Next-Generation Sequencing. Methods Mol Biol Clifton NJ 2018;1783:171- 83.

112. Gao L, Jiang F. MicroRNA (miRNA) Profiling. Methods Mol Biol Clifton NJ 2016;1381:151- 61.

113. Faraldi M, Gomarasca M, Sansoni V, Perego S, Banfi G, Lombardi G. Normalization strategies differently affect circulating miRNA profile associated with the training status. Sci Rep 2019;9(1):1584.

114. Kloten V, Neumann MHD, Di Pasquale F, Sprenger-Haussels M, Shaffer JM, Schlumpberger M, *et al*. Multicenter Evaluation of Circulating Plasma MicroRNA Extraction Technologies for the Development of Clinically Feasible Reverse Transcription Quantitative PCR and Next-Generation Sequencing Analytical Work Flows. Clin Chem 2019;65(9):1132- 40.

115. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. JAMA 2013;310(20):2191- 4.

116. Amin MB, Edge SB, Greene FL, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, Meyer L, *et al*. AJCC Cancer Staging Manual 8th Ed. New York : Springer 2017. CA Cancer J Clin 2017;67:93-99.

117. Pinder SE, Murray S, Ellis IO, Trihia H, Elston CW, Gelber RD, *et al*. The importance of the histologic grade of invasive breast carcinoma and response to chemotherapy. Cancer 1998;83(8):1529- 39.

118. Kirschner MB, Kao SC, Edelman JJ, Armstrong NJ, Vallely MP, van Zandwijk N, *et al*. Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma. PloS One 2011;6(9):e24145.

119. Matamala N, Vargas MT, González-Cámpora R, Miñambres R, Arias JI, Menéndez P, *et al*. Tumor microRNA expression profiling identifies circulating microRNAs for early breast cancer detection. Clin Chem 2015;61(8):1098- 106.

120. Amirfallah A, Knutsdottir H, Arason A, Hilmarsdottir B, Johannsson OT, Agnarsson BA, *et al*. Hsa-miR-21-3p associates with breast cancer patient survival and targets genes in tumor suppressive pathways. PloS One 2021;16(11):e0260327.

121. Gao XH, Zhang YL, Zhang ZY, Guo SS, Chen XB, Guo YZ. MicroRNA-96-5p represses breast cancer proliferation and invasion through Wnt/β-catenin signaling via targeting CTNND1. Sci Rep 2020;10(1):44.

122. Grimaldi AM, Nuzzo S, Condorelli G, Salvatore M, Incoronato M. Prognostic and Clinicopathological Significance of MiR-155 in Breast Cancer: A Systematic Review. Int J Mol Sci 2020;21(16):E5834.

123. Zhang W, Chen CJ, Guo GL. MiR-155 promotes the proliferation and migration of breast cancer cells via targeting SOCS1 and MMP16. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2018;22(21):7323- 32.

124. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, *et al*. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. Nucleic Acids Res 2005;33(20):e179.

125. Holubekova V, Kolkova Z, Grendar M, Brany D, Dvorska D, Stastny I, *et al*. Pathway Analysis of Selected Circulating miRNAs in Plasma of Breast Cancer Patients: A Preliminary Study. Int J Mol Sci 2020;21(19):E7288.

126. Itani MM, Nassar FJ, Tfayli AH, Talhouk RS, Chamandi GK, Itani ARS, *et al*. A Signature of Four Circulating microRNAs as Potential Biomarkers for Diagnosing Early-Stage Breast Cancer. Int J Mol Sci 2021;22(11):6121.

127. McDermott AM, Kerin MJ, Miller N. Identification and validation of miRNAs as endogenous controls for RQ-PCR in blood specimens for breast cancer studies. PloS One 2013;8(12):e83718.

128. Saleh AA, Soliman SE, Habib MSED, Gohar SF, Abo-Zeid GS. Potential value of circulatory microRNA122 gene expression as a prognostic and metastatic prediction marker for breast cancer. Mol Biol Rep 2019;46(3):2809- 18.

129. Hajian-Tilaki K. The choice of methods in determining the optimal cut-off value for quantitative diagnostic test evaluation. Stat Methods Med Res 2018;27(8):2374- 83.

130. Kern F, Aparicio-Puerta E, Li Y, Fehlmann T, Kehl T, Wagner V, *et al*. miRTargetLink 2.0—interactive miRNA target gene and target pathway networks. Nucleic Acids Res 2021;49(W1):W409- 16.

131. Guo Q, Hua Y. The assessment of circulating cell-free DNA as a diagnostic tool for breast cancer: an updated systematic review and meta-analysis of quantitative and qualitative ssays. Clin Chem Lab Med 2021;59(9):1479- 500.

132. Mann RM, Hooley R, Barr RG, Moy L. Novel Approaches to Screening for Breast Cancer. Radiology 2020;297(2):266- 85.

133. El Hachem Z, Zoghbi M, Hallit S. Psychosocial consequences of false-positive results in screening mammography. J Fam Med Prim Care 2019;8(2):419- 25.

134. Ho PJ, Bok CM, Ishak HMM, Lim LY, Liu J, Wong FY, *et al*. Factors associated with false-positive mammography at first screen in an Asian population. PloS One 2019;14(3):e0213615.

135. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. Clin Pharmacol Ther 2001;69(3):89- 95.

136. Lippi G, Mattiuzzi C. The biomarker paradigm: between diagnostic efficiency and clinical efficacy. Pol Arch Med Wewn. 2015;125(4):282- 8.

137. Pinzani P, D'Argenio V, Del Re M, Pellegrini C, Cucchiara F, Salvianti F, *et al*. Updates on liquid biopsy: current trends and future perspectives for clinical application in solid tumors. Clin Chem Lab Med 2021;59(7):1181- 200.

138. Mayes C, Houston R, Seashols-Williams S, LaRue B, Hughes-Stamm S. The stability and persistence of blood and semen mRNA and miRNA targets for body fluid identification in environmentally challenged and laundered samples. Leg Med Tokyo Jpn 2019;38:45- 50.

139. Li Z, Chen D, Wang Q, Tian H, Tan M, Peng D, *et al*. mRNA and microRNA stability validation of blood samples under different environmental conditions. Forensic Sci Int Genet 2021;55:102567.

140. Bouaziz H, Nouicer A, Boussouf N. Profil épidémiologique et pathologique du cancer du sein chez la femme Sud-Algérienne (2015-2019). Rev d'Épidémiologie Santé Publique 2021;69:S50- 1.

141. Lagacé F, Ghazawi FM, Le M, Rahme E, Savin E, Zubarev A, *et al*. Analysis of incidence, mortality trends, and geographic distribution of breast cancer patients in Canada. Breast Cancer Res Treat 2019;178(3):683- 91.

142. Bautista-Sánchez D, Arriaga-Canon C, Pedroza-Torres A, De La Rosa-Velázquez IA, González-Barrios R, Contreras-Espinosa L, *et al*. The promising role of miR-21 as a cancer biomarker and its importance in RNA-based therapeutics. Molecular Therapy Nucleic Acids. 2020;5(20):409-20.

143. Yin Z, Wang W, Qu G, Wang L, Wang X, Pan Q. MiRNA-96-5p impacts the progression of breast cancer through targeting FOXO3. Thorac Cancer 2020;11(4):956- 63.

144. Jiramongkol Y, Lam EWF. FOXO transcription factor family in cancer and metastasis. Cancer Metastasis Rev 2020;39(3):681- 709.

145. Qin W yan, Feng S chun, Sun Y qiang, Jiang G qin. MiR-96-5p promotes breast cancer migration by activating MEK/ERK signaling. J Gene Med 2020;22(8):e3188.

146. Liu JH, Yang Y, Song Q, Li JB. MicroRNA-155regulates the proliferation and metastasis of human breast cancers by targeting MAPK7. J BUON Off J Balk Union Oncol 2019;24(3):1075- 80.

147. Aksan H, Kundaktepe BP, Sayili U, Velidedeoglu M, Simsek G, Koksal S, *et al*. Circulating miR-155, let-7c, miR-21, and PTEN levels in differential diagnosis and prognosis of idiopathic granulomatous mastitis and breast cancer. BioFactors Oxf Engl 2020;46(6):955- 62.

148. Han JG, Jiang YD, Zhang CH, Yang YM, Pang D, Song YN, *et al*. A novel panel of serum miR-21/miR-155/miR-365 as a potential diagnostic biomarker for breast cancer. Ann Surg Treat Res 2017;92(2):55- 66.

149. Raghu A, Magendhra Rao AKD, Rajkumar T, Mani S. Prognostic Implications of microRNA-155, -133a, -21 and -205 in Breast Cancer Patients' Plasma. MicroRNA Shariqah United Arab Emir 2021;10(3):206- 18.

150. Zhang K, Wang YW, Wang YY, Song Y, Zhu J, Si PC, *et al*. Identification of microRNA biomarkers in the blood of breast cancer patients based on microRNA profiling. Gene 2017;619:10- 20.

151. Nassar FJ, Talhouk R, Zgheib NK, Tfayli A, El Sabban M, El Saghir NS, *et al*. microRNA Expression in Ethnic Specific Early Stage Breast Cancer: an Integration and Comparative Analysis. Sci Rep 2017;7(1):16829.

152. Tfaily MA, Nassar F, Sellam LS, Amir-Tidadini ZC, Asselah F, Bourouba M, *et al*. miRNA expression in advanced Algerian breast cancer tissues. PloS One 2020;15(2):e0227928.

153. Donati S, Ciuffi S, Brandi ML. Human Circulating miRNAs Real-time qRT-PCR-based Analysis: An Overview of Endogenous Reference Genes Used for Data Normalization. Int J Mol Sci 2019;20(18):E4353.

154. Stückrath I, Rack B, Janni W, Jäger B, Pantel K, Schwarzenbach H. Aberrant plasma levels of circulating miR-16, miR-107, miR-130a and miR-146a are associated with lymph node metastasis and receptor status of breast cancer patients. Oncotarget 2015;6(15):13387- 401.

155. Yan C, Chen Y, Kong W, Fu L, Liu Y, Yao Q, *et al*. PVT1-derived miR-1207-5p promotes breast cancer cell growth by targeting STAT6. Cancer Sci 2017;108(5):868- 76.

156. Peña-Chilet M, Martínez MT, Pérez-Fidalgo JA, Peiró-Chova L, Oltra SS, Tormo E, *et al*. MicroRNA profile in very young women with breast cancer. BMC Cancer 2014;14:529.

157. Shin VY, Siu JM, Cheuk I, Ng EKO, Kwong A. Circulating cell-free miRNAs as biomarker for triple-negative breast cancer. Br J Cancer 2015;112(11):1751- 9.

158. Hu Z, Dong J, Wang LE, Ma H, Liu J, Zhao Y, *et al*. Serum microRNA profiling and breast cancer risk: the use of miR-484/191 as endogenous controls. Carcinogenesis 2012;33(4):828- 34.

159. Rinnerthaler G, Hackl H, Gampenrieder SP, Hamacher F, Hufnagl C, Hauser-Kronberger C, *et al*. miR-16-5p Is a Stably-Expressed Housekeeping MicroRNA in Breast Cancer Tissues from Primary Tumors and from Metastatic Sites. Int J Mol Sci 2016;17(2):E156.

160. Swellam M, El Magdoub HM, Hassan NM, Hefny MM, Sobeih ME. Potential diagnostic role of circulating MiRNAs in breast cancer: Implications on clinicopathological characters. Clin Biochem 2018;56:47- 54.

161. El-Shafae M, Behiry EG, Abd El-latif ME, Ahmed ES, El-Fallah AA. Clinical value of serum microRNA-195 expression in invasive ductal carcinoma of the breast. Gene Rep 2020;19:100635.

162. Benz F, Roderburg C, Vargas Cardenas D, Vucur M, Gautheron J, Koch A, *et al*. U6 is unsuitable for normalization of serum miRNA levels in patients with sepsis or liver fibrosis. Exp Mol Med 2013;45:e42.

163. Xiang M, Zeng Y, Yang R, Xu H, Chen Z, Zhong J, *et al*. U6 is not a suitable endogenous control for the quantification of circulating microRNAs. Biochem Biophys Res Commun 2014;454(1):210- 4.

164. Elghoroury EA, ElDine HG, Kamel SA, Abdelrahman AH, Mohammed A, Kamel MM, *et al*. Evaluation of miRNA-21 and miRNA Let-7 as Prognostic Markers in Patients With Breast Cancer. Clin Breast Cancer 2018;18(4):e721- 6.

165. Xie W, Sun F, Chen L, Cao X. miR-96 promotes breast cancer metastasis by suppressing MTSS1. Oncol Lett 2018;15(3):3464- 71.

166. Canatan D, Sönmez Y, Yılmaz Ö, Çim A, Coşkun HŞ, Sezgin Göksu S, *et al*. MicroRNAs as biomarkers for breast cancer. Acta Bio-Medica Atenei Parm 2021;92(2):e2021028.

167. Jang MH, Kim HJ, Gwak JM, Chung YR, Park SY. Prognostic value of microRNA-9 and microRNA-155 expression in triple-negative breast cancer. Hum Pathol 2017;68:69- 78.

168. Gwak JM, Kim HJ, Kim EJ, Chung YR, Yun S, Seo AN, *et al*. MicroRNA-9 is associated with epithelial-mesenchymal transition, breast cancer stem cell

phenotype, and tumor progression in breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2014;147(1):39- 49.

169. Riedinger JM. Intérêt des marqueurs tumoraux : quelle place pour l'ACE et le CA 15-3 ? Médecine Nucl 2010;34(1):44- 51.

170. Maccio G, Goussot V, Berriolo-Riedinger A, Riedinger JM. Clinical value of CEA for detection of distant metastases in newly diagnosed breast cancer: comparison with CA 15-3. Ann Biol Clin (Paris) 2017;75(4):431- 41.