

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des frères Mentouri Constantine
Faculté des Science de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale



Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie Animale

Spécialité : Génétique Moléculaire

Intitulé :

**Étude du polymorphisme de la méthylène tétrahydrofolate réductase
(MTHFR) associé au cancer du rein**

Présenté par : CHERMAT NARIMEN

Le : 01/07/2015

TERRAI IRCHED.

Jury d'évaluation :

Président du jury : *Satta Dalila* (Professeur - Université des frères Mentouri Constantine).

Rapporteur : *Rezgoune-Chellat Djalila* (MC.B - Université des frères Mentouri Constantine).

Examineurs : *Semmame Ouarda* (MA.A - Université des frères Mentouri Constantine),

Année universitaire

2014-2015

Remerciement

Tout d'abord, nous remercions **le dieu**, notre créateur de nous avoir donné les forces ,la volonté et le courage afin d'accomplir ce travail modeste.

Nous adressons le grand remerciement a notre encadreur **Mme rezgoune-Chellat Djalila** ui a proposé le thème de ce mémoire ,pour ses conseils et ses dirigés de début a la fin de ce travail.

Nous tenons a remercier sincèrement le professeur **Dr.satta** pour sa générosité et la grande patience dont elle à se faire preuve malgré ses charges professionnelles .

Nous tenons également a remercier **les membres de jury** pour l'honneur qu'il nous ont fait en acceptant de siéger à notre soutenance.

Pour finir nous adressons nos remerciements a nos **enseignants**, à **l'université constantine 1**,et a tout ceux qui a contribué de près ou de loin a la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie mon mémoire a mes parent qui sont les plus chères au monde qui me comblent de leur amour, leur affection et soutiens.

A mon marie AZIZ qui été toujours a mes coté avec sa patience.

A ma belle mère qui m'a beaucoup encourager.

A ma sœur Rayene et mes frère Ramy et Ahmed.

A ma belle sœur et mes beaux frères.

A ma grande mère et mon grand père.

A mon binôme irched.

A la fin je dédie mon mémoire a mon précieux cadeau ma petite Miral.

Narimen

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail a mon très cher papa : « Mohamed Cherif » qui m'a toujours encouragées et rien au monde ne vaut les efforts fournis jours et nuit pour mon éducation et mon bien être .

A ma très cher maman : aucune dédicace peut exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu m'a cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et a l'âge de l'adulte.

A mon très cher marie Fouad qui m'a toujours aider et a mon fils Mohammed rassim : avec mes meilleurs vœux de santé et bonheur.

A mon très cher frère Salah : que je le souhaite la réussite dans ces études .

A mes chers sœurs Imene et Doha Woudjdanne je vous dédie ce travail avec mes vœux de bonheur , réussite santé

A mon binome chermat narimen qui vraiment fournit d'énergie pour la réalisation de ce travaille

IRCHED

Liste des abréviations

- ADN** : Acide Désoxyribo-Nucléique.
- AKT** : Anti-Récepteur Tyrosine kinase.
- 4EBP1**: 4^E Binding Protein 1.
- BBP**: Bleu de Bromophénol.
- BET**: Bromor d'Ethidium.
- BHD**: Birt- Hogg-Dubé.
- CCR**: Carcinome à Cellules Rénales.
- Cul-2**: Culine2.
- DO**: Densité Optique.
- EDTA**: Acid Ethylene Diamine Tétracétique.
- EGFR**: Endothelial Growth Factor receptor.
- EIF4E**: Eucaryotic Franslation Initiation Factor 4E.
- EIF3**: Eucaryotic Initiation Factor 3.
- HGF**: Hépatocyte Growth Factor.
- HIF**: Hypoxia Inducible Factor.
- HLRCC**: Léiomyomatose Hériditaire et Carcinome à Cellule Rénales.
- HPRC**: Carcinome Papillaire à Cellule Rénales Hériditaire.
- IGF2**: Insulin Growth Factor 2.
- IRM** : Imagerie par Résonance Magnétique.
- MAPK**: Mitogen- Activated Protein kinas.
- MLST8/GBL**: Mammalian Lethal sec-13.
- MTHFR**: 5,10 Méthylène Tetra-hydrofolat Réductase.
- mTOR**: Serine-Thréonine kinase.
- RNA**: Acid Ribo-Nucléique
- P13K**: Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase.
- PCR**: Polymerases Chain Reaction.
- PDK**: Phosphatidyl-inositol-3-Dependant Kinase1.
- PHD** : Prolil Hydroxilase.
- PIP3**: Phosphatidy-lInositol-3-Phosphate.
- Raptor** : Regulatory-Associated-Protein of mTOR .

Rheb : Ras homolog Enriched in Brain.

SDS: Sodume Dodécyle Sulfate.

SNC: Système Nerveux Central.

TE: Tris EDTA.

TDM: Tomodensitométrie.

TGF- : Transforming Growth factor-

UV: Ultraviolet.

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor.

VHL: Von Hippel-Lindau.

Table des matières

	Page
Introduction	01
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	
Chapitre 1 : Anatomie et physiologie du rein	
I. Anatomie du rein	02
1. Situation.....	02
2. Forme et orientation.....	02
3. Dimension et poids.....	03
4. Couleur et consistance.....	03
II. Physiologie du rein	04
1. Unité fonctionnelle du rein.....	04
1.1 Structure des néphrons	05
Chapitre 2 : Cancer du rein	
I. Epidémiologie	07
II. Causes et facteurs de risque	08
1. Facteurs de risque liés au patient.....	08
1.1 Facteurs génétiques	08
1.2 L'hypertension artérielle	09
1.3 Obésité	09
1.4 Diabète	09
2. Facteurs hormonaux.....	09
3. Facteurs environnementaux.....	09
3.1 Tabagisme.....	09
3.2 Exposition professionnelle.....	09
3.3 Alimentation.....	09
3.4 Alcoolisme	10

III. Classification histologique des tumeurs rénales.....	10
1. Grades de Fuhrman.....	10
2. Tumeurs bénignes du rein.....	11
2.1 Adénome rénal.....	11
2.2 Oncocytome.....	11
2.3 Angiomyolipome.....	12
2.4 Tumeurs bénignes rares.....	12
3. Tumeurs malignes du rein.....	12
3.1 Carcinome à cellules.....	12
3.2 Tumeurs malignes rares.....	13

Chapitre 3 : Aspect génétique du cancer du rein

I. Oncogénèse.....	15
II. Prédispositions héréditaires.....	15
1. La maladie de Von-Hippel-Lindau (VHL)	15
2. Cancer papillaire héréditaire (HPRC).....	16
3. Léiomyomatose héréditaire à la tumeur rénale (HLRCC).....	16
4. Syndrome de Birt-Hogg-Dubé (BHD)	16
III. Le VEGF dans le cancer du rein.....	17
IV. Implication de la voie VHL/HIF dans le microenvironnement tumoral et la réponse immunitaire.....	17
V. L'angiogénèse.....	17
1. Angiogénèse physiologique.....	17
2. Angiogénèse tumorale	18
VI. Voies de l'EGF et des MAP-kinases.....	18
VII. La protéine Mtor.....	19
VIII. Voie de signalisation PI3K/Akt/Mtor.....	19
IX. La MTHFR	19
1. La structure de la MTHFR	19
2. La localisation de gène de la MTHFR	20
3. La fonction de MTHFR.....	20

4. Polymorphisme du gène <i>MTHFR</i>	20
9.4.1 Polymorphisme C677T du gène <i>MTHFR</i>	20
9.5 La relation entre la <i>MTHFR</i> et le cancer de rein	21
X. Le conseil génétique.....	21

Chapitre 5 : Diagnostique et traitement

I. Détection précoce.....	22
II. Diagnostic.....	22
III. Traitement du cancer du rein.....	23

Partie pratique

1. Type d'étude.....	24
2. Population étudiée.....	24
2.1 La population malade.....	24
2.1.1 Critères d'inclusion.....	24
2.1.2 Critères d'exclusion.....	24
2.2 La population témoin.....	24
2.2.1 Critères d'inclusion.....	24
2.2.2 Critères d'exclusion.....	24
3. Méthodes	
3.1 Questionnaire	24
3.2 Prélèvement sanguin	24
3.3 Extraction d'ADN.....	25
3.4 Détermination de la pureté d'ADN	25
3.5 Amplification par PCR.....	26
3.5.1 Préparation du mélange réactionnel (Mix).....	26
3.5.2 Déroulement des cycles de la PCR.....	27
3.5.3 Le control des produits de PCR.....	27
4. Digestion des produits de PCR.....	28

4.1 Electrophorèse des produits de digestion.....	29
---	----

Résultats

1. Répartition des patients selon le sexe.....	31
2. Répartition des patients en fonction d'âge	31
3. Répartition des patients selon la présence d'antécédents familiaux.....	32
4. Répartition des patients selon la consommation d'alcool.....	32
	33
5. Répartition des patients selon la consommation du tabac	33
6. Répartition des patients selon la cause du cancer.....	
7. Répartition des fréquences chez les patients et les témoins.....	35
8. Répartition des fréquences alléliques chez les patients et les témoins.....	35
Discussion.....	36
Conclusion et perspectives.....	39
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumés	

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
Figure 1. L'appareille urinaire.....	2
Figure 2. Unecoupe du rein.....	4
Figure 3. Le néphron.....	6
Figure 4. Cancer du rein.....	7
Figure 5. Stades du cancer du rein.....	11
Figure 6. Mutation germinale du gène MET.....	16
Figure 7. Les deux étapes de l'angiogénèse.....	18
Figure 8. La protéine mTOR	19
Figure 9. La localisation de gène de la MTHFR.....	20
Figure10 Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% des fragments amplifiés	28
Figure11. site de restriction par l'enzyme HINF1.....	29
Figure12. Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments après digestion par HinfI	29
Figure 13. Répartition des patients selon sexe.....	29
Figure14. Répartition des patients selon l'age.....	31
Figure15. Répartition des patients selon la présence d'antécédents familiaux.....	31
Figure16. Répartition des patients selon la consommation d'alcool.....	32
Figure17. Répartition des patients selon la consommation du tabac.....	32
Figure18. Répartition des patients selon la cause de la maladie.....	33
Figure19. Répartition des fréquences génotypiques chez les patients et les témoins	33
Figure20. Répartition des fréquences alléliques chez les patients et les témoins	35
	35

LISTE DES TABLEAUX

	Titre	Page
Tableau 1 :	Grade de fuhrman.....	10
Tableau 2 :	Préparation du mélange réactionnel de PCR pour MTHFR	26
Tableau 3 :	Programmation des cycles de PCR.....	27
Tableau 4 :	Préparation du milieu de digestion par l'enzyme HinfI	29
Tableau 5 :	Répartition des fréquences génotypique et allélique, et association au risque du cancer du rein.....	34

Introduction

Notre organisme est un ensemble d'organes, chacun fonctionne selon un mécanisme bien défini. Parmi ces organes notre choix s'est porté sur l'organe de filtration du sang « les reins ». Ils jouent un rôle très important comparable à celui d'une usine d'épuration filtrant les eaux usées d'une ville, en plus ils régulent le volume et la composition du sang. Toute modification ou altération au niveau de ce système va conduire à un déséquilibre dans tout l'organisme. Cette affection est due à une prolifération cellulaire anormalement importante au sein d'un tissu normal de l'organisme. Ce que l'on sait sur les causes de cette maladie provient de l'étude de l'évolution du cancer dans les populations humaines, et par les expériences appliquées sur l'animal de laboratoire traités par des agents cancérigènes comme l'amiante, les aflatoxines, les rayons UV, en plus elle est associée à des infections chroniques et due à des virus, des bactéries, au mode de vie comme l'alimentation et l'activité physique. La prédisposition génétique joue aussi un rôle important dans le développement du cancer.

Chaque jour le nombre de mortalités par cancer est en augmentation continue, et on remarque que le taux de mortalité par cancer de rein est très peu par rapport aux autres ce qui a attiré notre attention, et nous a poussé à faire cette étude.

Cette pathologie est l'une des cancers les plus rares, c'est le 3^{ième} cancer de l'appareil urogénital qui peut se développer à partir des cellules rénales. Il frappe à bat bruit « une maladie silencieuses » et il est lié à plusieurs facteurs de risque.

Les objectifs de cette étude sont :

- Déterminer les causes fondamentales et les facteurs de risque du cancer de rein à travers une étude bibliographique.
- Rechercher d'éventuelles associations entre le polymorphisme C677T du gène *MTHFR* et le cancer du rein.

Partie Théorique

L'appareil urinaire comprend les organes qui produisent l'urine, les reins, et ceux par lesquels l'urine est acheminée des reins vers l'extérieur pour être éliminée [1].

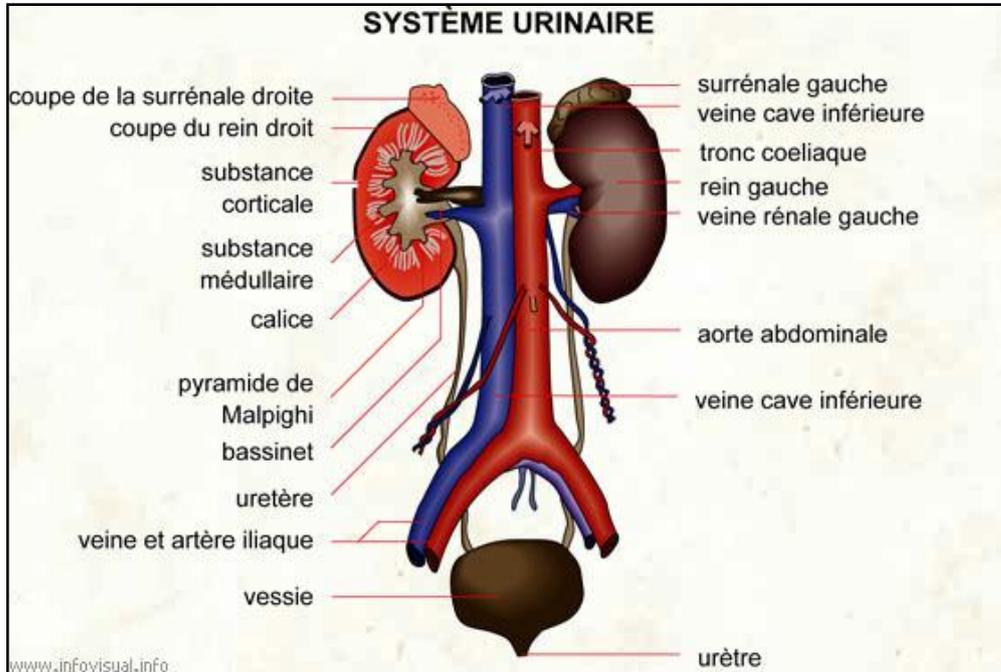


Figure 01 : L'appareil urinaire. <http://www.ikonet.com>.

I. ANATOMIE DU REIN

1. Situation

Les reins sont appliqués sur la paroi abdominale postérieure, en arrière du péritoine, l'un à droite, l'autre à gauche de la colonne vertébrale [2].

2. Forme et orientation

Leur forme est comparable à celle d'un haricot. Ces organes sont allongés de haut en bas, aplatis d'avant en arrière, et leur bord concave regarde en dedans. On distingue à chaque rein : deux faces convexes, l'une antérieure, l'autre postérieure ; deux bord l'un externe, convexe, l'autre interne, échancré à sa partie moyenne, qui répond au hile de l'organe ; enfin deux extrémités ou pôles, l'une supérieure, l'autre inférieure. Le grand axe de chaque rein n'est pas exactement verticale ; il est un peu incliné de haut en bas et dedans en dehors de telle manière que l'extrémité supérieure du bord interne du reins est à 3 ou 4 centimètre de la ligne médiane, tandis que son extrémité inférieure est à 5 ou 6 centimètre de cette ligne. De

plus, les reins ne sont pas dans un plan frontal, c'est-à-dire que leur aplatissement n'est pas directement antéropostérieure. En effet, leur face antérieure regarde en avant et en dehors, et leur face postérieure regarde en arrière et en dedans [2].

3. Dimension et poids

Le rein mesure en moyenne 12 centimètre de longueur, 6 centimètre de largeur, 3 centimètre d'épaisseur. Il paise environ 140 grammes chez l'homme et 125 gramme chez la femme [2].

4. Couleur et consistance

Le rein est d'une couleur rouge brun ; sa consistance est ferme et son parenchyme est assez résistant. Chaque rein est entouré :

- d'une couche de tissu fibreux appelé « capsule rénale »
- D'une couche de tissu graisseux qui maintient les reins en place contre le muscle situé a l'arrière de l'abdomen.
- D'un tissu fin et fibreux qui recouvre l'extérieure de la couche graisseuse et qui appelé « fascia de gé rota ».

Le cortex est le tissu situé juste en dessous de la capsule rénale, la médulle (zone médullaire) est la partie interne du rein. Le bassinnet du rein est une cavité collectrice situé au centre de chaque rein. L'artère rénale amène le sang, et la veine rénale ramène le sang au corps une fois qu'il a passera travers le rein, la région ou l'artère rénale, la veine rénale ou l'urètre entrent dans le rein appelé le hile rénale. A l'intérieure de chaque rein se trouve un réseau de million de petits tubes appelée « néphrons » [2].

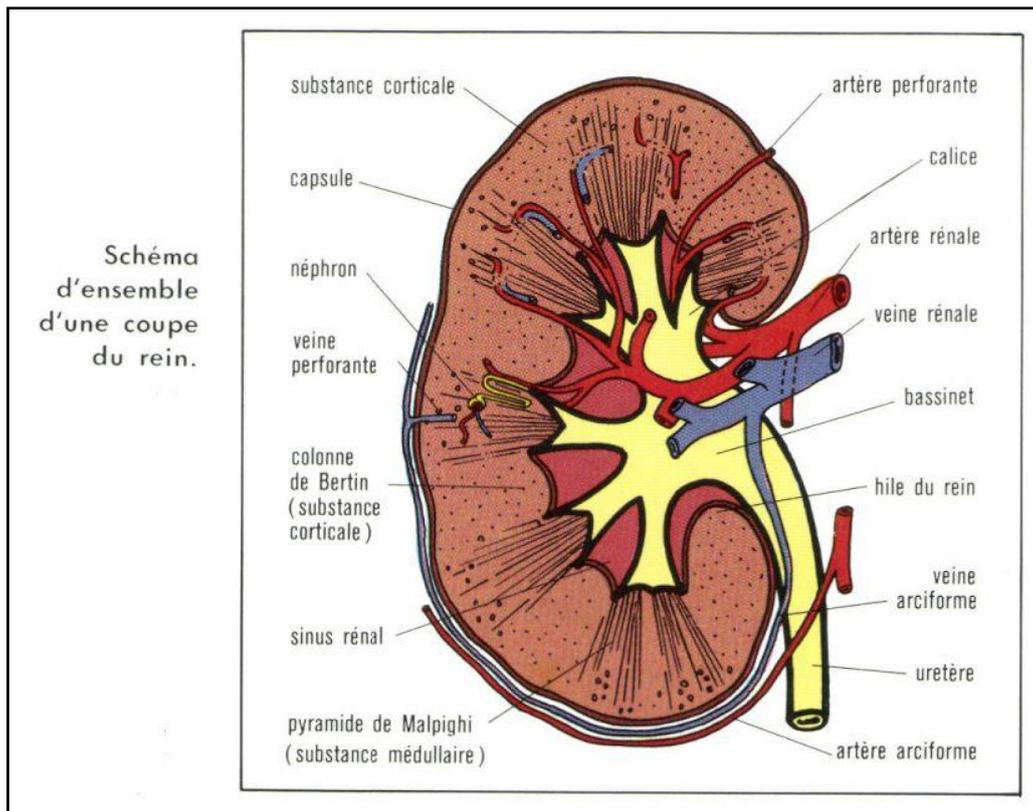


Figure 02: Une coupe du rein. <http://www.ikonet.com>.

II. PHYSIOLOGIE DU REIN

L'appareil urinaire contribue à l'homéostasie en participant à la régulation du volume, du contenu en électrolytes et du PH du milieu intérieur et en éliminant des déchets du métabolisme. C'est en faisant varier la quantité d'eau et de différents constituants du plasma éliminés dans l'urine ou retenus dans l'organisme que les reins maintiennent l'équilibre hydro électrolytique dans les reins étroites limites compatibles avec la vie, et ceci en dépit d'apport et de pertes très variables par d'autres voies. Les reins ne sont pas seulement capables de compenser les grandes variations de l'ingestion d'eau, de sel et d'autres électrolytes, ils sont aussi en mesure d'en ajuster l'élimination dans l'urine à leurs pertes anormales par la sueur, les vomissements, la diarrhée ou l'hémorragie. Du fait de l'action homéostatique des reins, la composition de l'urine est donc très variable. Quand il y a excès d'eau ou d'électrolytes comme le sel (NaCl) dans le LEC, les reins sont capables d'éliminer le surplus correspondant dans l'urine. Quand il y a déficit. Les reins ne peuvent pas évidemment le combler par l'apport du constituant manquant, mais ils peuvent en limiter la perte dans l'urine de façon à le conserver jusqu'à ce qu'il soit ingéré en quantité suffisante. Ainsi les reins compensent plus facilement un excédent qu'un déficit, d'autant plus qu'ils ne peuvent pas arrêter l'élimination

dans l'urine de toutes les substances utiles même fortement déficitaires. De plus les reins sont la principale voie d'élimination hors de l'organisme de déchets du métabolisme potentiellement toxiques et de substances étrangères [1].

1. Unité fonctionnelle du rein

Il y a dans chacun des reins environ 1 million d'unités fonctionnelles microscopiques, les néphrons qui sont entourés par du tissu conjonctif. Une unité fonctionnelle est le plus petit constituant d'un organe capable d'accomplir toutes les fonctions de celui-ci. La fonction fondamentale du rein étant la formation de l'urine et, ce faisant, le maintien de la stabilité du LEC, le néphron est la plus petite unité capable de former de l'urine. La disposition des néphrons dans les reins donne naissance à deux zones, le **cortex rénal** externe, d'aspect granuleux et la **médullaire rénale** interne formée de pyramides d'aspect strié [1].

1.1 Structure des néphrons

La connaissance de la structure d'un néphron est essentielle pour comprendre la différence entre le cortex et la médullaire et, ce qui est plus important, pour comprendre le fonctionnement du rein. Chaque néphron a une partie vasculaire et une partie tubulaire qui sont liées par leur structure et leur fonction.

Le constituant essentiel de la partie vasculaire est le **glomérule**, un peloton de capillaire d'où sort par filtration une partie de l'eau et des substances dissoutes contenues dans le sang qui y circule. Le liquide filtré, presque identique au plasma passe ensuite dans la partie tubulaire du néphron où il est modifié et devient l'urine définitive.

L'artère rénale se divise de façon régulière dans le rein et donne finalement les nombreuses **artérioles afférentes** dont chacune est destinée à un néphron auquel elle apporte le sang. Les capillaires glomérulaires se rejoignent pour former **l'artériole efférente** par laquelle le sang, qui a perdu le liquide et les substances dissoutes filtrées dans le glomérule, quitte celui-ci. L'artériole efférente se divise rapidement en un second réseau capillaire pour former les **capillaires péri tubulaires** qui approvisionnent le tissu rénal et participent aux échanges de matière qui ont lieu entre le sang et le filtrat glomérulaire et transforment celui-ci en urine définitive, les capillaires péri tubulaires, qui entourent les tubules des néphrons, se rejoignent pour former des veinules dont la voie finale de drainage est la veine rénale par laquelle le sang quitte le rein [1].

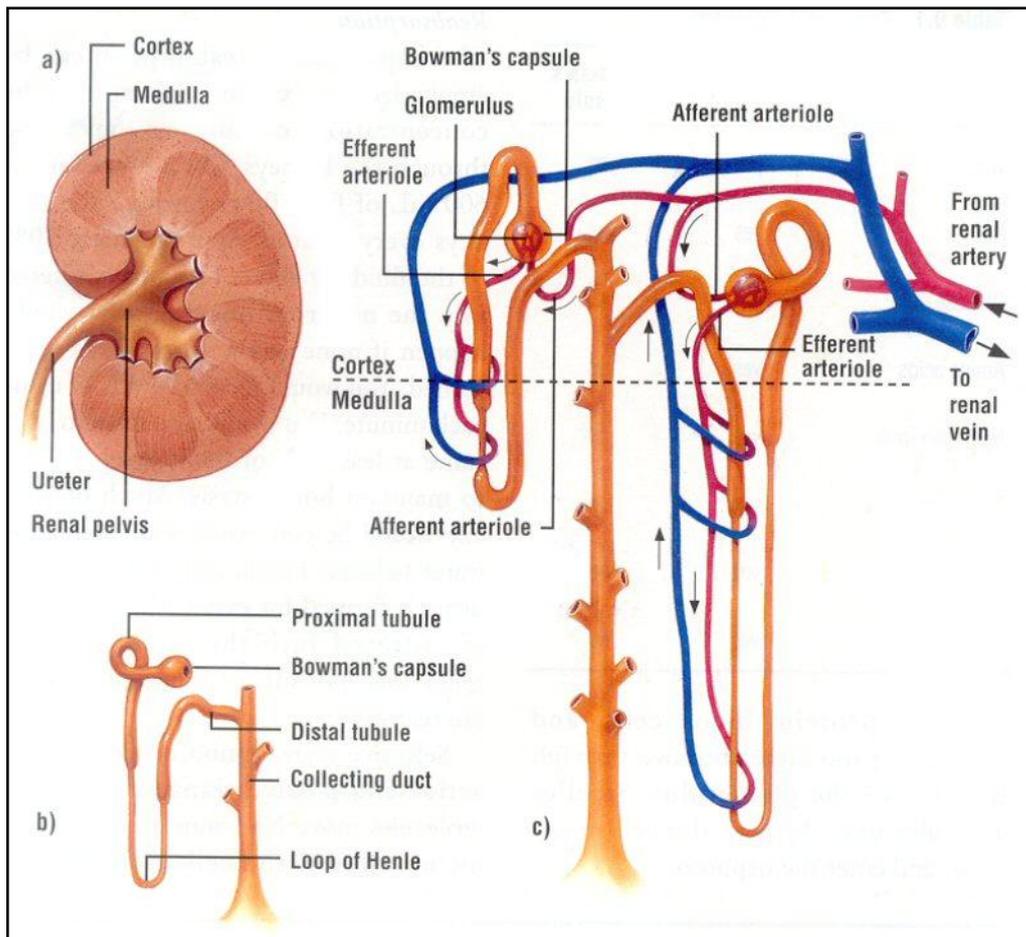


Figure 03 : Le néphron. Berthet j.,Amar-Costessec A., 2006 .

Le **cancer du rein** est une maladie rare et mortelle, elle est **mal dépistée** puisque elle est découverte accidentellement dans la plupart des cas. Elle représente 2 à 3% des cancers de l'adulte, son incidence est en augmentation. Dans 80% des cas, il s'agit de carcinome à cellules rénales.

Les reins touchés par un cancer ne peuvent assurer leur rôle correctement. Petit à petit, c'est tout l'organisme qui s'empoisonne par les déchets.

Puisque les reins filtrent le sang, les cellules cancéreuses peuvent voyager avec lui vers tout l'organisme et ce sont autant de **métastases possibles**. Alors, un simple cancer non dépisté peut dégénérer rapidement et lourdement. C'est cela qui fait du cancer du rein un **cancer grave** [3,21].

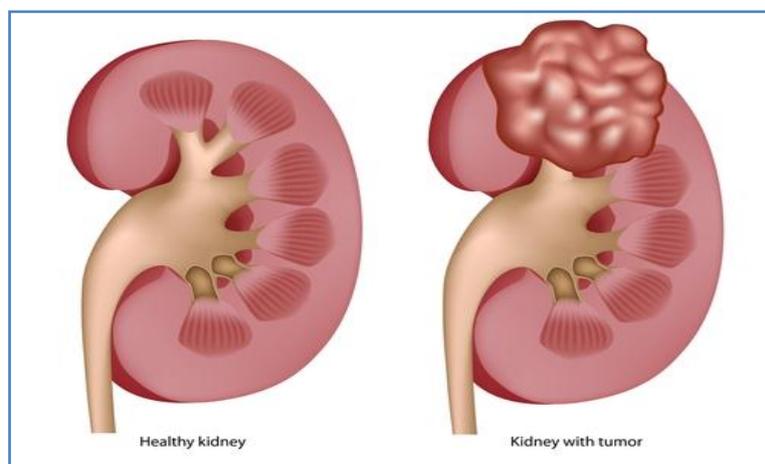


Figure 4. Cancer du rein. <http://www.faceauxcancers.fr>.

I. EPIDEMIOLOGIE

L'incidence des tumeurs rénales augmente régulièrement de 2% par an. Elle est fréquente chez l'homme que chez la femme. Il existe de fortes disparités géographiques et ethniques.

Le taux d'incidence est de:

- chez l'homme : 12,3/100 000
- chez la femme : 4,9 /100 000

Le cancer du rein représente 2% à 3% des cancers de l'adulte. Le pic d'incidence se situe entre 60 et 70 ans. L'incidence de ce cancer est élevée dans les pays développés (Amérique du nord ; Europe de l'ouest ; Scandinavie)

L'incidence est faible en : Asie et Japon ; Europe de l'est ; Israël

Le taux de mortalité par cancer du rein a diminué ces 15 dernières années, dans les deux sexes. Cette évolution pourrait être la conséquence d'un diagnostic plus précoce et des avancées thérapeutiques [12].

II. CAUSES ET FACTEURS DE RISQUES

L'étude des liens entre un facteur de risque et une maladie ne peut se faire qu'a posteriori, ce qui rend difficile l'identification des facteurs de risque responsables de l'augmentation de l'indice du cancer du rein [4,5,6,7,8,9].

1. Facteurs de risque liés au patient :

En dehors des caractéristiques constitutionnelles du patient (prédispositions génétiques, âge et sexe) les facteurs de risque ayant un lien de causalité bien étayé sont l'hypertension artérielle, le tabagisme, l'insuffisance rénale au stade terminal avec dialyse et l'obésité [4,5,6,7,8,9].

1.2 Facteurs génétiques

Les formes héréditaires de cancer du rein sont rares (2% des cancers du rein, les patients développent souvent des lésions bilatérales ou multifocales à un âge plus jeune). Les patients avec les formes héréditaires ont hérité d'une copie non fonctionnelle du gène suppresseur de tumeur et qu'un seul évènement sur l'autre copie du gène est suffisant pour introduire la tumorigénèse.

Dans les formes sporadiques de cancer du rein, deux évènements séparés dans l'organe affecté sont nécessaires pour inactiver les deux copies du gène. Ceci explique la survenue à un jeune âge [4,5,6,7,8,9].

1.2.1 Syndromes héréditaires

De nombreuses maladies génétiques sont associées à une augmentation de la fréquence des cancers du rein. Parmi ces maladies, on peut citer :

- **Maladie de Von Hippel-Lindau (VHL)** : C'est la cause la plus fréquente des formes familiales de cancer du rein. Cette maladie est une phacomatose héréditaire rare à transmission autosomique dominante impliquant la mutation du gène VHL sur le bras court du chromosome 3 (3p25-p26) [4,5,6,7,8,9].

1.3 L'hypertension artérielle :

L'hypertension artérielle est un facteur de risque reconnu, l'augmentation de risque de survenue d'un cancer du rein lors de la prise prolongée d'anti-hypertension notamment les diurétiques n'a pas été confirmés [4,5,6,7,8,9].

1.4 Obésité :

C'est un facteur de risque indépendant de cancer du rein dans les deux sexes. Les études de cohortes ont montré une augmentation de ce risque liée à l'augmentation de l'indice de masse corporelle [4,5,6,7,8,9].

1.5 Diabète :

Le diabète sucré est associé dans plusieurs études à une augmentation du risque de cancer du rein [4,5,6,7,8,9].

2. Facteurs hormonaux

L'exposition aux toxiques, tabac, plus fréquente chez l'homme mais aussi le statu hormonal (prise de contraception oral, ovariectomie, ménopause) [4,5,6,7,8,9].

3. Facteurs environnementaux**3.1 Tabagisme**

Le risque de développer un cancer du rein est deux fois plus grand chez un fumeur, ce risque est dose-dépendant et s'infléchit après une période de sevrage de 10 ans. Le tabagisme passif entraîne également un risque [4,5,6,7,8,9].

3.2 Exposition professionnelle

Les carcinogènes professionnels qui augmentent le risque relatif du cancer du rein sont difficiles à étudier néanmoins, différents composés chimiques semblent impliqués : cadmium, plomb, hydrocarbures et amiante cependant, des méta-analyses ne confirment pas l'implication de l'amiante comme facteur de risque [4,5,6,7,8,9].

3.3 Alimentation

La consommation de fruits et légumes semblait être associée à une diminution du risque du cancer du rein. La surconsommation de thé, de café ou d'aliments protéinés incriminés dans l'augmentation du risque n'a pas été confirmée dans une méta-analyse. L'activité physique semble être associée à une diminution de ce risque [4,5,6,7,8,9].

3.4 Alcoolisme

L'alcoolisme modéré (un verre par jour) semblerait associé à une diminution de l'incidence du cancer du rein [4,5,6,7,8,9].

III. CLASSIFICATION HISTOLOGIQUE DES TUMEURS RENALES

La classification histologique permet de regrouper les cellules cancéreuses selon leur apparence et leur comportement lorsqu'on les observe au microscope. Pour connaître la classification histologique d'une tumeur, on examine au microscope le prélèvement fait par biopsie. On lui donne ensuite un grade en fonction de l'apparence et du comportement des cellules cancéreuses qu'on compare à ceux des cellules normales (différenciation). Dans le cas du cancer du rein, les grades de Fuhrman se basent sur la taille et la forme du noyau dans les cellules tumorales et de la forme de la membrane qui entoure le noyau [13].

3.1 Grades de Fuhrman

Grade	Description
I	Les noyaux et les membranes nucléaires sont ronds et de forme régulière et les cellules se développent lentement.
II	Les noyaux sont un peu plus gros et plus visibles, les membranes nucléaires sont un peu irrégulières et les cellules se développent plus vite que les cellules de grade I.
III	Les noyaux sont gros mais de formes variées, la membrane nucléaire est irrégulière et les cellules se développent rapidement.
IV	Les noyaux sont très gros, les membranes nucléaires ont une forme très irrégulière et les cellules se développent très rapidement.

La classification histologique joue un rôle important dans la planification du traitement du cancer du rein et peut également permettre de prévoir l'évolution de la maladie (pronostic) [13].

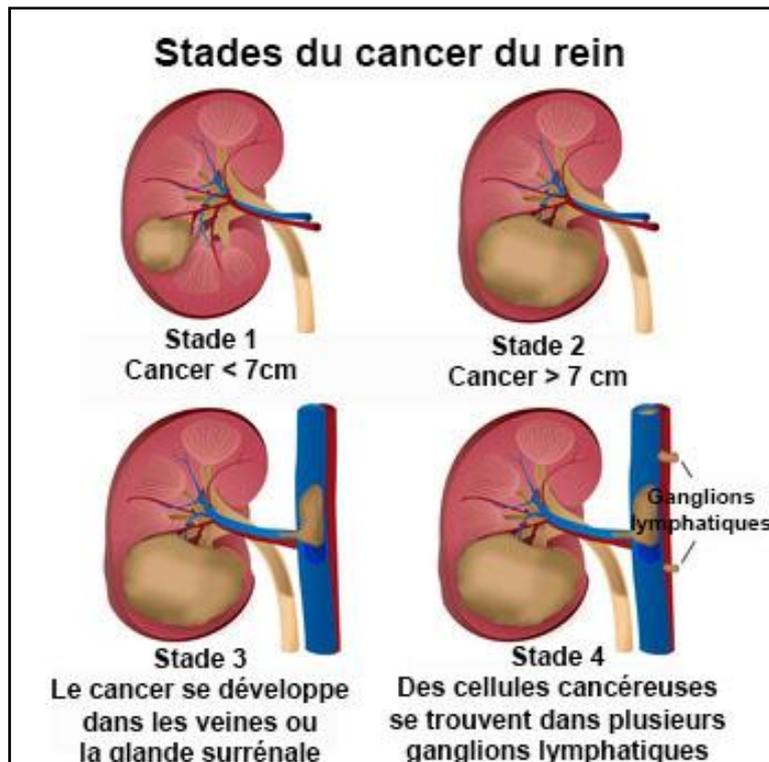


Figure 5 : les stades du cancer du rein. <http://www.faceauxcancers.fr>.

3.2 Tumeurs bénignes du rein

Une tumeur bénigne est une masse non cancéreuse qui ne se propage pas vers d'autres parties du corps (pas de métastases) et qui ne met habituellement pas la vie en danger. Des tumeurs bénignes accompagnent parfois un carcinome à cellules rénales lorsque le pathologiste examine un rein qui a été enlevé. Pour toutes ces raisons, on traite les tumeurs bénignes du rein comme des tumeurs malignes [13].

3.2.1 Adénome rénal

L'adénome rénal est la forme la plus courante de tumeur bénigne du rein. C'est une petite masse de bas grade qui ne cause habituellement pas de symptômes [13].

3.2.2 Oncocytome

L'oncocytome apparaît habituellement sous forme d'une tumeur unique dans un rein et peut devenir assez grosse. Il se développe parfois dans les deux reins au même moment (bilatéral) et à de multiples endroits dans ces organes. On peut aussi observer l'oncocytome en présence d'un carcinome chromophile à cellules rénales, une tumeur maligne [13].

3.2.3 Angiomyolipome

L'angiomyolipome est une tumeur bénigne du rein faite de gras, de vaisseaux sanguins et de tissu musculaire lisse. Même si elle est bénigne, cette tumeur peut se propager jusqu'au tissu voisin et le détruire. Elle peut aussi causer un saignement soudain (hémorragie) du rein dans l'abdomen. Il existe 2 types d'angiomyolipome : **sporadique, ou isolé** [13].

3.2.4 Tumeurs bénignes rares

D'autres types de tumeur bénigne sont rarement observés dans le rein : Fibrome ; Lipome ; Adénome métanéphrique [13].

3.3 Tumeurs malignes du rein

Une tumeur maligne est une masse cancéreuse qui peut se propager vers d'autres parties du corps (métastases) [13].

3.3.1 Carcinome à cellules rénales

Le carcinome à cellules rénales représente environ 90 % de tous les cancers du rein. Cette tumeur prend naissance dans le revêtement des tubules du rein et on l'observe le plus souvent dans le cortex rénal. Dans la plupart des cas, la tumeur se développe dans un seul rein. Il existe plusieurs sous-types différents de carcinome à cellules rénales qui se basent sur l'apparence des cellules au microscope [13].

3.3.1.1 Carcinome à cellules claires

Le carcinome à cellules claires représente jusqu'à 80 % de tous les carcinomes à cellules rénales. Les cellules semblent rondes et claires [13].

3.3.1.2 Carcinome papillaire à cellules rénales

Le carcinome papillaire à cellules rénales représente de 10 à 15 % de tous les carcinomes à cellules rénales. Les cellules ressemblent à de petits doigts. Le carcinome papillaire à cellules rénales est davantage divisé ainsi :

- Type 1 : généralement moins agressif
- Type 2 : généralement plus agressif
- Type non spécifié : tumeur papillaire qui possède des caractéristiques des types 1 et 2

Le carcinome papillaire à cellules rénales peut aussi être héréditaire :

3.3.1.3 Carcinome papillaire à cellules rénales héréditaire

Cette tumeur a tendance à se manifester dans les deux reins (bilatérale) et à de multiples endroits dans les reins (multifocale) [13].

3.3.1.4 Léiomyomatose héréditaire et carcinome à cellules rénales

Ces tumeurs sont très agressives et se propagent vers d'autres parties du corps (métastases) très rapidement. Chez les personnes atteintes de cette forme de la maladie, des tumeurs de la peau et des fibromes utérins (chez la femme) apparaissent également [13].

3.3.1.5 Carcinome chromophile à cellules rénales

Le carcinome chromophile à cellules rénales représente environ 5 % de tous les carcinomes à cellules rénales. Les cellules semblent avoir plusieurs côtés avec un centre pâle. On considère habituellement que le carcinome chromophile à cellules rénales est d'évolution lente (indolent) et que son potentiel à former des métastases est faible [13].

3.3.1.6 Carcinome des tubes collecteurs

Le carcinome des tubes collecteurs est une forme rare et très agressive de carcinome à cellules rénales. Il prend naissance dans le revêtement des tubes collecteurs [13].

3.3.1.7 Carcinome à cellules rénales d'aspect sarcomatoïde ou rhabdoïde

Les cellules de certains carcinomes à cellules rénales présentent des caractéristiques distinctes lorsqu'on les examine au microscope (caractéristiques histologiques). On observe généralement les caractéristiques sarcomatoïdes dans les tumeurs qui ont pris naissance en tant que carcinome à cellules claires, bien que parfois elles peuvent apparaître sous la forme d'une tumeur papillaire ou d'une tumeur chromophile. Ces cellules sont longues et fusiformes. On observe les caractéristiques rhabdoïdes dans les carcinomes à cellules claires. Ces cellules ressemblent à celles qu'on trouve normalement dans le tissu musculaire [13].

3.3.1.8 Carcinomes inclassables

Environ 5 % des carcinomes à cellules rénales ne peuvent pas être classés dans une catégorie ou sont un mélange de différents types de tumeurs [13].

3.3.2 Tumeurs malignes rares

Ces types de tumeurs au rein représentent approximativement 10 % de toutes les tumeurs rénales.

- **Sarcome** – il prend naissance dans les tissus conjonctifs du rein
- **léiomyosarcome** – type de sarcome rénal le plus courant
- **tumeur de Wilms de l'adulte**

- **carcinome médullaire**
- **carcinome à petites cellules**
- **tumeur carcinoïde [13].**

La compréhension des rôles physiologiques des gènes identifiés dans les maladies héréditaires prédisposant aux CCR, dont certains sont aussi impliqués dans les tumeurs rénales sporadiques, permet non seulement un diagnostic pré-symptomatique mais également d'envisager de nouvelles voies thérapeutiques en cancérologie. La recherche d'altérations génétiques permet également une caractérisation génotypique des tumeurs sporadiques. La mutation survenant sur ces gènes peuvent être activatrices ou inactivatrices, les mutations connues sont, dans la majorité des cas, associées à une inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs, le plus souvent par perte de la région chromosomique contenant le gène en question [4,5,6,7,8,9].

Pour conduire à une transformation maligne, le gène suppresseur de tumeurs doit être inactivé sur deux allèles [4,5,6,7,8,9].

1. Oncogenèse

Les études menées ces dernières années ont permis de mettre en évidence au sein des tumeurs rénales, un certain nombre d'oncogènes impliqués dans la carcinogénèse.

L'expression du proto-oncogène *C-MYC* est élevée dans le cancer du rein à un stade tardif alors que *C-ERBB* interviendrait plus précocement en particulier dans le CCR conventionnelles.

Le proto-oncogène *C-MET* qui code une protéine ayant un rôle de récepteur tyrosine kinase pour le facteur de croissance HGF intervenant dans les processus de croissance et différenciation cellulaires [4,5,6,7,8,9].

2. Prédispositions héréditaires

Il existe quatre types de prédispositions majeures dans les tumeurs rénales :

2.1 La maladie de Von-Hippel-Lindau (VHL): C'est la principale cause du cancer du rein héréditaire. Cette maladie constitue le modèle de l'angiogénèse tumorale. Les principales manifestations cliniques comprennent des hémangioblastomes du SNC et de la rétine, des cancers du rein, des kystes rénaux, des phéochromocytomes, des tumeurs neuroendocrines et des kystes du pancréas. La maladie de VHL est due à des mutations du gène suppresseur de tumeur *VHL* localisée en 3p25-26. Ce gène comporte 213 acides aminés et il a un rôle très important dans la réponse tissulaire de l'hypoxie et la dégradation du facteur (HIF) [14].

2.2 Cancer papillaire héréditaire (HPRC): C'est une affection rare, caractérisé par le développement de carcinome papillaire de type 1 bilatérale ou multifocale. Cette affection

est due à une mutation activatrice du proto oncogène (*MET*) localisé en 7q31 et qui code le récepteur (tyrosine-kinase) normalement activé par le facteur de croissance hépatocytaire (HGF). La voie de signalisation (MET-HGF) est importante pour le développement embryonnaire, la croissance cellulaire, la différenciation et la régulation et de la migration cellulaire dans un grand nombre de tissus [14].

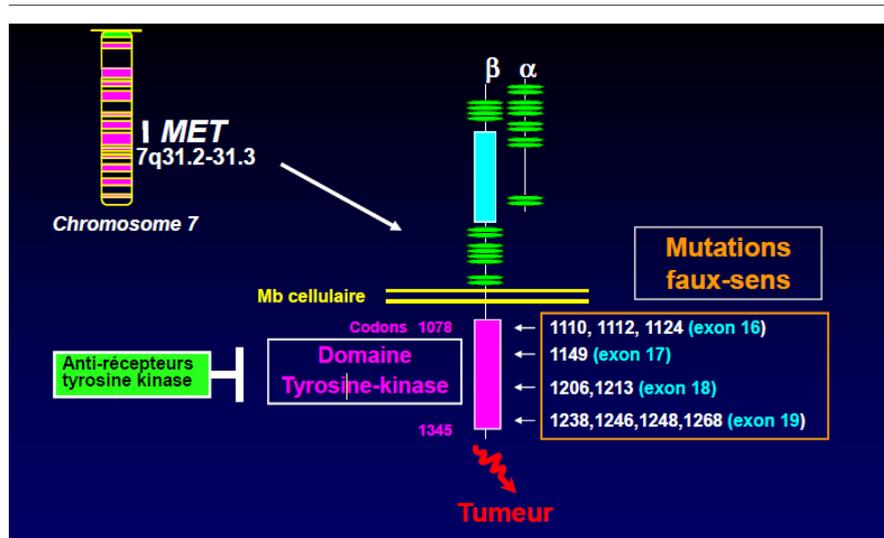


Figure 6 : Mutation germinale du gène *MET*. Stéphane Richard. 2013.

2.3 Léiomyomatose héréditaire à la tumeur rénale (HLRCC): Elle prédispose au développement cutané et utérin multiples et de cancer papillaire de type 2 ou de cancer de tube collecteur, le gène responsable est appelée (*FH*), il est localisé en 1q42-43 et code l'enzyme fumarate hydratase impliquée dans le cycle de Krebs, il s'agit d'un gène suppresseur de tumeur. Lorsque *FH* est mutée, il va conduire à une inhibition du PHD dans la voie HIF et aucune mutation somatique de *FH* n'est impliquée dans le cancer du rein sporadique [14].

2.4 Syndrome de Birt-Hogg-Dubé (BHD): C'est une maladie génodermatose qui prédispose les patients à des lésions cutanées bénignes du visage, des kystes pulmonaires, et des tumeurs rénales. La tumeur peut être unique ou bilatérale. Cette tumeur est due à une mutation germinale du gène suppresseur de tumeur *BHD* localisée en 17p11.2 qui code la folliculine qui est une protéine de fonction inconnue impliquée dans la voie (MTOR). Les mutations somatiques de *BHD* sont rares dans le cancer du rein sporadique [14].

3. Le VEGF dans le cancer du rein

L'induction de l'angiogénèse est un mécanisme indispensable au développement des tumeurs au-delà de 1 à 2 cm de diamètre. Le VEGF ou VEGF-A et les molécules apparentées (VEGF -C et le VEGF -D) sont de puissants facteurs pro-angiogéniques impliqués dans la croissance tumorale et la survenue de métastases [15].

4. Implication de la voie VHL/HIF dans le microenvironnement tumoral et la réponse immunitaire

L'hypoxie ou la stabilisation de la voie HIF, suite à la perte du gène VHL notamment, est une caractéristique commune à de nombreuses tumeurs. Cette dérégulation de la voie HIF peut avoir des conséquences au niveau de quatre aspects :

- Modification du microenvironnement et du recrutement des cellules de l'immunité ;
- Modification des mécanismes de reconnaissance de la tumeur par les cellules immunitaires;
- Capacités intrinsèques de la tumeur à répondre à la mort cellulaire ;
- Dérégulation de microRNA par le stress hypoxique [20].

5. L'angiogénèse

5.1 Angiogénèse physiologique

C'est un ensemble des processus cellulaire et moléculaire conduisant à la formation de nouveaux vaisseaux sanguin à partir d'un réseau vasculaire existant. Ce processus se déroule lors du cycle menstruel chez la femme, ou lors des processus de réparation cellulaire par exemple d'une cicatrisation d'une plaie sauf dans certain situation pathologique. Ce processus est divisé en phases :

- **Phase d'activation:** elle implique une cascade réactionnelle dans leur activation et qui conduit à une augmentation de la perméabilité vasculaire.
- **La phase de maturation cellulaire:** elle consiste en une inhibition de la prolifération et de la migration endothéliale sous l'influence des facteurs de croissance [15].

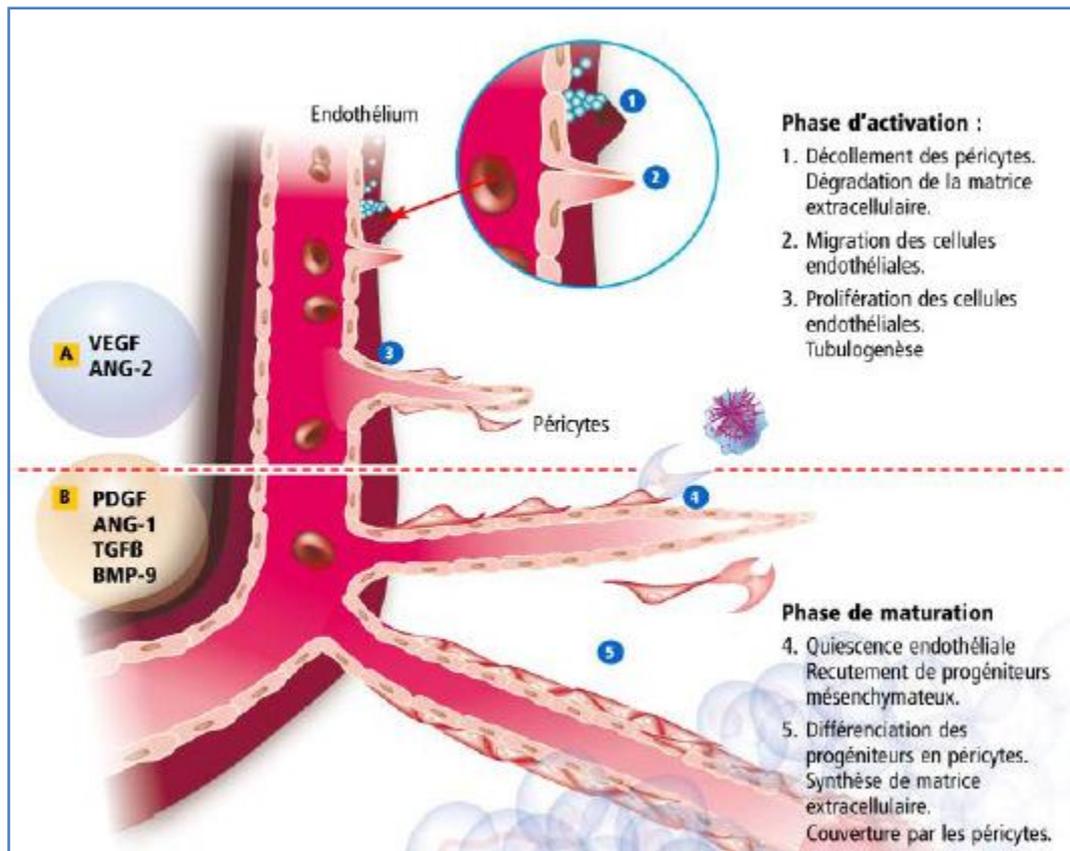


Figure 7 : Les deux étapes de l'angiogénèse. Feige JJ.2009.

5.2 Angiogénèse tumorale

La vascularisation est importante pour les cellules tumorales comme les autres cellules de l'organisme, ces cellules cancéreuses ont besoin de nutriment et d'oxygène.

Les nouveaux vaisseaux formés lors de l'angiogénèse tumorale sont caractérisés par la présence de plusieurs anomalies du fait de leur rapide construction, ils sont instables, immatures, et forment un réseau vasculaire anarchique hémorragique [15].

6. Voies de l'EGF et des MAP-kinases

Le récepteur à l'EGF (EGFR) apparaît fréquemment surexprimé dans le cancer du rein. Un de ses ligands est le TGF α , dont l'expression est notamment sous la dépendance de la voie VHL/HIF. Les voies de signalisation sous la dépendance de l'EGFR sont connues pour

leur rôle dans la carcinogenèse de nombreux cancers, conduisant à la stimulation de la prolifération et à l'inhibition de l'apoptose des cellules tumorales [21].

7. La protéine mTOR

La protéine mTOR, est une serine-thréonine kinase impliquée dans la voie de signalisation de la PI3K. Cette protéine est formée de 2549 acides aminés qui ont une structure commune de 5 domaines.

Ses rôles clés dans la régulation du métabolisme, dans la croissance, dans la progression du cycle et dans la survie cellulaire [15].

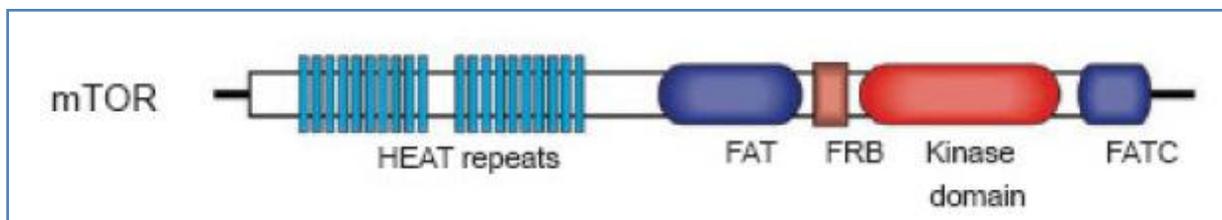


Figure 8 : La protéine mTOR. Feige JJ.2009.

8. Voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR

La voie PI3K/Akt/mTOR permet de répondre aux besoins métaboliques de la cellule et consiste en une cascade d'activation intracellulaire par de nombreuses phosphorylations. PI3K est la première protéine impliquée dans cette voie.

AKT est un proto-oncogène qui a plusieurs cibles, dont la protéine mTOR forme le complexe mTORC1 avec les protéines Raptor et MLST8/GβL. MLST8/GβL ne semble pas indispensable à l'activité du complexe contrairement aux protéines Raptor et mTOR [15].

9. La MTHFR:

9.1 La structure de la MTHFR:

Chez l'homme la MTHFR est une protéine catalytique active de 77KD. C'est la 5,10 méthylènetétrahydrofolate-réductase qui est un homodimère présent dans le cytoplasme. Cette protéine est composée de 656 acides aminés, elle s'exprime fortement dans les testicules,

dans le cerveau et les reins et faiblement dans les autres tissus. Une isoforme plus petite de 70 KD, qui a été découverte uniquement dans le foie de l'adulte ainsi que dans le foie et les reins [25].

9.2 La localisation de gène de la MTHFR:

Il est localisée sur le bras court (p) du chromosome 1 en 1(p36.3), il comporte 11 exons, sa région promotrice contient plusieurs sites de liaison, mais ne possède pas une séquence TATA box. Sur l'exon 1 du gène il y a un alternatif splicing, la région UTR de ce gène est longue montrant la complexité dans la régulation de ce gène [26].

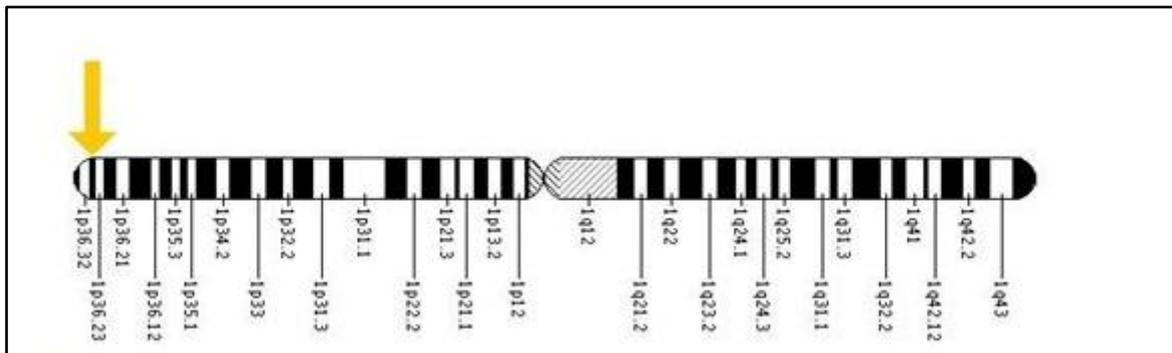


Figure10 : la localisation de gène de la MTHFR sur le

Chromosome1. Goyette P. ,Pai A,Milos R,Frost P,Tran P ,Chen Z ,chan m,Rozen R.1998.

9.3 La fonction de MTHFR: elle joue un rôle très important dans la régulation du métabolisme du folate, et aussi la synthèse de l'ADN et sa méthylation. La 5,10 MTHFR catalyse la conversion du 5,10méthylènetetrahydrofolate (5,10-CH₂-FH₄) en (5-CH₃-FH₄) qui est la forme biologique majeure des folates et la principale source de carbone nécessaire pour la conversion de l'homocystéine en méthionine, cette conversion est très importante pour la biosynthèse des nucléosides, la méthylation de l'ADN et ainsi le métabolisme de l'homocystéine [27].

9.4 Polymorphisme du gène MTHFR: il existe deux polymorphismes courant et bien décrit du gène *MTHFR*. Il s'agit C677T et C1298A responsables de la synthèse d'une forme thermolabile de la protéine MTHFR. Le variant génétique est associé à des maladies cardiovasculaires, à des anomalies de la coagulation et à des malformations congénitales [26].

9.4.1 Polymorphisme C677T du gène MTHFR: Le polymorphisme identifié sur le gène de la *MTHFR* et qui a effectivement pour conséquence de rendre thermolabile. La protéine est une substitution d'une cytosine par une thymine en position 677 dans la séquence nucléotidique. Elle se traduit dans la séquence protéique par la substitution d'une alanine par

une valine sur le codon 222. La mutation change la structure secondaire du peptide ainsi que les interactions entre les monomères. La protéine modifiée perd son cofacteur FAD rapidement ce qui diminue sa stabilité et par conséquent son activité. Il est démontré que l'activité enzymatique de la mutation C677T réduit l'activité enzymatique de la protéine MTHFR jusqu'à 70% chez les individus homozygotes (TT) et 40% chez les individus hétérozygotes (CT) [27].

9.5. La relation entre la MTHFR et le cancer de rein:

Le MTHFR joue un rôle crucial dans la régulation du métabolisme de l'acide folique, ce qui affecte la synthèse d'ADN et la méthylation. Des études montrent que le polymorphisme C677T du gène MTHFR a un risque accru de CCRCC chez les hommes [28].

10. Le conseil génétique

Du fait des progrès de la génétique, le conseil génétique peut être sollicité chez les patients à risque.

- Antécédents familiaux de VHL.
- Antécédents familiaux de cancer de rein avant l'âge de 50 ans.
- Sujet atteint par la maladie de Von-Hippel-Lindau pour rechercher des mutations du gène VHL [29].

1. Détection précoce

Détecter et traiter un cancer du rein à un stade précoce accroît les chances de réussite du traitement. Reconnaître les symptômes et passer régulièrement un examen de santé sont les meilleures façons de le détecter.

Il est possible que les personnes dont le risque d'être un jour atteintes d'un cancer du rein est plus élevé que la moyenne doivent passer plus souvent des tests de dépistage. Ce sont entre autres :

- les personnes atteintes de certains troubles génétiques héréditaires
- les personnes en dialyse rénale prolongée [30]

2. Diagnostic

Le cancer du rein est la plupart du temps asymptomatique même si à un stade déjà avancé. Le médecin peut diagnostiquer cette maladie à partir d'un protocole :

- L'examen physique qui permet au médecin de confirmer s'il y a ou non la présence d'une masse palpable dans les régions reins.
- L'analyse des urines qui lui permet de mesurer la quantité des substances, comme les électrolytes, les hormones et les déchets du métabolisme.
- Analyse biochimique sanguine pour mesurer le taux de substance chimique dans le sang.
- L'échographie abdominale est un examen peu spécifique qui montre une masse solide, déformant les contours du rein.
- La TDM abdominale pour préciser la taille, la forme et l'emplacement de la tumeur et si elle est propagé aux autres organes.
- IRM, c'est pour vérifier si le cancer s'est propagé dans les principaux vaisseaux sanguins du rein ou d'autres organes, en particulier dans le cas d'une grosse tumeur au rein.
- La biopsie c'est pour confirmer le diagnostic de cancer avant le traitement.
- L'angiographie c'est pour cartographier les vaisseaux sanguins dans la tumeur au rein avant la chirurgie.
- La radiographie pour s'avoir si le cancer c'est propager au poumon.
- La scintigraphie osseuse pour savoir s'il est propagé à l'os [29].

3. Traitement du cancer du rein

Le traitement du cancer est administré par des spécialistes du cancer, soit des oncologues. Les plans de traitement sont conçus de façon à répondre aux besoins uniques de chaque personne atteinte de cancer. Les décisions relatives au traitement du cancer du rein se basent sur les éléments suivants :

- stade du cancer du rein
- personne ayant 1 ou 2 reins fonctionnels
- présence du cancer dans 1 rein ou dans les deux
- type de cancer du rein
- état de santé global de la personne atteinte

Options de traitement du cancer du rein

- Chirurgie
- Traitement ciblé
- Thérapie biologique
- Mobilisation artérielle
- Radiothérapie
- Surveillance active
- Suivi après le traitement [29]

Partie Pratique

1. Type d'étude

Nous avons réalisé une étude transversale type cas-témoin qui a porté sur une population malade de 6 sujets et de 12 témoins présumés sains tout sexe confondu. Cette étude a duré 2 mois allant du mois de Mai au mois de Juin 2014 au niveau du centre d'hémodialyse à Daksi (EHS) et du laboratoire de Biologie et génétique moléculaire de l'Université 3.

2. Population étudiée :

2.1 La Population malade :

Nous avons recruté 6 patients qui répondent à nos critères d'exclusion et d'inclusion.

a. Les critères d'inclusion :

- tout patient ayant une tumeur rénale diagnostiquée par un médecin spécialiste.

b. Les critères d'exclusion :

- des sujets non métastasés.

2.2 La population témoin :

a. Les critères d'inclusion :

- sujets sains tout sexe confondu.

b. Les critères d'exclusion :

- des sujets présentant des maladies chroniques (HTA, diabète, insuffisance rénale).

- des sujets présentant des antécédents familiaux d'un cancer.

3. Méthodes :

3.1 Questionnaire :

Un questionnaire comprenant toutes les données nécessaires est établi pour la population d'étude. Tous les renseignements nécessaires sont enregistrés dans ce questionnaire après un interrogatoire du patient réalisé par nous même (Annexe 1).

3.2 Prélèvement sanguin :

Le prélèvement sanguin conçu pour l'extraction de l'ADN dans des conditions stériles, dans un tube contenant l'acide éthylène diamine tétracétique (EDTA).

Une quantité de 4 à 8 ml a été prélevée pour chaque patient, après avoir obtenu leur consentement, les prélèvements sont recueillis au niveau du centre EHS.

3.3 Extraction d'ADN :

Est une technique permettant d'isoler l'ADN de cellules ou de tissus. L'ADN ainsi extrait peut ensuite être utilisé pour l'amplification. Il existe différents protocoles pour extraire l'ADN, qui suivent approximativement le même schéma de principe.

- Lyse des cellules.
- Elimination des protéines.
- Elimination des autres acides nucléiques (ARN)
- Concentration de l'ADN par précipitation à l'alcool.

La méthode employée dans notre laboratoire est une méthode utilisant un solvant inorganique qui est le NaCl.

3.3.1 Principe :

Les leucocytes sont séparés du sang total par lyse hypotonique; et ils seront ensuite traités par :

- Le Sodium dodécyle sulfate (SDS) un détergeant et surfactant ionique fort, il est communément utilisé afin de séparer des protéines, il supprime les liaisons non covalentes de la protéine, ce qui dénature celle-ci (elle perd sa conformation initiale, les protéines se détachent de leur support), il permet également de rompre les couches lipidiques de la membrane cellulaire.

- La solution tampon : c'est une solution qui limite les variations de PH du milieu afin d'éviter la dénaturation de l'ADN.

- La protéinase K dénature et dégrade les protéines.

- L'ADN nucléaire est libéré dans le lysat et les protéines qui lui sont associées sont digérées et éliminées par précipitation au NaCl. Le pelote d'ADN est formée dans le surnageant par précipitation avec l'éthanol pur.

- L'ADN est ensuite solubilisé en phase aqueuse (eau stérile bidistillée).

- La pureté ainsi que la concentration de l'ADN sont estimées par spectrophotométrie à UV.

3.4 Détermination de la pureté de l'ADN :

La pureté de l'ADN est déterminée en calculant le rapport entre la DO à 260 (longueur d'onde d'absorption des acides nucléiques) et la DO à 280 (longueur d'onde d'absorption des protéines).

On considère que :

- L'ADN est suffisamment pur lorsque : le rapport $R = DO_{260} / DO_{280}$ est compris entre 1,6 et 2 ($1,6 < R \leq 2$).
- L'ADN est contaminé par les protéines si la DO est $< 1,6$.
- L'ADN est contaminé par les ARN si la DO est > 2 .

3.5 Recherche de la mutation C677T du gène codant la MTHFR :

3.5.1 Amplification par PCR (La Polymerase Chain Reaction) :

Est une technique basée sur une répétition de cycles de transition de température. Chaque cycle contient trois étapes:

- dénaturation
- hybridation
- élongation

3.5.2 Préparation du mélange réactionnel ou (mix) :

Pour préparer le mélange réactionnel de la PCR, il faut multiplier la quantité de chaque composant par le nombre des échantillons + 2 tubes (pour le témoin positif, le témoin négatif).

L'ADN est amplifié par PCR avec deux amorces encadrant le gène MTHFR (tableau02).

Tableau 2 : Préparation du mélange réactionnel de PCR pour le génotypage de la MTHFR.

Mix de PCR	Volume
Tampon 10X sans Mgcl ₂	5 µl
dNTP 2 mM	5µl
Mgcl ₂	3µl
Oligo F (100pmol/µ)	0,2µl
Oligo R (100pmol/µ)	0,2µl
Taq polymérase	0,4µl
H ₂ O	35,2µl

La séquence des amorces utilisées est :

Oligo F (forward primer): 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA3'

Oligo R (revers primer) : 5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG3'

3.5.3 Déroulement des cycles de la PCR

Le déroulement des cycles de la PCR est assuré par le thermocycleur **Techne**. Le thermocycleur est programmé comme suit :

Tableau 3 : Programmation des cycles de PCR.

Nombre de cycle	Etape	Température	Durée
X 1	Dénaturation initiale	94°C	5mn
X 30	Dénaturation	94°C	30s
	Hybridation	65°C	30s
	Élongation	72°C	40s
X 1	Elongation terminale	72°C	10min

3.5.4 Le contrôle des produits de PCR

Un gel d'agarose à 2 % sera préparé comme suit :

- Mélanger 2g d'agarose avec 100 ml de tampon TBE 1 X.
- Faire fondre l'agarose au four à micro-ondes jusqu'à ce qu'il devient homogène
- Ajouter 10 µl de Bromure d'Ethidium (BET), un agent intercalant qui se fixe entre les bases nucléiques à l'intérieur de la double hélice et qui rendra les ADN fluorescents par exposition aux UV.
- Le gel est ensuite coulé lentement pour ne pas faire des bulles dans le plateau de la cuve horizontale.
- Laisser refroidir, enlever le peigne. Le gel sera prêt ainsi pour le dépôt des échantillons.

Dans chaque puits du gel, on dépose :

- 10 µl du produit de PCR mélangé avec 3 µl Bleu de Bromophénol (BBP) qui permet de suivre le front de migration.
- dans le dernier puits on met 10 µl de marqueur de taille (100pb).

Tableau 4 : préparation du milieu de digestion:

Les composants	Quantité
H ₂ O	4µl
Tompon	5µl
HinfI	1µl
BSA	0,2µl

10 µl du mix pour digestion sont mélangés à 30 µl du produit de PCR. Le tout est incubé pendant une nuit dans un bain marie à sec à 37°C.

**Figure 12 :** profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments après digestion par HinfI .

4.1 Electrophorèse des produits de digestion:

Les fragments d'ADN digérés par l'enzyme de restriction sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (Annexe 5) 3% (3g d'agarose + 100ml du TBE1X). Nous déposons dans chaque puits du gel, le produit digéré après concentration à une température plus élevée (65°) pendant 2 heures et 3 µl du bleu de Bromophénol. La migration se fait en parallèle avec le marqueur de taille.

La migration des fragments d'ADN dépend de leurs tailles ; plus le fragment à une taille élevé, moins la migration électro phorétique par rapport au puits d'inclusion est importante. A l'inverse les fragments de petites tailles ont une distance de migration plus élevée.

Lorsqu'on obtient une séparation nette des différents fragments du marqueur (après 1 h 30 mn de migration), le gel est photographié après transillumination aux UV.

1. Caractéristiques principales des patients :

1.1 Répartition des patients selon le sexe :

Notre population malade est constituée de 6 cas qui sont répartis entre 50% de sexe masculin et 50% de sexe féminin.

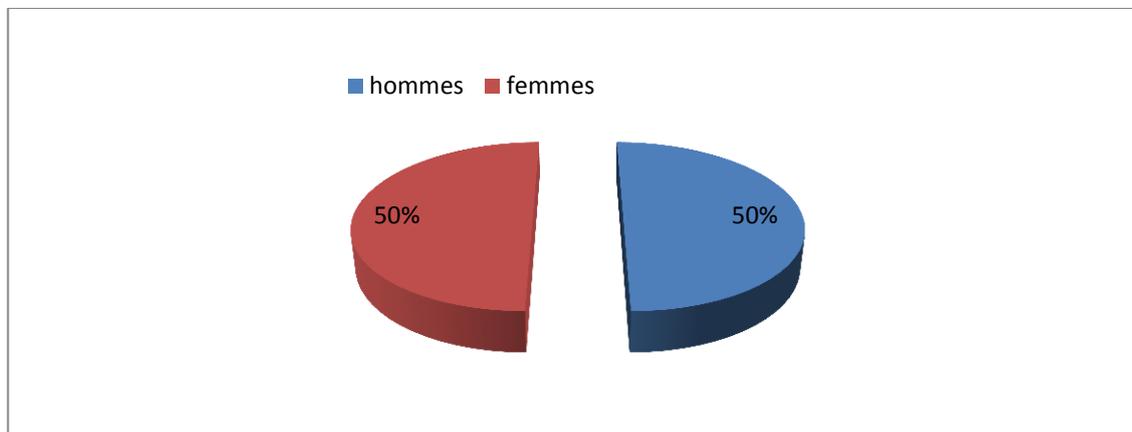


Figure 13 : Répartition des patients selon sexe.

Selon la figure 13, on observe que le nombre de patients de sexe masculin atteints du cancer rénal est en égalité avec le nombre de patients de sexe féminin.

1.2 Répartition des patients en fonction d'âge

Notre population est classée en tranche d'âge de 10 ans.

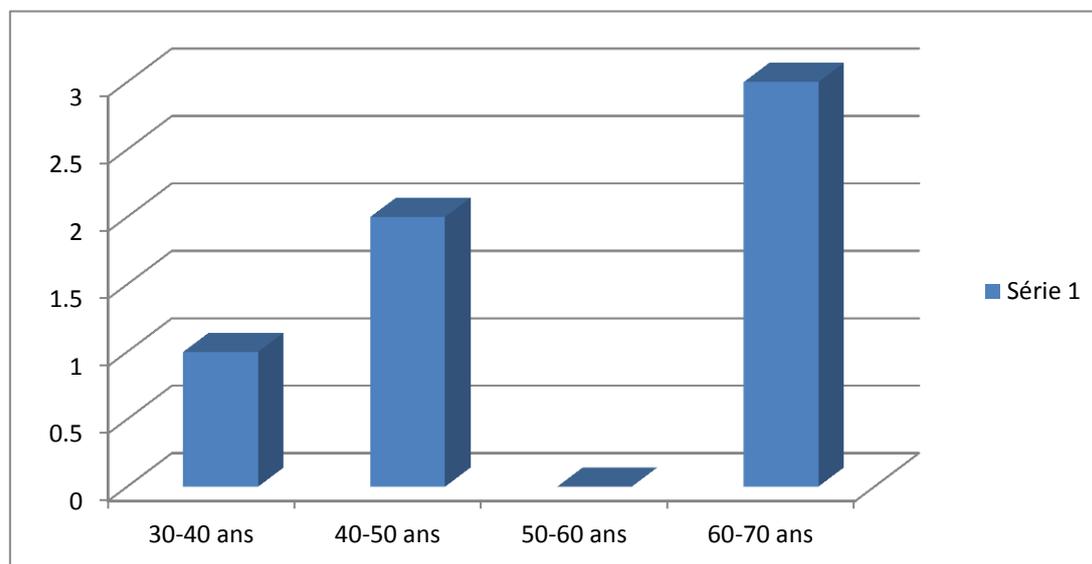
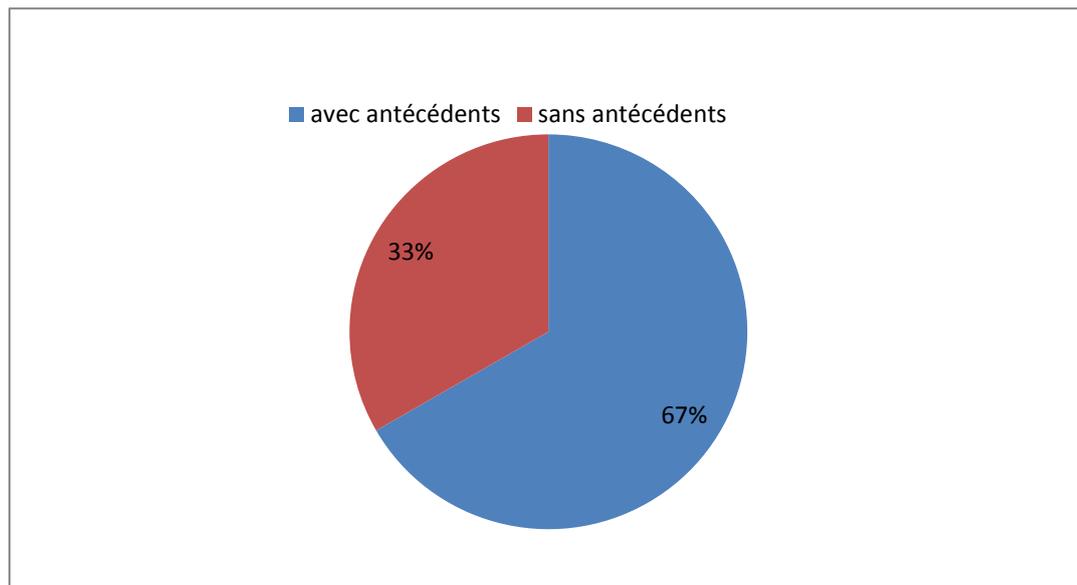
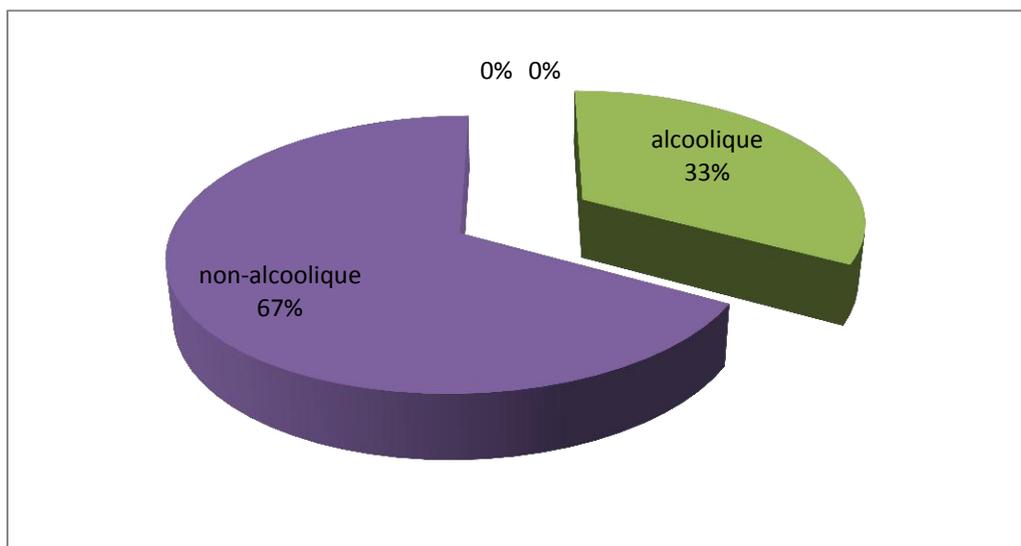


Figure .14 : Répartition des patients selon l'âge.

D'après l'histogramme, on observe que le cancer du rein est plus fréquent à partir de l'âge de 60 ans.

1.3 répartition des patients selon la présence d'antécédents familiaux :**Figure 15 : répartition des patients selon la présence d'antécédents familiaux.**

Quatre patients (67%) parmi les 6 ont des antécédents familiaux du cancer du rein ou d'autres cancers. Les 2 patients restant (33%) n'ont pas d'antécédents familiaux.

1.4 répartition des patients selon la consommation d'alcool :**Figure. 16 : répartition des patients selon la consommation d'alcool.**

D'après la figure, on observe que 37% des patients (2/6) sont des consommateurs d'alcool ou ex-alcooliques alors que le reste n'est pas alcoolique.

1.5 Répartition des patients selon la consommation du tabac

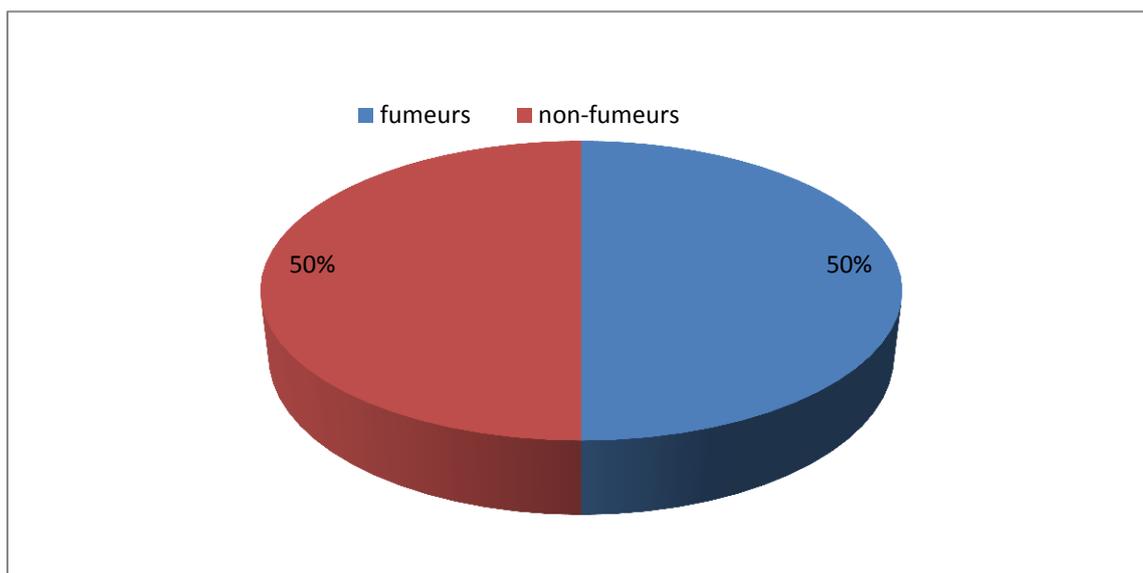


Figure 17 : Répartition des patients selon la consommation du tabac

D'après la figure on peut dire qu'il y a aussi bien des fumeurs (50%) que des non fumeurs.

1.6 Répartition des patients selon la cause du cancer :

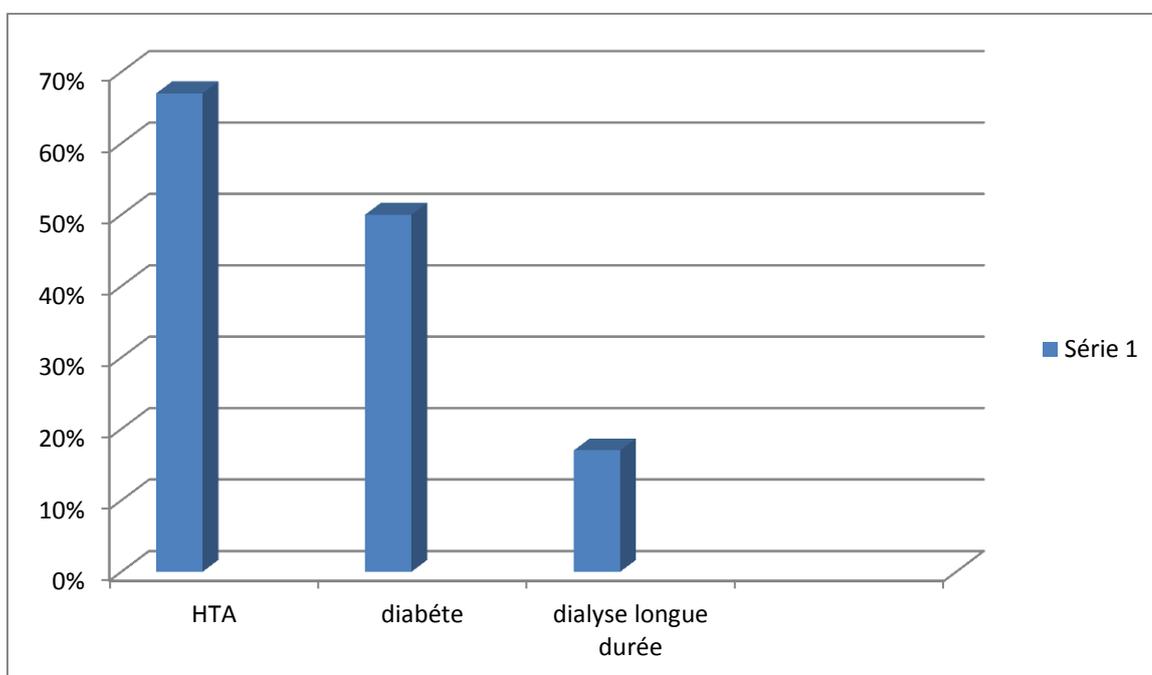


Figure 18 : Répartition des patients selon la cause de la maladie

D'après l'histogramme, on observe que l'HTA est le facteur de risque le plus répondu par rapport au diabète et au dialyse longue durée.

2. Etude génétique

2.1 Répartition des fréquences génotypique et allélique parmi les patients et les témoins :

Tableau 5 : Répartition des fréquences génotypique et allélique parmi les patients et les témoins

Génotype	Patients		Témoins		OR	P value
	n	%	n	%		
CC	1	16,67	2	16,67	-	-
CT	3	50	6	50	1,00 (0,03-42,59)	0,47
TT	2	33,33	4	33,33	1,00 (0,02-52,10)	0,45
Allèle C	5	41,67	10	41,67	-	-
Allèle T	7	58,33	14	58,33	1,00 (0,05-33,57)	0,51
Total	6	100	12	100	-	-

D'après ce tableau qui montre que 16,67% des patients était homozygotes (CC) pour la MTHFR, et 50% des patients était hétérozygotes (CT), alors que les génotypes homozygotes (TT) représentent 33,33%. En ce qui concerne les fréquences des témoins, nous avons trouvé les mêmes fréquences pour les génotypes (CC), (CT) et (TT). Il n'y avait aucune différence statistique significative dans la distribution des allèles et des génotypes chez les deux populations. Le tableau révèle que l'allèle T est prédominant de (58,33) vs (41,67) chez les patients et les témoins.

Après les calculs des Odds ratio et de P valeur (OR et $P \geq 0,05$), nous pouvons conclure qu'il n'existe pas d'association significative entre le polymorphisme C677T et le cancer du rein.

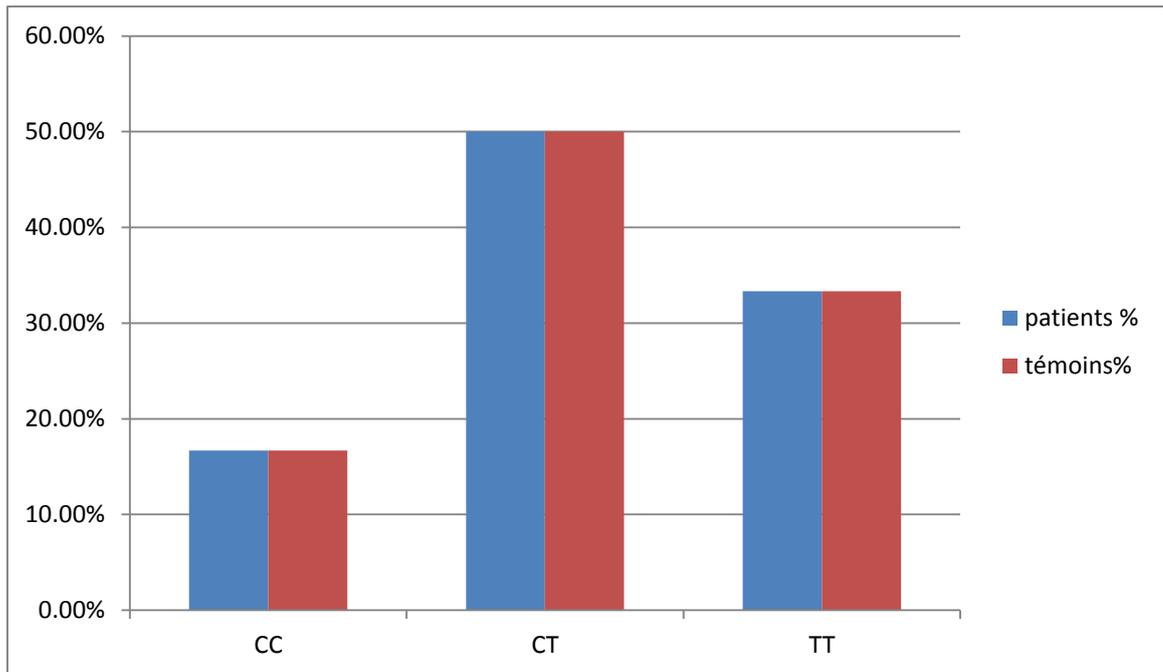


Figure 19 : Répartition des fréquences génotypiques chez les patients et les témoins

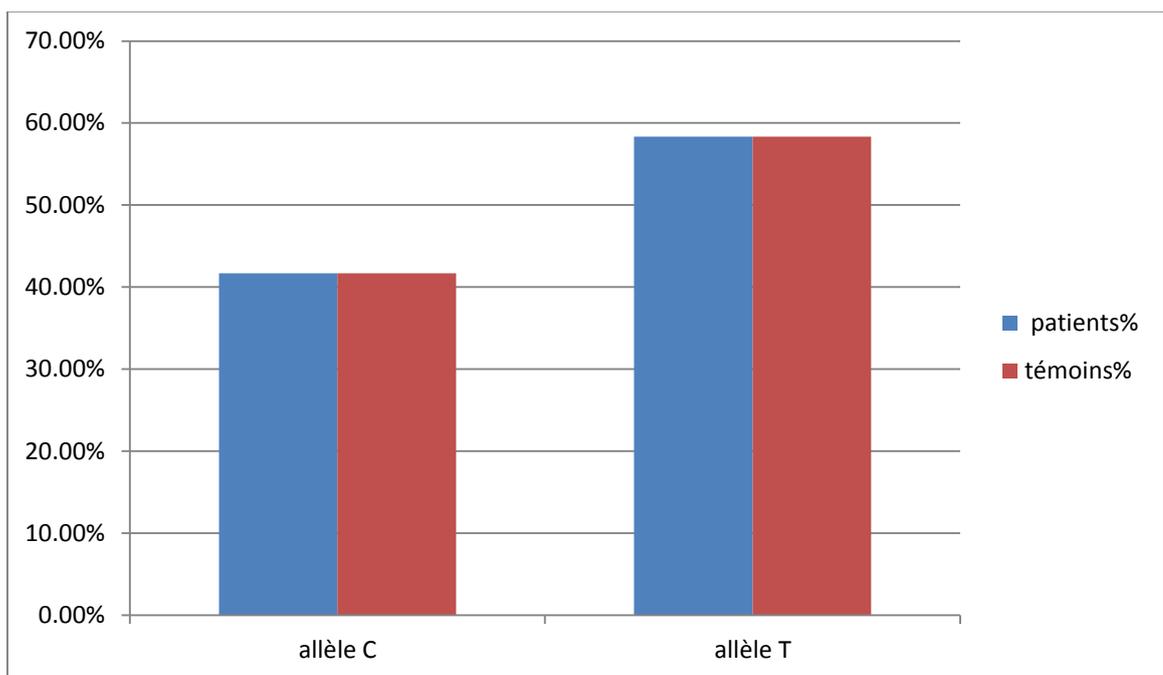


Figure 20 : Répartition des fréquences alléliques chez les patients et les témoins

Malgré le développement médical important et les recherches impliquées ces dernières années, le cancer du rein reste l'un des causes de mortalité chez l'être humain.

Ces recherches ont conclu que les cancers peuvent avoir une origine génétique et une origine environnementale. De nombreuses études ont mis en évidence le rôle de facteur génétique dans la survenue du cancer.

Les polymorphismes génétiques pourraient expliquer partiellement l'étiologie sous-jacente de nombreuses pathologies cancéreuses.

La MTHFR, enzyme clé du métabolisme des folates est impliquée dans la synthèse d'ADN, sa réparation et sa méthylation. On peut aisément concevoir le fait que de nombreuses recherches ont été orientées dans ce sens.

Pour rechercher d'éventuelles associations entre le polymorphisme C677T du gène du MTHFR et le risque du cancer du rein, nous avons réalisé une étude moléculaire chez des patients présentant un cancer du rein.

D'après nos résultats, nous avons constaté que le cancer du rein touche les deux sexes d'une façon égale, le contraire a été prouvé par *Charles et al* (2010) qui a montré que le cancer du rein touche majoritairement les hommes, ce qui veut dire que le sexe ratio est deux fois plus fréquent chez les hommes que chez les femmes selon cette étude (16).

Selon nos données et qui montrent que le risque d'avoir un cancer du rein augmente beaucoup plus avec l'âge à partir de 60ans. Mais le contraire chez *Negrier et al* (2012) qui ont montré qu'il est possible de rencontrer la maladie chez des patients jeunes vers 40 ans, et plus rarement chez les moins de 40 ans (17).

La présence des antécédents familiaux comme c'est le cas dans notre échantillon peut conduire à un risque élevé d'apparition d'un cancer du rein et ceci a été confirmé par *Goris et al*. (2012). Les apparentés du premier degré d'un patient atteint de cancer du rein ont deux fois plus de risque d'avoir un cancer du rein que les autres (18).

La consommation d'alcool selon *Charles et al* (2010) et qui a prouvé que l'alcoolisme modéré semblerait associé à une diminution de l'incidence de CCR. Mais dans notre résultat on a trouvé une faible consommation d'alcool. (16)

Le rôle du tabac dans le développement des tumeurs rénales est clairement établi et celui-ci représente le principal facteur de risque de cancer du rein comme c'est le cas dans notre étude et qui montre un nombre élevé des fumeurs parmi les cancéreux. Ceci est en accord avec *Morere et al* qui a confirmé que le tabagisme a un effet très important sur l'apparition de cancer du rein avec un taux d'incidence multiplié par deux chez les fumeurs (19).

L'hypertension artérielle (HTA) dans notre étude est la maladie la plus représentée dans notre échantillon, selon nos résultats, on peut dire que l'HTA est l'un des facteurs de risque les plus importants qui peut conduire à l'apparition du cancer du rein, *Culine et Patard* (2008) qui ont confirmé cette association, et qui ont considéré que l'HTA est un facteur de causalité de la survenue d'un cancer du rein. (20)

D'après nos résultats, la dialyse pendant une longue durée (plus de 3 ans) est considérée comme un facteur de risque et ce qui a été confirmé par *Culine et Patard* (2008) qui ont montré que le risque d'avoir la maladie est très élevé par rapport à la population générale et augmente avec la durée de dialyse. (20)

La MTHFR a été toujours considérée comme une étude importante des polymorphismes associée avec le développement d'une pathologie cancéreuse.

L'association entre le polymorphisme C677T du gène de la MTHFR et le risque du cancer du rein a été traitée dans plusieurs études. Selon nos résultats on n'a pas trouvé d'association.

L'étude de *safarinejad et al* (2012) et qui a été appliquée sur une population composée de 152 patients IRANIENNE a prouvé qu'il y a une relation entre le variant C677T du gène de la MTHFR et le cancer du rein.(21).

Les résultats de *sakano et al* (2010) obtenus après une étude réalisée sur 240 patients d'une population japonaise ont prouvé qu'il y a une association(22) ainsi que celle de *moor et al* (2008) faite sur 1097 cas entre l'âge de 20 ans et 79 ans a également démontré qu'il y a une association entre ce gène et la pathologie.(23).

Cependant, une autre étude effectuée par *ferrara et al* (2009) en Italie montre que la mutation C667T influe sur le métabolisme du folate ou il y a un risque très élevé de développer un CCR. (24).

En résumé on ne peut pas confirmer nos résultats car La taille de la population est relativement faible, de ce fait la puissance statistique insuffisante pour mettre en évidence des effets modestes pourrait en partie expliquer la discordance des résultats.

Les études menées sur une éventuelle association entre le polymorphisme de la MTHFR et l'occurrence de pathologie (cancéreuse ou autres) doivent être menés sur des échantillons de grande de tailles et comparer avec une population témoin de taille conséquente.

Dans notre travail, nous avons entrepris une étude transversale de type cas témoins qui a portée sur une population malade de 6 sujets et de 12 témoins présumés sains tout sexe confondu, afin de prospecter l'éventuelle relation entre le polymorphisme C677T de la MTHFR et le risque de développer un cancer du rein. Les résultats du génotypage obtenus par PCR/Digestion et révélés sur les profils électrophoretiques, ont été comparés avec une population témoin et n'ont montré aucune association significative entre l'incidence du cancer du rein et le facteur de risque étudié, ces résultats ne peuvent pas conclure l'absence de relation entre le polymorphisme étudié et l'apparition de cancer du rein. En effet, la taille de notre échantillon n'est pas suffisante pour en tirer des conclusions cohérentes.

Donc il serait intéressant dans l'avenir de poursuivre l'étude du polymorphisme C677T de la MTHFR dans le cancer du rein en utilisant un échantillon de taille suffisante.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Berthet j.,Amar-Costessec A.,Dictionnaire de biologie.Physiologie Humaine. sherwood. 2006 :2-915236-27-5.
2. A.Delmas,Anatomie humaine.1981.parie ;548-686.
3. T.Charles,V.Lindner,A.Matau,Roy,H.Cancer du rein.EMC.2010.18-096-A-10.
4. Méjean A. Tumeurs du rein . Épidémiologie. Prog Urol 2003;13:1193.
5. Coulange C, Rambeaud JJ. Cancer du rein de l'adulte. Épidémiologie. Prog Urol 1997;7:755-762.
6. Jemal A, Siegel R, Ward E. Cancer statistics. CA Cancer J Clin 2008;58:71-96.
7. Méjean A, Correas JM, Escudier B. Tumeurs du rein. ProgUrol 2007;17:1099-144.
8. Poisson JF, Méjean A, Hupertan V. Tumeurs du rein. 2005;15: 1056-61.
9. Levi F, Lucchini F, Negri E. Declining mortality from kidney cancer in Europe. 2004;15:1130-5.
10. Stéphane Richard. Séminaire de formation médicale continue Rein et cancer. 2013.
11. Feige JJ (2009), édité par John Eurotext et Amgen. L'angiogenèse : Les facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire et leur récepteurs, Montrouge, France, chap.1,2-17.
12. Everts JJ, Walker CL, Goldsworthy TW, Wolf DC. Altered expression of transforming growth factor- α : an early event in renal-cell carcinoma development. Mol carcinog 1997;19:213-9.
13. Saffroy, Lemoine A, Debuire B. MTHFR (5,10 méthylénetetrahydrofolate-réductase) Atlas genet cytogene oncol hemathol.2005).
14. Lorenzo D, Botto D, Yang Q. 5,10méthylénetetrahydrofolate(MTHFR) gene variant and congénitale anomalie.epidemiol(2000) ;1 ;151(9) :862 -87.
15. Goyette P. , Pai A, Milos R, Frost P, Tran P, Chen Z, Chan m, Rozen R (1998). Gene structure of human and mouse méthylénetetrahydrofolate réductase (MTHFR).mamm. genome 9 :652-656.
16. Frost P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJH, den Heijer M, Kluijtmans LAJ, van den Heuvel L & Rozen R (1995). A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Nat. Genet. 10: 111-113.
17. Goyette P, Christensen B, Rosenblatt DS, Rozen R. Severe and mild mutations in cis for the methylene-tetrahydrofolate-reductase (MTHFR) gene, and description of five novel mutations in MTHFR. Am J Hum Genet.1996; 59 : 1268-75.

18. Yamanda, K. Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylene-tetrahydrofolate reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001; 98 : 14853–14858.
19. Robien K, Cornelia M. , Ulrich C. 5, 10-Methylene-tetrahydrofolate-reductase Polymorphisms and Leukemia Risk. *Epidemiol.* 2003; 157 (7) :571-82.
20. National center for Biotechnology information, U.S. National library of Medicine 8600 Rockville Pike , Bethesda MD, 20894 USA.
21. Lamiell J.M., Salazar F.G., Hsia Y.E. Von Hippel-Lindau disease affecting 43 members of a single kindred. *Medicine*, 1989;68: 1-29.
22. Linehan WM, Shipleyw, Parkinson D, Edited by VT, deVita S, Hellman E, Rosenberg. Cancer of the kidney and urethra. In *Cancer Principles and Practice of Oncology*. Philadelphia: Lippincott. 1989; 979-1007.
23. Olschwahn S, Boisson C, Richard S, Resche F, Thomas G. by linkage analysis. *Eur. J. Hum. DNA based presymptomatic diagnosis for the Von Hippel-Lindau disease. Genet.* 1995; 3:108-115.
24. Wagner JR, Linehan WM. Molecular genetics of Renal cell carcinoma. *Sem. Urol. Oncol.* 1996; 14:244-249.
25. Jean-Louis Amiel, Jaques Rouessé, David Machover. *Abrégé de cancérologie*. Masson, Paris 1976 :2-225-43285-6.
26. Butler. Smoking and Singapore Chinese. *Cancer causes control. Bec*, 2009 ;20(10) : 1967-74.
27. Charles T, Lindner V, Maton A, Roy C, Lang H. cancer du rein. *EMC*.18-096-A-10,1010
28. Sylvie Négrier. *Le cancer du rein. A.R.T.U.R.* 2012 ;15.
29. Goris Gbenou, Flekon, Baldé, Boyle, Laroy, Romy, Rioux, Leclercq. *Les tumeurs rénales*. Fling publisher, 2012.
30. Jean-François Morère, Françoise Mornex, Denix Soulière. *Thérapeutique du cancer*. Springer-Verlag France.2011 ;78 :2-8178-0020-2.
31. Stéphane Culine, Jean Jacques Patard. *Cancer du rein*. Springer-Verlag France, Paris. 2008.
32. Safarinejad MR, Shafiei N, Safarinejad S, Methylene-tetrahydrofolate-reductase (MTHFR) gene C677T, A1298C and G1793A polymorphisms: association with risk for clear cell - renal cell carcinoma and tumour behaviour in men. *Clin Oncol.* 2012;24(4):269–281.
33. Sakano S, Hinoda Y, Okayama N Gender-specific association of methylene-tetrahydrofolate-reductase-genotype and haplotype with the aggressiveness and prognosis of clear cell renal cell carcinoma in Japanese patients. *BJU Int.*2010;106(3):424–430.

34. Moore LE, Hung R, Karami S, Folate metabolism genes, vegetable intake and renal cancer risk in central Europe. *Int J Cancer*. 2008;122(8):1710–1715.

35. Ferrara M, Capozzi L, Russo R, Impact of the MTHFR C677T polymorphism on risk of Wilms tumor: case-control study. *J Pediatr HematolOncol*. 2009 ;31(4):256–258.

Sites web

- [http://www .ikonet.com](http://www.ikonet.com) .
- [http://www.Le cancer.com/Le –cancer-du-rein](http://www.Le cancer.com/Le -cancer-du-rein).
- <http://www.faceauxcancers.fr>.
- <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/kidney/path>.
- [http://www . gustaveroussy. fr](http://www .gustaveroussy. fr).

Questionnaire

***pour un patient :**

1/Renseignement :

*Nom :

*Prénom :

*Date et lieu de naissance :

*Age :

*Poids :

*Profession :

*Lieu ou service du prélèvement :

*Hôpital :

*Le médecin traitant :

2/Les facteurs de risques :

a/Le tabagisme :

*Cigarette Nbr Jour

Fumeur pendant mois/ans

Ex fumeur pendant mois/ans

*Tabac a chiqué Nbr / jour

Chique pendant mois/ans

Ex chique pendant mois/ans

*Alcoolique fois/j/semaine

Ex alcoolique pendant mois/ans

*HTA :

*Obésité : oui non

*Stresse : au niveau du travaille familiale

*Insuffisance rénale : oui non

*Présence d'une autre maladie : oui non

*Antécédent personnel de tumeur rénale : oui non

3/ Bilan a faire :

*Radio :

*Uro scanner :

4/ la localisation de la tumeur : rein gauche rein droite

Résumé

Objectif :

Plusieurs facteurs sont impliqués dans la survenue du cancer du rein. Afin de prospecter l'implication de ces facteurs, nous avons réalisé une étude transversale type cas-témoins, dont l'objectif est de rechercher d'éventuelles associations entre le polymorphisme C677T de la MTHFR et le cancer rénal.

Patients et méthodes :

Notre étude a porté sur un échantillon de 6 patients atteints d'un cancer du rein et 12 témoins. L'extraction d'ADN génomique a été effectuée sur les leucocytes. La recherche du polymorphisme de la MTHFR a été réalisée par PCR/RFLP.

Résultats :

Le calcul des Odds ratio et des P value montre bien qu'il n'existe pas d'association entre le polymorphisme C677T de la MTHFR et le cancer du rein que soit pour le génotype CT ($P=0,47$) ou pour le génotype TT ($P=0,45$).

Conclusion :

Les résultats de notre étude sur la répartition génotypique du polymorphisme C677T de la MTHFR ne montre aucune association entre ce polymorphisme et le cancer du rein.

Summary

Objective

Several factors are involved in the onset of renal cancer. To explore the role of these factors, we performed a cross-sectional case-control study; the aim is to investigate possible associations between MTHFR C677T polymorphism and renal cancer.

Patients and methods:

Our study focused on a sample of 6 patients with kidney cancer and 12 controls. The genomic DNA extraction was performed on leukocytes. The search for the MTHFR polymorphism was realized by PCR / RFLP.

Results:

The calculation of the odds ratio and P value shows that there is no association between MTHFR C677T polymorphism and kidney cancer than either the CT genotype ($P = 0,47$) or genotype TT ($P = 0,45$).

Conclusion:

The results of our study of the genotypic distribution of MTHFR C677T polymorphism showed no association between this polymorphism and kidney cancer.

الملخص

الاهداف:

تشارك عدة عوامل في حدوث سرطان الكلى. أجرينا دراسة مستعرضة من اجل دراسة بعض عوامل الخطر و توضيح ما إذا كان هناك وجود علاقة أم لا بين تعدد الأشكال MTHFR و سرطان الكلى.

مرضى و طرق:

دراستنا تمركزت على 6 مرضى يعانون من سرطان الكلى و 12 من الاصحاء. تم إستخراج الحمض النووي الجيني من الكريات البيضاء ثم إجراء التتميط الجيني للجين MTHFR باستخدام طريقة PCR /DIGESTION .

النتائج:

حسب نتائج الأرجحية و قيمة P تبين أنه لا يوجد أي ارتباط بين تعدد الأشكال C667T من MTHFR و سرطان الكلى سواء بالنسبة للنمط الجيني CT (P=0,47) أو النمط الجيني TT(P=0,45)

الإستنتاج:

نتائج دراستنا على التوزيع الوراثي حول تعدد الأشكال C667T من MTHFR لا يظهر أي ارتباط بين هذا التعدد و سرطان الكلى.

Etude du polymorphisme c677t de la méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR) associé au cancer du rein

Objectif :

Plusieurs facteurs sont impliqués dans la survenue du cancer du rein. Afin de prospecter l'implication de ces facteurs, nous avons réalisé une étude transversale type cas-témoins, dont l'objectif est de rechercher d'éventuelles associations entre le polymorphisme C677T de la MTHFR et le cancer rénal.

Patients et méthodes :

Notre étude a porté sur un échantillon de 6 patients atteints d'un cancer du rein et 12 témoins. L'extraction d'ADN génomique a été effectuée sur les leucocytes. La recherche du polymorphisme de la MTHFR a été réalisé par PCR/RFLP.

Résultats :

Le calcul des Odds ratio et des P value montre bien qu'il n'existe pas d'association entre le polymorphisme C677T de la MTHFR et le cancer du rein que soit pour le génotype CT (P=0,47) ou pour le génotype TT (P=0,45).

Conclusion :

Les résultats de notre étude sur la répartition génotypique du polymorphisme C677T de la MTHFR ne montre aucune association entre ce polymorphisme et le cancer du rein

Jury d'évaluation :

Président du jury : *satta Dalila* (professeur- université des frères mentouri Constantine).
Rapporteur : *rezgoune –chellat djalila* (MC .B université des frères mentouri Constantine).
Examineur : *semmam warda* (MA.A université des frères mentouri Constantine).

Soutenu publiquement le 01/07/2015