



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie Animale

قسم : بيولوجيا الحيوان

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Génétique Moléculaire*

Intitulé :

Étude de la relation entre le Cancer du Pancréas, et le Polymorphisme *C677T* de la méthylène tétrahydrofolate réductase (*MTHFR*) dans l'Est Algérien

Présenté et soutenu par : BENIDIR Amira

Le : 15/06/2016

OMEICHE Cheims El Asil

Jury d'évaluation :

Président du jury : Pr SATTI Dalila (Pr - UFM Constantine).

Rapporteur : Melle BENLATRÈCHE Moufida (MAA - UFM Constantine).

Examineurs : Mer REZGOUNE Mohamed Larbi (MAA - UFM Constantine).

*Année universitaire
2015 - 2016*

REMERCIEMENTS

*Nos vifs remerciements et notre profonde gratitude,
aux membres du jury ayant présidé à la soutenance de notre mémoire :*

- *Notre encadreuse : Mlle. Moufida Benlatrèche, dont le sens de l'écoute l'humanisme et la disponibilité aura fait que nous avons à faire à une maman, plutôt qu'un professeur.*
- *Madame Satta Dalila*
- *Monsieur Mohamed Larbi Rezgoun.*
- *Monsieur Filalli*

Ainsi qu'à l'ensemble du corps des enseignants nous ayant accompagnés tout au long de notre cursus universitaire à l'Université des frères Mentouri de Constantine ; sans omettre également l'ensemble du corps administratif qui, avec abnégation aura rendu notre séjour à l'Université autant agréable que possible.

L'enseignement de haute qualité qui nous a été dispensé à l'Université des frères Mentouri de Constantine, restera pour nous un trésor que nous espérons enrichir par l'expérience sur le terrain.

DEDICACES

A ma maman qui, par ses encouragements et son abnégation n'a eu de cesse à me pousser de l'avant dans mes études.

A mon papa qui, avec patience et discrétion n'a eu de cesse à veiller à mon confort afin que je réussisse.

Mes sœurs et frères pour leur compréhension et leur sollicitude toutes ces années.

Mon mari Abd el Malek.

s oncles paternels et maternels qui, n'ont eu de cesse à m'encourager tout au long de mes études,

Mon beau-père Allaoua Ben M'Hidi, pour sa compréhension et ses encouragements,

Au professeur Amrani Lakhdar,

A mon encadreuse, Mlle Moufida Benlatrèche.

De Chams Omeiche

DEDICACES

A mes parents pour toutes les souffrances qu'ils ont endurées pour nous assurer une bonne éducation et nous permettre une vie décente.

A mes belle sœurs, A mes chers frère pour son soutien et ses conseils.

A mes très chère adorable : Dounia, Yasmin, Khaouila ma source d'amour et d'affection.

A mes meilleurs amis.

A toutes les personnes qui ont participe de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail.

A toutes les personnes qui m'ont dit « Non ».

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements a mon encadreuse, Mlle Moufida Benlatrèche, qui a bien voulu, par son aimable bienveillance, diriger ce travail qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect.

De Benidir Amira

Liste des figures	Page
Figure 1 : rapports et situation du pancréas.	09
Figure 2 : histologie du pancréas.	11
Figure 3: Voies de signalisation intracellulaires activées par Ras.	18
Figure 4 : Voie de signalisation des Protéines SMADs.	20
Figure 5: Ce schéma nous montre les mises en place des régulations par le gène CDKN2A qui code pour deux transcrits différents (alpha et bêta) qui codent pour deux protéines : p16 INK4a et p14ARF.	21
Figure 6 : Localisation du gène MTHFR sur le chromosome 1.	23
Figure 7 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % des fragments amplifiés (198 pb) par PCR du gène MTHFR.	31
Figure 8: site de restriction par l'enzyme Hinf I.	31
Figure 9 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments issus par clivage deHinfI présentant différents génotypes d'MTHFR.	33
Figure 10 : Répartition des Cancereux selon le sexe.	37
Figure 11 : Répartition en tranche d'âge des patients.	39
Figure 12 : Répartition des fréquences génotypiques dans la population de Témoins et dans les Cancéreux.	41
Figure 14 : Répartition des fréquences alléliques de la MTHFR dans la population témoin et dans les Cancéreux.	42

Liste des tableaux	Page
Tableau 1: Les différents types de cancer pancréatique endocrine.	12
Tableau 2: Les différents types de cancer pancréatique exocrine.	13
Tableau 3 : Illustration de la classification.	15
Tableau 4 : Mutations du gène KRAS les plus fréquentes.	19
Tableau 5 : Moyennes d'âge.	38
Tableau 6 : Répartition en Tranche d'âge.	39
Tableau 7 : fréquence génotypique du polymorphisme C677T de la MTHFR.	40
Tableau 8 : Fréquences alléliques de la MTHFR dans la population malade et témoins.	42
Tableau 9 : Calcul des Odds ratio des sujets malades ayant un allèle T par rapport aux témoins ayant un génotype CC.	42

Sommaire	Page
Résumé.	01
Introduction.	04
Partie bibliographique.	06
1.1. Historique.	06
1.2 Anatomie descriptive du pancréas	08
1.3. Histophysiologie du pancréas	09
2.1. le cancer du pancréas	11
2.1.2. Tumeurs endocrines du pancréas	12
2.1.2. Tumeurs exocrines du pancréas	13
2.2. Epidémiologie	13
2.3. Les facteurs des risques	14
2.3.1. Facteurs environnementaux	14
2.3.2. Facteurs pathologiques	14
2.3.3. Facteurs familiaux	14
2.4. CLASSIFICATION T.N.M (2014-2015)	15
3.1. LES VOIES MOLECULAIRES DU CANCER DU PANCREAS	17
3.1.1. Le récepteur à l'EGF (EGFR)	17
3.1.2. Voie RAS/MAPK	17
3.2.2.3. Voie MAPK/ERK	19
3.1.2. LA VOIE TGFβ/SMAD4	19
3.2.3. Les voies des gènes suppresseurs de tumeurs CDKN2A, p53	21
3.2. La MTHFR	22
3.2.1. La protéine MTHFR	22
3.2.2. Gène de la MTHFR	23
PATIENTS ET METHODE	26
1. Recrutement des sujets	26
2. Prélèvement	26
3. Questionnaire et Enregistrement	27

4. Manipulations sur le sang total	27
4.1.Extraction de l'ADN	28
5. Génotypage de la MTHFR	29
5.1.La PCR (Polymérase Chaîne Réaction)	29
5.1.1. Préparation du milieu réactionnel (ou mix) de PCR	29
5.1.2. Déroulement des cycles de la PCR	30
5.1.3. Contrôle des produits de la PCR	30
5.2. Digestion des produits de PCR	31
5.1. Digestion par l'enzyme de restriction HinfI	31
5.2. Conditions de migration	31
5.3. Révélation du profil électrophorétique	32
6. Analyse statistique	33
6.1. Statistique descriptive	33
6.2. L'enquête analytique	33
6.3. Calcul de l'odds ratio	34
6.4. Les intervalles de confiance	34
6.5. Choix de la "p value "	35
Résultats et discussion	36
1. Aspect Clinique des patients atteints d'un cancer du pancréas	36
2. Âge et Sexe Ratio	37
3. Moyennes d'âge	38
4. Répartition en Tranche d'âge	39
5. Répartition des fréquences génotypiques dans les deux groupes	41
6. Répartition des fréquences alléliques dans les deux groupes	42

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN :	Acide Désoxyribonucléique.
ARF :	Alternate Reading Frame.
ARN :	Acide Ribonucléique.
BET :	Bromure d'Ethidium.
CDKN2A :	CyclinDependant Kinase inhibitors2A.
CDK:	CyclinDependant Kinase.
DO :	Densité Optique.
DPC4 :	Deleted in Pancreatic Cancer locus 4.
EDTA :	Ethylenediaminetetraaceticacid.
EGF :	Epidermalgrowth Factor.
EGFR :	Epidermalgrowth factor receptor.
ERK :	Extracellular signal-Regulated Kinase.
FAMM :	Familial Atypical Multiple Mole Melanoma.
GTP :	GuanosineTriPhosphate.
GDP :	GuanosineDiPhosphate.
HCY :	Homocystéine.
HER :	HumanEpidermalgrowth factor Receptor.
Hinf I :	Haemophilusinfluenzae I.
HNPCC :	Héreditary Non Polyposis Colorectal Cancer.
KDa :	Kilo Daltone.
K-ras :	Kirsten-ras.
MAPK :	Mitogen-activatedprotein kinase.
MDM2 :	Double Minute 2 Protein, Mouse.
MTHFR :	Methylenetetrahydrofolatereductase.
NEM :	Néoplasie endocrinienne Multiple.
NF-κB :	Nuclear Factor-kappa B.

Pan IN : PancréaticIntraepithelialNeoplasia.

PCR : Polymerasechainreaction.

PDAC : PancreaticDuctalAdenoCarcinoma.

PP : Polypeptide Pancréatique.

RAS : Kirsten rat sarcoma viral oncogenehomolog.

Rb : Rétinoblastome.

RFLP : Restriction Fragment LengthPolymorphism.

SDS : Sodium Dodécyle Sulfate.

SMAD4 : Smaand MAD-relatedprotein.

SOS : Son Of Sevenless.

TGF α : TransformingGrowth Factor α .

TGF- β : TransformingGrowth Factor- β .

TIPMP : Tumeur Intra canalaire Papillaire et Mucineuse du Pancréas.

TNM : Tumeur primitive, node, metastases.

VIPome : VascularEndothelialPeptidome.

Résumé

L'objectif de cette étude a été de déterminer la relation entre la mutation C677T de la MTHFR, et la survenue d'un cancer du pancréas dans, l'est, Algérien.

Les résultats de notre étude montrent que les deux génotypes C/T, et C/C présentent la même fréquence, dans les deux populations, témoins, et cancéreux, 33,33%, 37,5% respectivement.

Le génotype homozygote muté TT, correspond à une fréquence de 25 % chez les cancéreux, et de 27,78 % chez les témoins; Ainsi l'allèle T présente une fréquence de 43,75 % chez les cancéreux ; alors que chez les témoins, sa fréquence est de 44,44 %.

À ce stade de notre travail nous ne pouvons tirer des conclusions en ce qui concerne l'implication, de l'allèle T, et la survenue, d'un cancer de pancréas, et/ou la localisation de l'atteinte, au niveau de l'organe, en question, comme rapporté dans la littérature.

Les travaux doivent se poursuivront, en réalisant des études multicentriques; il nous apparait intéressant d'élargir l'échantillon, en étudiant ce polymorphisme avec d'autres facteurs génétiques et non génétiques, pour qu'on puisse élucider l'étiologie de ces complexes pathologies.

Mots Clés : Cancer du Pancréas- MTHFR- Polymorphisme C677T

Abstract

The objective of this study was to determine the relationship between the C677T mutation of MTHFR, and the occurrence with pancreatic cancer in the east Algerian.

The results of our study indicate that both genotype CT and CC have the same frequency in both populations, witnesses, and cancer, 33.33%, 37.5% respectively.

The homozygous mutant TT corresponds to a frequency of 25% in cancer patients, and 27.78% in controls; thus the T allele has a frequency of 43.75% in cancer; whereas in controls, it's frequency is 44.44%.

At this stage of our work we can not draw conclusions regarding the involvement of the T allele and the occurrence of a cancer of the pancreas, and/or location of the interference, at the organ in question, as reported in the literature.

The research must continue in order to increase the sample by studying this polymorphism with other genetic and non-genetic factors. We can clarify the etiology of these complex diseases.

Keywords: Cancer Pancréas- C677T polymorphism -MTHFR

ملخص

الهدف من هذه الدراسة كان تحديد العلاقة بين الطفرة C677T من MTHFR ، و سرطان البنكرياس في الشرق الجزائري .

اشارت نتائج دراستنا أن كلا من النمط الجيني CT و CC لها نفس النسبة في كل مجموعة :الاصحاء، و مرضى السرطان، 33.33%، 37.5% على التوالي.

يتواجد النمط الجيني TT بنسبة 25% عند مرضى السرطان، و 27.78% عند الاصحاء. و الاليل T يتواجد بنسبة 43.75% عند المرضى. في حين أن نسبته تقدر ب 44.44% عند الاصحاء.

عند هذا المستوى لا يمكننا استخلاص نتائج أخرى بشأن تواجد الاليل T و حدوث سرطان البنكرياس او تحديد مكان الإصابة بالسرطان على مستوى العضو في حد ذاته (البنكرياس) عند حدوث الطفرة الوراثية (الاليل T)

الابحاث يجب أن تستمر و ذلك بإجراء دراسات في مراكز بحث متعددة على مستوى الوطن و بذلك يتسنى لنا توسيع العينة و دراسة تأثير مرض سرطان البنكرياس بعوامل أخرى وراثية و غير وراثية، كل هذا يمكننا من توضيح أسباب هذه الأمراض المعقدة .

كلمات المفتاحية: السرطان البنكرياس, MTHFR , متغير الجيني

Introduction

Longtemps, le cancer a été considéré comme incurable. Aujourd'hui, nombre de cancers sont guéris ou vécus comme des maladies chroniques. Pourtant, lorsqu'il est écrit au singulier, le mot garde une charge symbolique puissante, associée à des évocations particulièrement sombres. Une description de notre compréhension actuelle des cancers, sur le plan médical et biologique, invite à dépasser cette représentation.

En Algérie, 30 000 nouveaux cas de cancer sont diagnostiqués chaque année avec une augmentation de 50% du nombre de cas entre 1986 et 2000. Près de 20 000 personnes meurent du cancer chaque année [1].

Le mot cancer désigne en fait un groupe de maladies très différentes les unes des autres, c'est pourquoi on ne devrait pas parler du cancer mais des cancers au pluriel.

La maladie est décrite depuis l'Antiquité. C'est le médecin grec Hippocrate qui, en comparant les tumeurs à un crabe, leur a donné pour la première fois les noms grecs de « karkinos » et « karkinoma ». La comparaison est justifiée par l'aspect de certaines tumeurs, dont les prolongements rappellent les pattes de l'animal.

Une première façon de les classer consiste à désigner l'endroit du corps où la tumeur se forme: le poumon, le sein, la peau, ou le pancréas par exemple.

Une autre manière, plus fine, fait appel aux différents types de tissu qui constituent le corps humain.

L'apparition d'une cellule cancéreuse est liée à l'accumulation d'anomalies dans son ADN (son patrimoine génétique), elle subit des mutations. Son comportement anormal est dû au dérèglement de certains de ses gènes. L'étude génétique des cellules cancéreuses confirme que leur ADN est endommagé en plusieurs endroits, mais l'emplacement des mutations sur l'ADN - donc les gènes touchés- varie d'un malade à l'autre.

Le pancréas est une glande située derrière l'estomac, cet organe se compose d'une partie "exocrine" produisant des enzymes nécessaires à la digestion et d'une partie "endocrine" fabriquant diverses hormones dont l'insuline. Le cancer du pancréas exocrine représente la grande majorité des cas de cancers pancréatiques, les cancers du pancréas endocrine étant 20 fois moins fréquents.

Introduction

Le cancer du pancréas est un cancer relativement rare ; il reste de nos jours le cancer au pronostic le plus sombre avec 330300 décès par année dans le monde pour une prévalence de 211500 cas en 2012. Bien que des progrès aient été réalisés dans la compréhension de la physiopathologie du développement de cette néoplasie, la morbi-mortalité n'a pas été modifiée ; même dans les populations à risque sélectionnées. Ils ont néanmoins permis à certains patients à haut risque d'être diagnostiqués précocement et d'avoir donc pu bénéficier d'une prise en charge à un stade encore asymptomatique. L'impact sur le pronostic n'est cependant pas prouvé. [2].

Lors du commencement de ce travail, en Mars 2016, il était déjà connu que l'inhibition du gène de la méthylène-tetrahydrofolate réductase (MTHFR) par les ARN antisens est capable de réduire la survie des cellules cancéreuses *in vitro* et *in vivo* [3].

Ainsi que différentes études ont démontrés l'implication du polymorphisme C677T de la MTHFR dans la survenue de différentes pathologies, y compris le cancer du pancréas [4,5].

Pour ces raisons, et dans ce contexte, lors de la réalisation de notre étude on a tracé les objectifs suivants :

- ✓ Réaliser l'étude moléculaire du gène MTHFR sur notre population de cancéreux et témoins supposés sains
- ✓ Établir la fréquence du polymorphisme MTHFR au sein de la population de patients présentant un cancer du pancréas de l'est Algérien.
- ✓ Rechercher la relation entre le polymorphisme du gène MTHFR (C677T) et la survenue d'un cancer du pancréas.

Historique

Dans le monde occidental, l'histoire du cancer du pancréas remonterait au XVI car en fait la médecine expérimentale est née dans le monde musulman ; Ibn Sina et Ibn Rochd furent des chirurgiens émérites, dont s'inspirèrent les médecins de l'Europe médiévale. Malheureusement aujourd'hui, la documentation fait défaut.

En 1898, lorsque Codivilla réalisa pour la 1^{ère} fois une résection en bloc de la tête du pancréas et du duodénum. Malheureusement son patient décéda durant la période postopératoire, cette exérèse est rapportée par Sauve en 1908. Quatre années plus tard, en 1912, Kausch réalise la première exérèse duodéno-pancréatique couronnée de succès. Et depuis lors, plusieurs tentatives furent réalisées afin de combiner la résection pancréaticoduodénale. Mais ce n'est qu'en 1935 que Whipple décrit une technique de résection radicale qui depuis popularisée porte son nom.

Cette opération fut effectuée en deux temps avec la réalisation en premier lieu d'une cholécystogastrostomie pour décompresser l'obstruction biliaire, et une gastro-jéjunostomie pour soulager l'obstruction digestive. Le deuxième temps de la procédure fut réalisé après la résorption de l'ictère et l'amélioration de l'état nutritionnel, soit après plusieurs semaines. Il fut réalisé une résection en bloc de la tête du pancréas et de la deuxième portion duodénale sans rétablissement de la continuité pancréaticodigestive. Depuis lors, la duodéno-pancréatectomie céphalique devenait une procédure de routine réalisée en un seul temps.

À partir de **1937** et la réussite de la première exérèse d'un cancer de la tête du pancréas par Brunschwig, la chirurgie d'exérèse pancréatique céphalique se développe considérablement. Si bien que cet essor est marqué nettement par les statistiques car s'il y a trente à peine la duodéno-pancréatectomie céphalique était associée à une mortalité postopératoire allant de 20 à 30%, la norme aujourd'hui est passée à moins de 10%. [6]

1938 marque la désuétude de la cholécystogastrostomie et son abandon en faveur de la cholécystojéjunostomie en Y, selon Roux.

Hunt réalise en 1940 une duodéno-pancréatectomie en deux temps, Le rétablissement de la continuité pancréatico-jéjunale est fait par invagination du moignon pancréatique dans la terminaison jéjunale et la continuité biliaire est réalisée au moyen d'une anastomose bilio-entérale utilisant la voie biliaire principale au lieu de la vésicule biliaire.

En 1941, Trimble et Coll effectuent une résection duodéno-pancréatique en un temps. La continuité bilio-entérale emprunte la voie biliaire commune et il est effectué une

gastroentérostomie, d'après POLYA. Par souci d'efficacité ces praticiens chercheurs modifient leur technique en 1945, en effectuant une anastomose pancréatico-jéjunale.

Catell décrit en 1948, l'anastomose pancréatico-jéjunale término-latérale.

À partir des années soixante, la duodéno-pancréatectomie s'élargit à la résection de la partie distale de l'estomac, du pylore, de la totalité du duodénum, de la partie distale de la voie biliaire principale, de la vésicule biliaire et de la tête du pancréas avec son crochet. Le rétablissement de la continuité se fait au moyen d'une anastomose pancréatico-jéjunale término-latérale ou término-terminale, suivie d'une anastomose hépatico-jéjunale término-latérale et enfin, une gastrojéjunostomie, rapportent HOFMEISTER et POLYA.

En 1978, Treverso et Longmire introduisent le dernier raffinement technique de l'intervention de WHIPPLE en conservant le pylore.

En 1997, TRAVERSO et LONGMIRE ont introduit le dernier raffinement technique de la procédure de WHIPPLE en concevant le pylore.

1.2. Anatomie

Le pancréas est un organe profondément situé dans la cavité abdominale. Il comporte trois parties pouvant être réséquées séparément par la chirurgie. Ce sont, de droite à gauche :

- **La tête** du pancréas, située sous le foie et bordée par le duodénum (première partie de l'intestin débouchant dans l'estomac) auquel elle adhère intimement. Elle est traversée par la voie biliaire principale ou, canal cholédoque véhiculant la bile produite par le foie jusqu'au duodénum où, elle participe à la dégradation des graisses.
- **Le corps** du pancréas s'étend obliquement vers la gauche et le haut de l'abdomen en avant du rein et de la glande surrénale.
- **La queue** du pancréas, constitue l'extrémité gauche du pancréas. Elle est située à proximité immédiate de la rate et de ses vaisseaux (artère et veine splénique).

Toute la longueur du pancréas est traversée par le canal pancréatique principal, dit canal de Wirsung, collecteur des sucs digestifs fabriqués par le pancréas et déversés dans le duodénum par un orifice, appelé **papille**.

Dans un pancréas sain, le tissu pancréatique est fragile et mou. Le canal de Wirsung dont le diamètre est de 1,5 à 2 mm, explique les difficultés rencontrées parfois, pour la cicatrisation des coutures chirurgicales y pratiquées [7].

✓ Dimensions

- Longueur : 18 à 20 cm,
- Hauteur : 3 à 4 cm,
- Epaisseur : 2 cm environ,
- Poids : 80 grammes environ [7].

✓ Structure

Le pancréas est constitué d'une trame conjonctive formé d'acinis se groupant en lobules, entourant un parenchyme **exocrine** dont l'organisation est très semblable à celle des glandes salivaires.

Le parenchyme **endocrine** est réparti de façon irrégulière à l'intérieur de la glande sous forme d'îlots plus abondants dans la partie gauche par rapport à la partie droite de la glande.

Les voies excrétrices du parenchyme exocrine sont constituées par les canaux intra-lobulaires se jetant eux-mêmes dans des canalicules, venant se déverser dans les deux canaux excréteurs principaux :

- Le canal de Wirsung (ductus pancréaticus)
- Le canal de santorini (ductus pancréaticus accessorius) [7].

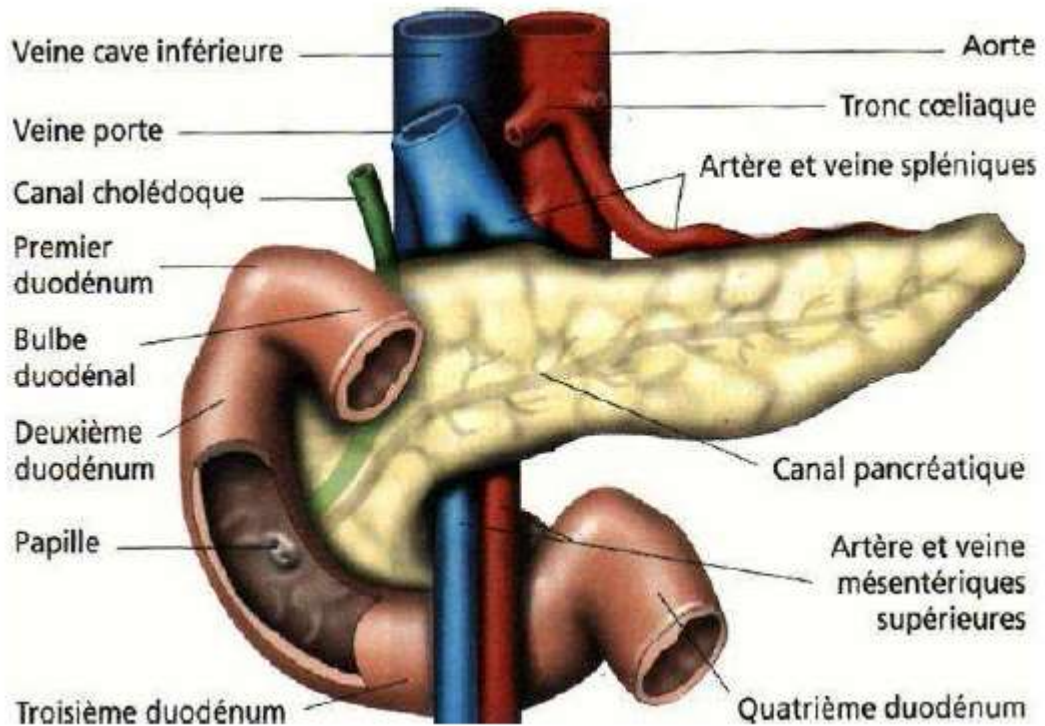


Figure N° 1 : situation et rapports du pancréas [7].

1.3. Histo-physiologie

Le pancréas humain est une glande à la fois exocrine et endocrine, composée à 99% par le tissu exocrine. Elle est formée d'un parenchyme de consistance ferme, blanc jaunâtre, dont la surface est irrégulière. Elle est entourée d'une mince bande de collagène formant sa capsule [8].

Le pancréas exocrine est constitué de cellules :

✓ *acineuses et ductales*, adoptant une structure en grappe de raisin. Les cellules acineuses plus nombreuses représentent 96 % de la masse cellulaire globale. Six à huit cellules acineuses se regroupent pour former une entité fonctionnelle appelée **acinus**. De chaque acinus émerge un petit canal dit, canal intercalaire. Plusieurs acinis, avec leurs canaux intercalaires, constituent un lobule. À l'intérieur du lobule, les canaux intercalaires se jettent

dans les canaux intra-lobulaires. Ceux-ci se rejoignent pour former à l'extérieur du lobule, un canal inter-lobulaire s'ouvrant dans le canal principal.

Les canaux intercalaires sont composés de cellules cuboïdes luminescentes, appelée cellules centro-acineuse.

✓ **Intercalaires** : particulièrement riches en anhydrase carbonique. Les cellules des canaux inter-lobulaires sont de forme pyramidale et contiennent des granules sécrétoires apicaux aux pôles. Ces granules sont formés d'asialoglycoprotéines, riches en cystéine et en tryptophane. La surface des canaux est recouverte de mucoprotéines jouant un rôle de barrière muqueuse.

Les cellules du canal pancréatique principal sont identiques à celles des canaux inter-lobulaires. Elles se caractérisent par un haut degré d'exfoliation et de renouvellement cellulaire. Les cellules exfoliées sont remplacées par de nouvelles cellules apparaissant dans la région basale de l'épithélium.

- **Le pancréas endocrine** est composé de quatre types de cellules :

✓ **Les cellules alpha** sécrétrices du **glucagon**. Situées en périphérie des îlots de Langerhans, elles représentent 15 à 20 % de la population endocrine totale.

✓ **Les cellules bêta**, forment la masse de l'îlot et représentent 60 à 80 % de la population endocrine. Elle sécrètent **l'insuline**.

✓ **Les cellules gamma**, dites à **somatostatine**, ne représentent que 5 % de la masse cellulaire.

✓ **Les cellules (pp)** très peu nombreuses, sécrètent **le polypeptide pancréatique**.

L'ensemble de ces cellules endocrines entretient des contacts directs avec les cellules de proximité environnantes [8].

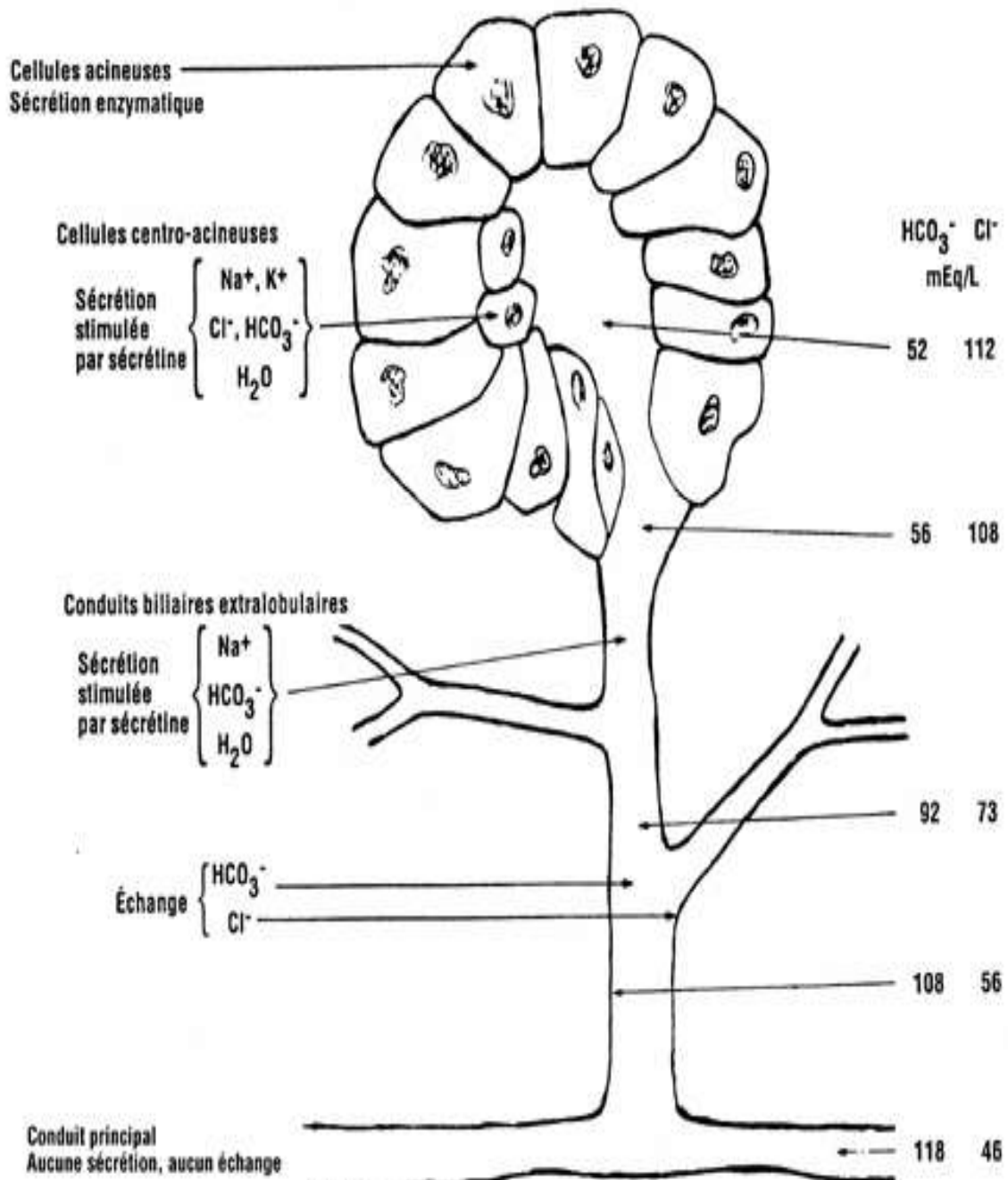


Figure N° 2 : histologie du pancréas [8].

2.1. Le cancer

Le terme « **cancer** » englobe un groupe de maladies se caractérisant par la multiplication et la propagation anarchiques des cellules anormales. Si les cellules cancéreuses ne sont pas rapidement éliminées, l'évolution de la maladie va mener, à terme, au décès du patient.

Un cancer peut être dû

- à des **facteurs externes** : mode de vie, facteurs environnementaux ou professionnels, infections,
- ou **internes** : mutations, hormones, dérèglement du système immunitaire, etc..

Ces facteurs de risques peuvent agir ensemble ou de façon successive en enclenchant ou favorisant le développement d'un ou plusieurs types des cancers [1w], dont celui du pancréas, lequel correspond, sur le plan anatomopathologique, à l'adénocarcinome pancréatique représentant 90% des tumeurs solides malignes du pancréas. Les autres types anatomo-pathologiques sont moins fréquents. Parmi les tumeurs endocrines on recense le carcinome à cellules acineuses du pancréas, le lymphome primitif du pancréas, les tumeurs mésenchymateuses et des métastases provenant de tumeurs primitives issues du sein, du rein ou du colon [9] :

	Types de cancer	Peptide sécrété	Symptômes	Localisation des tumeurs	Potentiel tumorigène
E N D O C R I N E	Gastrinome	Hypersécrétion de gastrine	Ulcères, douleurs abdominales, diarrhées, perte de poids, vomissements	Tête du pancréas, duodénum	Très souvent malignes
	Glucagonome	Hypersécrétion de glucagon	Eruption cutanée, diabète, dépression, confusion	Corps, queue du pancréas	Variable
	Insulinome	Hypersécrétion d'insuline	Hypoglycémie, confusion, tremblements, céphalées	Ensemble du pancréas	Généralement bénignes
	Néoplasie Endocrinienne Multiple (NEM) ou syndrome de Wermer	Hypersécrétion d'un ou plusieurs peptides pancréatiques	Fatigue, faiblesse ou douleur musculaire, constipation, calculs rénaux, ostéoporose précoce	Ensemble du pancréas, Glandes parathyroïdes	Peuvent être malignes dans le pancréas
	Somatostatine	Hypersécrétion de somatostatine	Diabète, douleurs abdominales, diarrées, ballonnements, lithiase biliaire, perte de poids	Ensemble du pancréas, ampoule de Vater	Variable
	VIPome	Hypersécrétion de VIP	Diarrhée, perte de poids, hypokaliémie, vomissements, douleurs abdominales	Corps, queue du pancréas	Généralement malignes
	Tumeur endocrine non fonctionnelle	Hypersécrétion d'un ou plusieurs peptides pancréatiques	Douleurs abdominales, altération de l'état général	Ensemble du pancréas	Très souvent malignes et métastatiques

Tableau N°1 : Les différents types de cancers pancréatiques endocrines.[10]

	Types de cancer	Symptômes	Localisation des tumeurs	Potentiel tumorigène
E X O C R I N E	Adénocarcinome canalaire	Douleurs abdominales, ictère, anorexie, dépression, altération de l'état général	Ensemble du pancréas	Très souvent malignes et métastatiques
	Cystadénocarcinome mucineux ou séreux	Douleurs abdominales et dorsales, vomissements, diarrhées	Ensemble du pancréas	Très souvent malignes et métastatiques
	Tumeurs acinaires	Douleurs abdominales, jaunisse, perte de poids, anémie, diarrhées	Ensemble du pancréas	Variable
	Tumeurs pseudopapillaires et kystiques	Douleurs abdominales et dorsales, perte de poids	Ensemble du pancréas	Variable
	Tumeur intra-canaulaire papillaire et mucineuse (TIPMP)	Douleurs abdominales, nausées, vomissements, perte de poids, jaunisse	Principalement dans la tête du pancréas	Variable
	Carcinome épidermoïde	Douleurs abdominales et dorsales, fatigue, douleurs abdominales, nausées, vomissements	Ensemble du pancréas	Variable
	Pancréatoblastome	Douleurs abdominales, nausées, vomissements	Principalement dans la tête du pancréas	Généralement bénignes

Tableau N° 2: Les différents types de cancers pancréatiques exocrine [10].

2.2. Epidémiologie

A l'échelle planétaire, les cancers constituent un problème majeur de santé publique. Car, en effet, on prévoit une augmentation de 45% du nombre de décès par cancer dans le monde à l'horizon 2030, soit plus de 10 millions de morts [11].

En Algérie, l'incidence des personnes atteintes, serait de 3.2/105 habitants pour l'homme et 1.7/105 habitants pour la gent féminine [12].

Le cancer pancréatique représente la cinquième cause de décès par cancer dans les pays occidentaux [13] avec une incidence plus élevée chez le sexe mâle. Le pic d'incidence du cancer du pancréas est observé à la 7ème décade. 2/3 des cas sont diagnostiqués après 65ans [12.]. Il est rare avant 50 ans (moins de 5% des cas) [14].

Dans le monde le cancer du pancréas exocrine représente 2% de l'ensemble des cancers, soit 140 000 nouveaux cas par an.

Les taux d'incidence les plus élevés sont observés en Amérique du Nord (8 nouveaux cas par an pour 100 000 hommes et 5, pour 100 000 femmes). De même qu'en Europe du Nord où, les cancers du pancréas représentent 3% de l'ensemble des cancers. Les taux d'incidence standardisés à l'Europe sont de 6,5 pour 100 000 hommes et de 3,4 pour 100 000 femmes [14].

2.3. Les facteurs de risques

2.3.1. Facteurs environnementaux :

- Environnement

Certaines toxines industrielles sont incriminées tels que hydrocarbures aromatiques polycycliques ou les insecticides organochlorés. Ils seraient associés à 5% des cancers pancréatiques [15].

- Facteurs nutritionnels

Le risque du cancer pancréatique serait lié au développement socio-économique et industriel, comme en témoigne l'incidence élevée dans les pays occidentaux.

La consommation excessive d'alcool, le régime alimentaire hypercalorique, l'obésité et l'insuffisance d'exercice physique, sont corrélés à une augmentation d'incidence de l'adénocarcinome pancréatique. En revanche, la surconsommation de café n'est pas été incriminée [15].

- Le tabagisme

Le risque relatif d'adénocarcinome pancréatique est augmenté par la consommation tabagique, avec un risque relatif de 2,2 [15].

2.3.2. Facteurs pathologiques

Certaines maladies comme le diabète ou la pancréatite chronique, pourraient jouer un rôle favorisant.

Le diabète non insulino-dépendant est en effet connu pour être une manifestation précoce de la maladie et un facteur de prédisposition. En effet, près de 20% des patients diagnostiqués pour un cancer pancréatique sont diabétiques.

Enfin, les personnes souffrant d'une pancréatite chronique calcifiante présentent un risque accru de développer un cancer du pancréas, bien que les mécanismes physiopathologiques de ce phénomène ne soient pas encore connus [16].

2.3.3. Facteurs familiaux :

Certains syndromes de cancer familial comportent aussi un risque de cancer pancréatique. Le syndrome Peutz-Jeghers par exemple, bien qu'il soit rare est une maladie familiale à transmission autosomique dominante, avec forte pénétrance du gène *STK11* porté par le chromosome 19p13.3. Il s'agit d'une polypose qui peut être diffusée à tout le tube digestif, mais prédomine généralement sur l'intestin grêle à type. La dégénérescence est exceptionnelle. Cependant, un patient atteint d'un syndrome de Peutz-Jeghers a un risque accru 18 fois, de

développer un cancer digestif ou extradigestif intéressant le pancréas, le sein, les ovaires, le poumon.

Les syndromes HNPCC (*Héreditary Non Polyposis Colorectal Cancer*) et Ataxietélangectasies, constituent des tendances à risque de cancer du pancréas, de même que le syndrome FAMM (*Familial Atypical Multiple Mole Melanoma*) et les familles de cancers du sein, avec mutation du gène *BRC* [9].

2.4. La CLASSIFICATION T.N.M

Prend en compte :

- la taille de la tumeur primitive,
- L'emplacement et nombre de ganglions lymphatiques régionaux contenant des cellules cancéreuses.
- La propagation du cancer ou métastases, vers une autre partie du corps [8]

Tableau 3 : Illustration de la classification N °[8].

Tumeur primitive (T)
TX Impossible d'évaluer la tumeur primitive
TO Aucun signe de tumeur primitive
Tis Carcinome in situ
T1 Tumeur limitée au pancréas, d'un diamètre de plus de 2 cm ou moins
T2 Tumeur limitée au pancréas, d'un diamètre de plus de 2 cm
T3 Tumeur qui s'est propagée aux tissus voisins mais pas aux gros vaisseaux sanguins à proximité
T4 Tumeur qui s'est propagée au-delà du pancréas jusqu' aux gros vaisseaux sanguins à proximité
Ganglions lymphatiques régionaux (N)
Nx Impossible d'évaluer les ganglions lymphatiques régionaux
NO Absence de métastases dans les ganglions lymphatiques régionaux
N1 Présence de métastases dans les ganglions lymphatiques régionaux
Métastases à distance (M)

MO Absence de métastases à distance
M1 Présence de métastases à distance
Stadification UICC – cancer du pancréas :
Stade 0 Tis N0 M0 On trouve des cellules anormales seulement dans le revêtement du pancréas (aussi appelé carcinome in situ).
Stade IA T1 N0 M0 La tumeur se trouve seulement dans le pancréas et mesure 2cm ou moins.
Stade IB T2 N0 M0 La tumeur se trouve seulement dans le pancréas et mesure plus de 2cm
Stade IIA T3 N0 M0 Tumeur qui s'est propagée aux tissus voisins mais pas aux gros vaisseaux sanguins à proximité
Stade IIB T3 N0 M0 La tumeur se trouve dans le pancréas ou s'est propagée aux tissus voisins mais pas aux gros vaisseaux sanguins à proximité. La tumeur s'est propagée aux ganglions lymphatiques régionaux
Stade III T4 Tout M0 La tumeur s'est propagée au-delà du pancréas jusqu'aux gros vaisseaux sanguins à proximité. La tumeur peut s'être propagée aux ganglions lymphatiques régionaux.
Stade IV Tout T Tout N M1 Le cancer s'est propagé vers des emplacements éloignés, comme le foie, un poumon ou la cavité abdominale.

3.1. LES VOIES MOLECULAIRES DU CANCER DU PANCREAS

Selon les données de la littérature, 12 voies moléculaires sont impliquées dans le cancer du pancréas mais les plus fréquentes sont : les voies K-ras, smad4, CDKN2A et p53.

1. La voie RAS/MAPK

1.1. Le récepteur EGFR

L'activation de RAS est déclenchée par l'intermédiaire de récepteurs membranaires dont l'EGFR, la famille des récepteurs EGFR (*Epidermal growth factor receptor*). comporte quatre récepteurs apparentés :

- EGFR ou HER1 (erb-B1),
- HER2 (erb-B2/neu),
- HER3 (erb-B3), et,
- HER-4 (erbB4).

L'EGFR est composé d'un domaine extracellulaire assurant la fixation avec le ligand, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire effecteur tyrosine-kinase. Il est monomérique à l'état basal. L'EGFR possède plusieurs ligands, principalement l'EGF et le TGF α (*Transforming Growth Factor α*). La fixation du ligand sur le récepteur entraîne l'activation de plusieurs voies de signalisation intracellulaires, une voie majeure activée par EGFR c'est la voie RAS/RAF/MAPK responsable de la transcription de molécules induisant la prolifération, la survie et une transformation maligne.

La transformation de ces cellules par EGFR est dépendante de la présence d'EGF exogène alors que la transformation médiée par HER2 est directement liée au niveau d'expression de l'oncogène. La surexpression d'EGFR induite par le TGF α entraîne aussi une transformation des fibroblastes Rat-1 et NRK. Ces données suggèrent que la surexpression d'EGFR pourrait induire une transformation maligne en présence de la quantité appropriée de ligands. [17]

1.2. Voie RAS/MAPK

1. La famille RAS

La famille des oncogènes RAS comprend trois gènes bien caractérisés : HRAS, NRAS et KRAS, elles sont localisées à la face interne de la membrane cytoplasmique. Les protéines Ras font partie de la famille des GTPases et jouent un rôle important dans la transmission des signaux extracellulaires provenant des récepteurs membranaires vers le noyau aboutissant à la régulation de la prolifération, de la survie, de la différenciation, de la migration cellulaire ainsi que de l'angiogenèse. Leur activation est déclenchée par l'intermédiaire de récepteurs membranaires dont l'EGFR. L'activation de RAS survient lors du remplacement du GDP par le GTP grâce au

complexe Shc/Grb2/SOS, l'inactivation est provoquée par l'hydrolyse du GTP en GDP par des protéines de régulation telle que les GAP (*GTPase Activating Proteins*) ainsi que par l'activité GTPase intrinsèque de RAS. Tous les effecteurs connus de RAS ont en commun une région homologe appelée RBD (*RAS-binding domain*) qui interagit avec la boucle effectrice de RAS. Les effecteurs de RAS peuvent être divisés en trois sous-groupes basés sur l'homologie de leur région RBD, le premier sous-groupe comprend les protéines de la famille Raf-1 constituées des sérine/thréonine kinases A-Raf, B-Raf, C-Raf. Une fois activée, Raf va phosphoryler MEK qui va elle-même phosphoryler ERK [18].

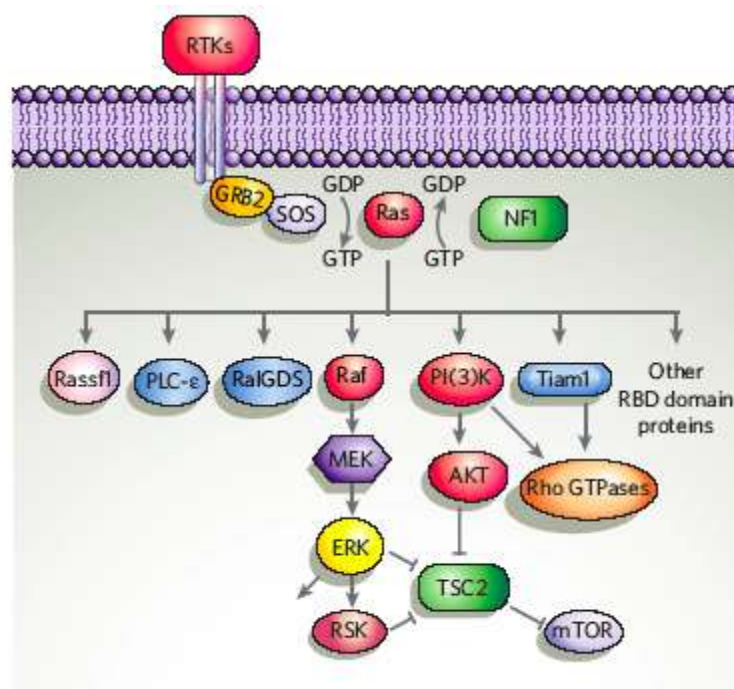


Figure N° 3: Voies de signalisation intracellulaires activées par Ras [18]

2. Rôle de RAS dans l'oncogénèse

Les tumeurs de plus haute prévalence et résultant de mutations touchant le KRAS ce sont les cancers du pancréas (90%).

L'activation de la protéine RAS est liée à la présence d'une mutation faux-sens de KRAS qui lui confère un pouvoir oncogénique en étant responsable d'une accumulation de la forme active, ces mutations touchent dans plus de 90% des cas l'acide aminé glycine des codons 12 et 13 et plus rarement l'acide aminé glutamine du codon 61 (Tableau 3).

Tableau N° 4 : Mutations du gène KRAS les plus fréquentes (A : alanine, C : cystéine, D : aspartate, G : glycine, R : arginine, S : sérine, V : valine) [18].

Codon	Base	Mutation	Substitution d'acide aminé
12	1	<u>G</u> GT → <u>C</u> GT	G12R
12	1	<u>G</u> GT → <u>I</u> GT	G12C
12	1	<u>G</u> GT → <u>A</u> GT	G12S
12	2	G <u>G</u> T → G <u>C</u> T	G12A
12	2	G <u>G</u> T → G <u>I</u> T	G12V
12	2	G <u>G</u> T → G <u>A</u> T	G12D
13	2	G <u>G</u> C → G <u>A</u> C	G13D

1.3. Voie MAPK/ERK

L'activation de la voie MAPK, également appelée ERK (*Extracellular signal Regulated Kinase*), débute par l'activation et le recrutement à la membrane de la protéine Raf-1 qui est une sérine/thréonine kinase responsable de l'activation par phosphorylation de la MAPK kinase ou MEK (MAPK/ERK kinase).

À son tour, MEK va activer de manière hautement spécifique ERK par double phosphorylation, ce qui entraîne sa translocation au niveau du noyau et l'expression de nombreux facteurs de transcription (c-FOS, c-MYC, c-JUN...) qui, à leur tour, stimulent l'expression d'un grand nombre de gènes, en particulier ceux de la cycline D1 et de cdk6 ayant un rôle majeur dans l'initiation de la phase G1 du cycle cellulaire. ERK active aussi indirectement le facteur de transcription CREB et NF-Kb via l'inhibition d'IKK.

Cette voie est aussi impliquée dans la régulation de l'apoptose par la phosphorylation post-transcriptionnelle de Bad, Bim, Mdm-1 et caspase 9.

Une activation anormale de cette voie entraîne une transformation tumorale [18].

2. La voie TGF-β/smad4

A. Le récepteur TGF-β

L'activation de la voie de signalisation des membres de la famille TGFβ est dépendante de l'interaction du ligand avec un complexe de récepteurs membranaires à activité sérine/thréonine kinase. Ce complexe est composé de récepteurs de type I combinés à des récepteurs de type II qui sont des glycoprotéines transmembranaires de 55 kDa et 70 kDa, respectivement. Ces récepteurs présentant entre eux une forte homologie structurale et sont composés d'un domaine

extracellulaire de liaison au ligand, un seul domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire à activité sérine/thréonine kinase [19].

B. Les voies de signalisation du TGF β / smad4

Le ligand TGF β actif est un dimère synthétisé sous forme d'un précurseur stocké dans la MEC. La transmission du signal débute par l'interaction du ligand avec un complexe de deux récepteurs transmembranaires de type sérine/thréonine kinases.

Le TGF β se lie d'abord au récepteur de type II (T β RII) constitutivement autophosphorylé, qui recrute le récepteur de type I (T β RI) et le transphosphoryle. Ensuite, le T β RI phosphoryle des protéines Smad2 et Smad3 qui s'associent à la protéine Smad4. Ce hétérocomplexe est redirigé dans le noyau où il se lie à l'ADN.

Le TGF β active la voie de signalisation des protéines Smad, et il est capable de transmettre ses signaux via la voie des kinases activées en réponse au stress (p38 et JNK), la voie des RhoGTPases, la voie MAPK impliquant ERK et la voie PI3K/mTOR. Toutes ces voies de signalisation sont interconnectées [20].

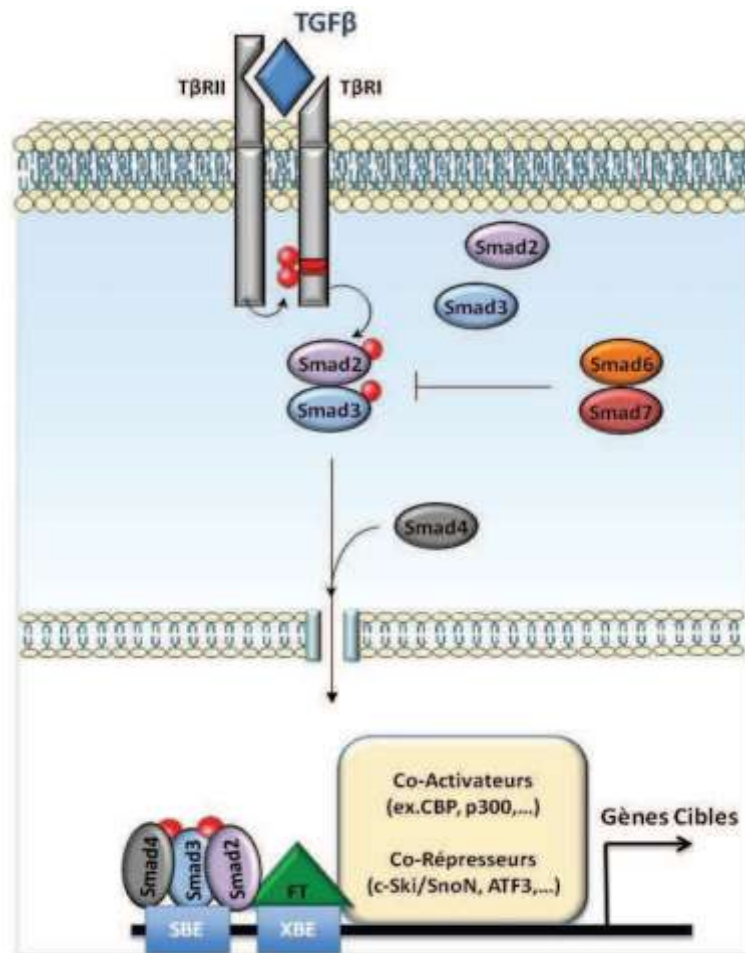
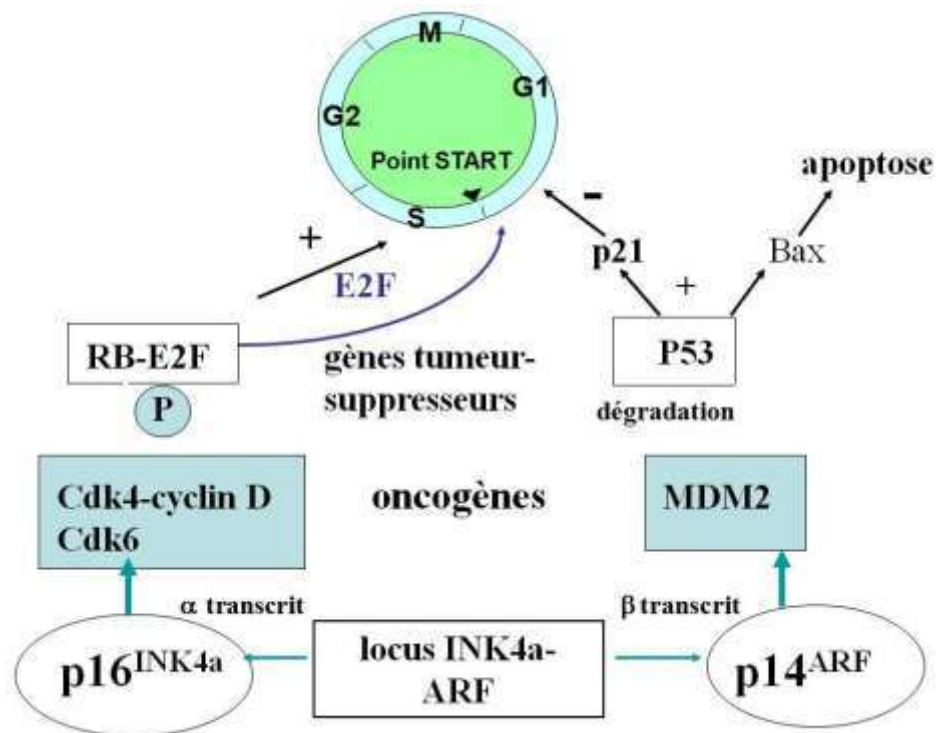


Figure N° 4 : Voie de signalisation des Protéines SMADs. SBE (SmadBinding Element) : séquence nucléotidique d'interaction avec les protéines Smads ; XBE (X-Binding Element) : séquence nucléotidique d'interaction avec des facteurs de transcription [19].

C. SMAD4 et les Altérations de la voie du TGFβ

La voie du TGFβ est particulièrement importante dans la progression du PDAC. Tout d'abord, le gène codant la protéine SMAD4 (originellement appelé DPC4 pour *Deleted in Pancreatic Carcinoma 4*) est inactivé dans plus de 50% des PDAC. La perte d'expression de SMAD4 est associée le plus souvent à une délétion du locus 18q21.1, contenant SMAD4 et à une perte d'hétérozygotie. L'inactivation de SMAD4 est un phénomène tardif détectée à partir du stade PanIN3 où ce gène est délité dans 28% des PDAC. SMAD4 est un acteur central de la voie de signalisation du TGF β et est à la base du programme anti-prolifératif et proapoptotique du TGFβ [19].

3. Les voies des gènes suppresseurs de tumeurs CDKN2A, p53.



FigureN° 5: Ce schéma nous montre les mises en place des régulations par le gène CDKN2A qui code pour deux transcrits différents (alpha et béta) qui codent pour deux protéines : p16 INK4a et p14ARF [21].

Le gène *CDKN2A* est localisé sur le chromosome 9p, il code pour la protéine p16 [9]. La protéine p16INK4a se lie aux complexes cyclines D/CDK4/6 responsables de la phosphorylation de pRb (protéine du Rétinoblastome), empêchant ainsi l'activation du facteur de transcription E2F1 et bloquant la progression du cycle cellulaire en G1/S. Le gène *INK4a* code aussi pour un deuxième suppresseur de tumeur, p14ARF et p 14 ARF est produit à partir d'un exon alternatif en amont de la séquence codante de p 16INK4a qui lorsque épissé avec les 2 autres exons

formant le gène *INK4a*, se retrouve dans un cadre de lecture différent de celui de p16^{INK4a}, générant ainsi deux protéines distinctes n'ayant aucune similarité lorsque surexprimé [21].

La stabilisation de p53 est due à une dissociation des complexes p53/mdm2 par la protéine p14^{ARF} qui induit la translocation de mdm2 dans le nucléoplasme [22]. La protéine mdm2 est un partenaire essentiel dans le comportement de la p53 sauvage et se fixe de façon spécifique sur la partie amino-terminale de la p53. Cette interaction bloque le domaine de transactivation de la p53 et inhibe leur activité transcriptionnelle. Plus récemment, il a été démontré que la fixation de mdm2 sur p53 induit une dégradation de cette dernière. La protéine mdm2 serait une ubiquitine ligase qui conduirait p53 vers le protéasome.

La protéine p53 aurait 2 voies, l'une passant par l'activité transactive le gène codant pour l'inhibiteur des cyclines kinases p21^{WAF1/CIP1}. En se fixant sur les complexes cyclines/CDK, la protéine p21^{WAF1/CIP1} inhibe la phosphorylation de la protéine Rb. Ce dernier reste complexé aux facteurs de transcription de la famille E2F qui ne peuvent activer la phase S et l'autre utilisant un mécanisme de l'apoptose indépendante de la transcription [23].

L'inactivation de p16^{INK4a} et p14^{arf}, le plus souvent en raison des délétions homozygotes, comprenant les locus *Ink4a/Arf* [21]. Quand ce gène est muté c'est à dire que les protéines soit p14 soit p16 ou bien les deux sont anormales ou ne sont plus produites, alors ces deux complexes CDK4 et MDM2 sont activés et donc cela entraîne une activation du cycle cellulaire. La mutation (par exemple mutation sur Thr 77 pro) peut être située au niveau du site d'interaction entre p16 et CDK4, ce qui fait que p16 ne pourra plus se fixer à CDK4 correctement et donc la cycline D1 pourra se fixer à CDK4 et entraîner une activation du cycle cellulaire [22]. La perte de l'expression de p14^{arf} l'un des mécanismes d'inactivation de p53 est la surexpression de son régulateur négatif mdm2 entraînant ainsi une augmentation de dégradation de p53 par la voie mdm2-protéasome [23]. L'inactivation de *CDKN2A* s'accompagne d'une absence de contrôle du cycle cellulaire et par conséquent d'une persistance de la prolifération cellulaire [9].

3.2. La MTHFR

3.2.1. La protéine MTHFR

Structure et fonction de la protéine

Chez l'homme, le produit du gène MTHFR est une protéine catalytique active de 77 KDa, c'est la 5,10 méthylènetétrahydrofolate-réductase (5,10-MTHFR) qui est un homodimère présent dans le cytoplasme. Cette protéine est composée de 656 acides aminés possédant un domaine catalytique présentant un site de liaison pour le coenzyme, le FAD (Flavine adenine dinucléotide) et un domaine régulateur où se lie l'inhibiteur allostérique, la SAM. (S-adenosyl-L-

méthionine). La 5,10-MTHFR catalyse la conversion du 5, 10-méthyltétrahydrofolate (5,10-CH₂-FH₄) en 5-méthyltétrahydrofolate (5-CH₃-FH₄) qui est la forme biologique majeure des folates et la principale source du 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 [24].

3.2.2. Gène de la MTHFR

Le gène de la MTHFR est localisé sur le bras court (p) du chromosome 1 en position 36.3 (figure 6). Le cDNA de ce gène fait approximativement 2.2 kilo base, le promoteur du gène ne contient pas de TATA box mais contient des îlots CpG, une région CAAT et des sites de liaison pour les différents facteurs de transcription tels que le multiple potentiel SP1, AP1 et AP2 [20].

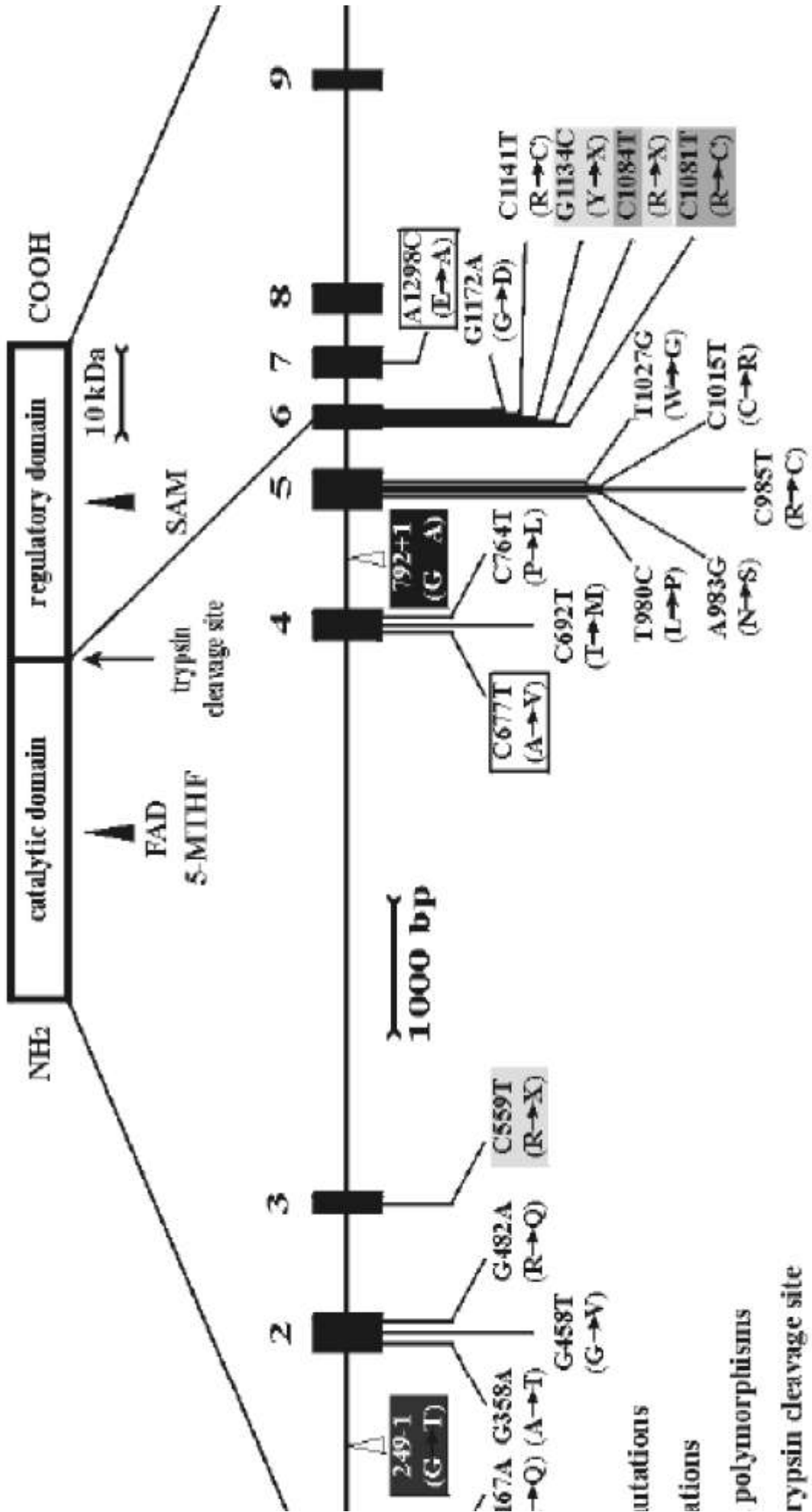


Figure N° 6 : Localisation du gène MTHFR sur le chromosome 1 [24].

Il existe deux polymorphismes courants et bien décrits du gène MTHFR : Le C677T et C1298A qui sont responsables de la synthèse d'une forme thermolabile de la protéine MTHFR.

La mutation C677T du gène MTHFR qui correspond à une conversion d'une cytosine en une thymine au niveau de l'exon 4 du gène MTHFR transmise de façon autosomique récessive. Cette mutation se traduit par une substitution d'une alanine en une valine en position 222 de la protéine MTHFR et se situe dans le domaine catalytique de l'enzyme au niveau du site de liaison avec le cofacteur Flavine Adénine Dinucléotide (FAD).

Le polymorphisme étudié A1298C, correspond à une substitution d'une adénosine par une cytosine en position 1298, exon 7 du gène MTHFR, dans la séquence nucléotidique et qui se traduit dans la séquence protéique par la substitution de l'acide glutamique par une alanine sur le codon 429 [24].



PATIENTS ET METHODES

L'étude que nous avons entreprise est de type transversal cas-témoins et à durée de 03 mois. Elle a porté sur 34 sujets, dont 16 sont atteints d'un cancer du pancréas et 18 témoins sains.

1. Recrutement des sujets :

Pour les patients cancéreux, Il s'agit de :

-16 sujets des deux sexes atteints d'un cancer du pancréas, âgés entre 40 et 80 ans et admis au niveau du centre Hospitalier universitaire de Constantine (CHUC), essentiellement au niveau du service d'oncologie médicale et d'oncologie radiothérapie ;

-18 témoins supposés sains, choisis par appareillage adapté aux patients cancéreux.

Des critères d'inclusions et d'exclusions ont été établis pour les patients, dans les deux types de l'étude.

- **Critères d'inclusions :**

- Pour les cancéreux, nous avons inclus dans notre étude tout patient de l'Est algérien, âgé de 40 à 80ans et présentant un cancer du pancréas prouvé histologiquement.
- Absences de : chimiothérapie, radiothérapie, hormonothérapie en cours, régime spécifique pour une pathologie quelconque, troubles cognitifs, troubles alimentaires. Patient en état général conservé.
- Nos patients témoins sont tous sains, de l'Est algérien et âgés entre 40 et 80 ans.

- **Critères d'exclusions :**

- Pour les cancéreux : présence d'autres cancers associés ou d'une métastase dont l'origine serait ignorée.

2. Prélèvement

Les prélèvements ont débuté en Mars 2016 et ont été effectués au centre anti cancer de Constantine

➤ Déroulement des prélèvements :

Notre étude aura porté sur 34 sujets (cas témoins), dont 16 atteints du cancer du pancréas, et 18 témoins sains.

Le prélèvement sanguin est effectué, systématiquement à chaque hospitalisation du patient pour cause de cancer du pancréas.

Le prélèvement sanguin préconisé pour l'extraction de l'ADN est recueilli stérilement dans un tube en présence d'EDTA (en quantité de 6 à 10 ml) et sans prélèvement sur tube d'héparine, du fait que c'est un inhibiteur de la Taq polymérase.

Le recueil est effectué au centre anti cancers de Constantine, chez des sujets au repos.

- Choix du site du prélèvement,
- Choix de l'aiguille (aiguille simple sur veine normale, adaptateur en cas d'un prélèvement sur cathéter)
- Mise en place d'un garrot au moment de la ponction veineuse
- Désinfection du site de ponction, soigneusement
- Réalisation de la ponction veineuse
- Identification du tube (nom, prénom du sujet prélevé, type, lieu du prélèvement et date)

3. Questionnaire et Enregistrements**● Questionnaire**

Un recueil de données a été effectué au niveau du service d'hospitalisation concerné. Nous avons mené un interrogatoire du patient afin de compléter son dossier médical (voir Annexe N°1 pour le questionnaire).

● Enregistrement

Toutes les informations recueillies sont enregistrées soigneusement, sur chaque questionnaire. Noms et prénoms des sujets associés à la numérotation 1, 2, 3, 4, ... Sont mentionnés le numéro du dossier ainsi que le numéro d'enregistrement de chaque sujet correspondant à celui du registre.

4. Manipulations sur le sang total :

Le sang ainsi prélevé est acheminé immédiatement au laboratoire Central de Biochimie pour son analyse.

4.1. Extraction de l'ADN :

Toutes les études génétiques nécessitent la disposition d'échantillons d'acides nucléiques, les leucocytes sanguins représentant la source majeure de l'ADN. Les autres sources cellulaires peuvent être des biopsies (biopsie de villosités chorales...).

Dans la grande majorité des cas, la technique d'extraction des acides nucléiques doit être adaptée à l'échantillon, à la nature du génome, au nombre des copies et des méthodes de biologie moléculaire utilisée ultérieurement (PCR...) Les méthodes d'extraction des acides nucléiques sont diverses [25] Celle employée dans notre étude utilise un solvant inorganique, Na Cl.

- Principe :

L'extraction de l'ADN consiste en l'isolement de leucocytes du sang total par une lyse hypotonique des globules rouges qui seront ensuite traités par un détergent, Sodium dodécyle sulfate (SDS), lequel a une action lytique sur les membranes cellulaires, inhibant les nucléases et dénaturant les protéines par destruction de leur structure tertiaire. L'intervention de la protéinase K dénature et dégrade les protéines.

Dans le lysat, l'ADN nucléaire ainsi libéré est associé aux différentes protéines qui seront digérées et éliminées par précipitation au Na Cl. Le surnageant ainsi récupéré est traité par de l'éthanol pur, dans lequel une pelote de l'ADN se forme par précipitation.

L'ADN est solubilisé en phase aqueuse (Tris EDTA 10 :1). Sa pureté ainsi que sa concentration sont estimées par spectrophotométrie à UV (Annexe 2).

L'EDTA : est un agent chélateur des ions divalents (tels que Mg^{2+}) nécessaire au fonctionnement des nucléases. Il est donc couramment employé comme inhibiteur indirect des DNAses.

4.2. Détermination de la pureté et la concentration de l'ADN :

4.2.1. Détermination de la pureté :

•Principe :

- l'ADN absorbe à 260 nm alors que les protéines (témoins de contamination) Absorbent à 280 nm.

- Notre échantillon est dilué au 1/100 dans l'eau distillée (10 μ l de l'ADN solubilisé dans 990 μ l de l'eau stérile).

- Les DO (densité optique) sont lues à 260 et 280 nm (longueurs d'onde d'absorption des acides nucléiques et des protéines) dans le même type de cuve que celle ayant servi à faire le zéro (eau stérile).

- Par le moyen du rapport de DO 260 nm/ DO 280 nm, la pureté de l'ADN est déterminée en indiquant la contamination de l'ADN par les protéines ou par les ARN.

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: $DO_{260} / DO_{280} < 1,6$.

- L'ADN est contaminé par les ARN si: $DO_{260} / DO_{280} > 2$.

-La pureté de l'ADN est essentielle pour une action efficace des enzymes de restriction utilisées par la suite. Dans le cas où l'ADN est contaminé, ce dernier ne laisserait pas aboutir à un bon résultat dans les étapes suivantes de son analyse par PCR. Il est donc indispensable de procéder par la réextraction de la pelote de l'ADN afin d'obtenir la pureté souhaitée (Annexe 2). Les ADN purs sont conservés à + 4 °C jusqu'à utilisation.

4.2.2. Détermination de la concentration de l'ADN :

• Principe

La densité optique à 260 nm permet de calculer la concentration de l'ADN sachant que :

A 260 nm une unité de densité optique correspond à :

- 50 mg / ml pour une solution d'ADN double brin

- 250 mg / ml pour une solution d'ADN simple brin.

1 unité de DO260 nm = 50 µg/ml d'ADN double brin.

Exemple :

Pour un ADN solubilisé dans 1000 µl de TE 10 :1 ayant une $DO_{260 \text{ nm}} = 0,139$

1 unité de $DO_{260 \text{ nm}}$ 50 µg/ ml d'ADN

0,139 de $DO_{260 \text{ nm}}$ X

$X = 0,139 \times 50 = 6,95 \text{ µg/ml}$

Considérant que l'ADN est dilué à 1/100 (10 ml de l'ADN dilué dans 990 ml d'eau stérile),

Donc $6,95 \times 100 = 695 \text{ µg/ml}$.

Aussi :

La concentration de l'ADN en µg/ml = facteur de dilution × DO 260 × 50µg/ml.

La qualité de l'ADN peut être vérifiée par un contrôle de taille des molécules d'ADN qui doivent être suffisamment longues pour être digérés. L'ADN génomique doit donc être manipulé en évitant toute action mécanique violente.

5. Génotypage de la MTHFR :

Il consiste à amplifier une partie de l'ADN contenant le gène, puis de différencier les génotypes par digestion d'une enzyme de restriction spécifique.

La détermination du génotype a été effectuée en trois étapes successives :

- PCR (Polymérase Chaîne Réaction) et son contrôle sur gel d'agarose.
- Digestion du produit PCR par l'enzyme de restriction Hinf I.
- Séparation des produits de digestion par migration électrophorétique sur un gel d'agarose et distinction des différents génotypes par transillumination sous UV.

5.1. La PCR (Polymérase Chaîne Réaction)

La PCR est une technique de biologie moléculaire [26] mise au point en 1985 par Karry Mullis et développée par Henri A. Herlich et ses collaborateurs de la compagnie CETUS (Californie, USA).

5.1.1. Préparation du milieu réactionnel (ou mix) de PCR

Pour préparer le milieu réactionnel (Annexe 3), nous avons multiplié la quantité de chaque composant par le nombre de tubes voulu + un, c'est le tube témoin négatif dans lequel on a mis uniquement le mélange sans ADN.

L'ADN est amplifié par la PCR avec deux amorces encadrant la région de l'ADN avec deux codons polymorphes d'acide aminé 222 de la MTHFR (Annexe 3, tableau 14).

5.1.2. Déroulement des cycles de la PCR

Nous avons constaté que chaque cycle de la PCR repose sur trois étapes indispensables : Dénaturation, hybridation et élongation (Annexe 3 : Tableau 15)

5.1.3. Contrôle des produits de la PCR

Le contrôle de la taille des fragments amplifiés s'est effectué par une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5 % additionné à 10 µl de BET (Bromure d'éthidium). Ce dernier est un réactif intercalaire se fixant entre les bases nucléiques à l'intérieur de la double hélice et qui rend chaque ADN fluorescent par exposition aux UV.

Le gel est ensuite coulé sur plaque d'une cuve horizontale. Dans chaque puits du gel, nous avons déposé :

- 10 µl de produit d'amplification + 3 µl BBP (Bleu de Bromophénol) permettant de suivre le front de migration.
- 3 µl de marqueur de taille (PM 100pb) +10µl H₂O +2µl BBP.

Constat : Les dépôts se font du côté cathode (-). Le système est soumis à une migration sous un courant de 60 à 120 volts pendant 30 min. Cette analyse devait nous permettre également d'observer si une éventuelle contamination de l'ADN survenait au cours de la PCR.

Pour la préparation du gel d'agarose : mélange de 3g d'agarose dans 100 ml de TBE 1 X. Ensuite, montage du support du gel.

Puis homogénéisation par coulage immédiat en versant le contenu du bêchage dans le support en plaques de verre tout en ayant soin de ne pas faire de bulles.

Enfin, placement du peigne plat afin de former les puits et polymérisation à température ambiante pendant 1h 30 à 2h 30 minutes.

- Dépôts des échantillons :

Après polymérisation, nous avons plongé le système (gel + électrodes) dans la cuve horizontale contenant un volume (450ml) du tampon Tris Borate EDTA (TBE 1 X)

Nous avons enlevé le peigne et déposé délicatement au fond de chaque puits un échantillon ou marqueur (Annexe 4).

Nous avons déposé dans chaque puits du gel 12 à 14 µl du produit digéré et 3 µl du bleu de Bromophénol.

Nous observé une migration.

- Migration :

A un voltage de 80 volts, la migration s'est faite en parallèle avec des fragments d'ADN, appelés marqueurs de taille (leurs tailles sont connues).

3. Révélation du profil électrophorétique

Le BET fluorescent aux UV s'est fixé sur l'ADN (cette molécule s'intercale entre les bases de la molécule d'ADN) nous a permis de visualiser les fragments de restriction dans le gel placé sur la table à UV.

Après 2h 30mn, nous avons obtenu une séparation nette des différents fragments du marqueur. Le gel a été photographié après transillumination aux UV (figure 9).

5.3. Profils RFLP obtenus

Ce polymorphisme, codé C677T, correspond à une substitution d'une cytosine par une thymine en position 677 dans la séquence nucléotidique et qui, se traduit dans la séquence protéique par la substitution d'une alanine par une valine sur le codon 222.

La digestion enzymatique de l'amplification de la MTHFR par la Hinf I nous a donné des fragments : 175 pb, 198 pb et 23 pb.

Le premier fragment apparaît sur le profil électrophorétique sous forme d'une seule bande qui correspond au type homozygote muté (TT), le deuxième apparaît aussi sous forme d'une seule bande, il s'agit du type homozygote sauvage (CC). Les deux bandes ensemble, correspondent au type hétérozygote (CT) (voire la figure 9 ci dessous). Le troisième n'est pas visible à cause de son intensité trop faible.

Ainsi donc les conditions d'amplification furent ainsi qu'il suit :

dénaturation initiale à 94 °C pendant 5 minutes, suivie de 30 cycles de PCR comprenant chacun une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une hybridation à 65 °C pendant 30 secondes et une élongation à 72 °C pendant 40 secondes. Enfin une élongation finale à 72 °C pendant 10 minutes.

L'amplification fut suivie d'une digestion enzymatique par l'enzyme *HinfI*. Les produits de digestion furent analysés sur un gel d'agarose à 3 %, parallèlement à un marqueur de poids moléculaire. La révélation fut réalisée sous lumière ultraviolette (UV), après coloration au bromure d'éthidium. La présence du polymorphisme se traduit par la visualisation d'une bande de 175 pb.

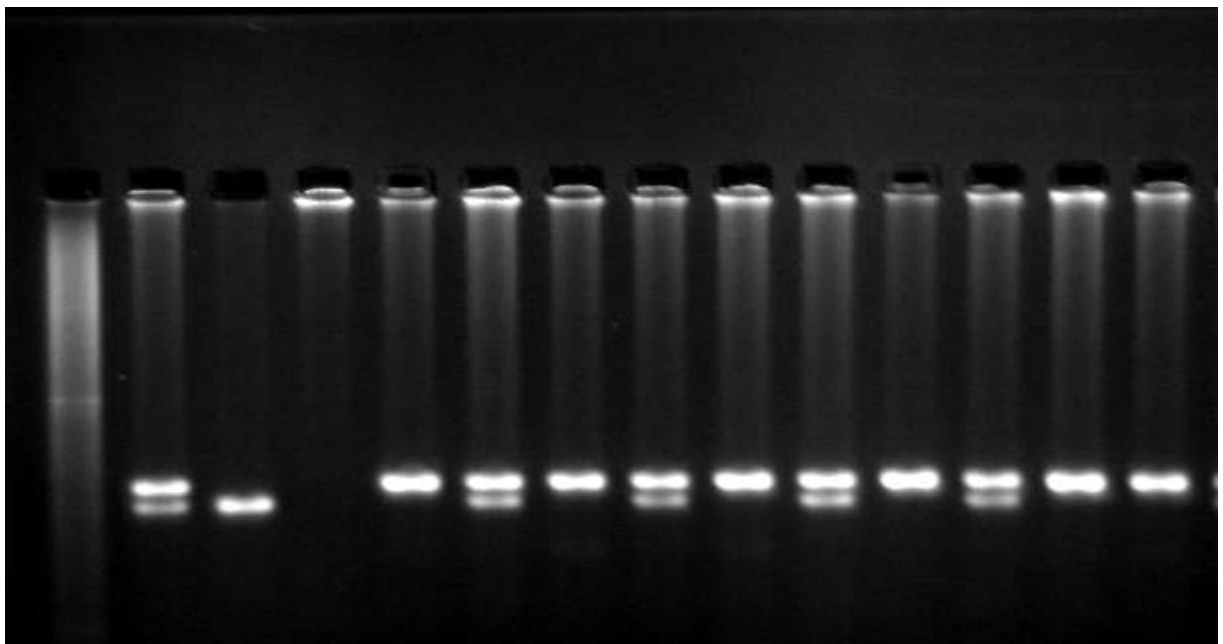


Figure 9 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments issus par clivage de *HinfI* présentant différents génotypes d'MTHFR.

6. Analyse statistique :

6.1. Statistique descriptive :

Vu que notre étude est transversale cas-témoins, nous avons opté pour utiliser la statistique Descriptive.

- Le calcul de la moyenne arithmétique, et l'écart type

$$\bar{X} = \frac{\sum (n_i x_i)}{n} \text{ si } n > 30$$

$$\bar{X} = \frac{\sum (n_i x_i)}{(n - 1)} \text{ si } n \leq 30$$

Pour l'écart type de la moyenne

L'écart type = $\delta = \sqrt{\text{Variance}} = \sqrt{\sum (X^- - X)^2 / N - 1}$ si $n \leq 30$

L'écart type = $\delta = \sqrt{\text{Variance}} = \sqrt{\sum (X^- - X)^2 / N}$ si $n > 30$

Les variables quantitatives sont décrites par la moyenne ± 1 écart type, sauf exception qu'on précisera dans le texte.

6.2. L'enquête analytique :

Dans l'enquête analytique: pour étudier la relation entre un facteur d'exposition et la maladie, nous avons :

- Comparé la moyenne de la variable mesurant l'exposition chez les malades et les non malades.

Nous avons créé des classes et utilisé des méthodes qualitatives. Ces méthodes permettent de décrire la relation entre le facteur d'exposition et la maladie de manière plus concrète et permettent l'utilisation de méthodes statistiques plus simples [27].

Le test utilisé dans ces conditions est le χ^2 .

6.3. Calcul de l'odds ratio :

Pour calculer l'odds ratio nous avons établi un tableau de contingence :

Il est présenté sous forme de tableau croisé 2x2. Le statut malade/non malade des sujets de l'étude est présenté en colonne et le caractère exposé/non exposé en ligne.

	Malades	Témoins	Total
Exposée (E+)	a	b	a + b
Non exposés (E-)	c	d	C + d
Total	a + c	b + d	a+ b +c+ d

La mesure de la cote d'un événement est un concept différent du taux ou de survenue de cet événement. La cote est le rapport entre la probabilité de survenue d'un événement et celle de la survenue d'un autre événement, en général opposé au premier.

Dans notre enquête on ne peut pas calculer directement le taux de maladie, pas plus que la cote correspondante, puisque les nombres de la maladie sont fixés arbitrairement.

Cependant on peut calculer :

- La cote d'être exposé (*Exposure Odds ; EO*) pour les cas EO malades = a/c , pour les témoins EO témoins = b/d
- Le rapport des cotes d'exposition qui est l'Odds ratio (*Exposure Odds ratio*)

$$\text{OR} = a \times d / b \times c$$

L'Odds ratio représente une mesure d'association épidémiologique entre un facteur et une maladie, en particulier lorsque la maladie est rare parmi la population (Prévalence $< 5\%$). Dans ce

cas l'Odds ratio peut être une bonne approximation du risque relatif que donnerait une enquête de cohorte pour la population.

Pour déterminer s'il existe une stabilité épidémiologique, on a utilisé trois tests statistiques, en cherchant à tester l'hypothèse nulle H_0 selon laquelle il n'y aurait pas d'association entre la maladie et le facteur de risque l'hypothèse nulle et formulée d'une seule manière qui est (H_0 : OR=1).

6.4. Les intervalles de confiance:

Les intervalles de confiance : ont été calculés par la méthode de Cornfield. L'approche estimative de l'analyse statistique vise à quantifier l'effet étudié et le degré de certitude de cette estimation grâce à un intervalle de confiance, qui identifie généralement une fourchette de valeurs situées de part et d'autre de l'estimation et l'on peut être sûr à 95% de trouver la valeur réelle.

La notion d'un intervalle de confiance repose sur l'idée suivante : si la même étude était réalisée sur un échantillon différent de patients, les résultats ne seraient pas identiques, mais seraient proches du résultat véritable qui reste inconnu. L'intervalle de confiance estime cette variation due à l'échantillon [28].

L'intervalle de confiance pour les Odds ratio a été calculé à partir de l'approximation de Fliess.

6.5. Choix de la "p value ":

Le seuil critique a priori est de 0.05 (risque α). Si la valeur de p calculée à posteriori est inférieure à ce seuil, la différence entre les paramètres est déclarée statistiquement significative pour apparemment arbitraire est nécessaire pour l'homogénéité de la présentation des résultats.

L'usage a retenu de manière consensuelle l'ensemble des seuils (0.05, 0.01, 0.001) qui représentent des risques raisonnables pour prendre une décision.

Le seuil 0.01 doit être choisi en complément d'une étude épidémiologique descriptive, on teste le lien entre deux variables sans que l'on puisse a priori argumenter quand il existe une relation logique entre ces variables.

Résultats

Notre étude est une observation transversale : cas-témoins, qui a porté sur 34 sujets recrutés au niveau du centre Hospitalier universitaire de Constantine (CHUC) dont 16 atteints d'un cancer du pancréas admis au niveau du service d'oncologie médicale et radiothérapie et 18 témoins sains recrutés au niveau du service de médecine du travail.

1. Aspect Clinique des patients atteints d'un cancer du pancréas

Nos patients sont des cancéreux, atteints d'un cancer du pancréas à des stades différents et présentant comme pathologie associée un diabète (tout type confondu), pouvant être une des causes comme, une conséquence au cancer du pancréas.

Nos patients présentent aussi les symptômes cardinaux de ce type de cancer, qui sont les suivants :

- douleur à la partie supérieure de l'abdomen ou du dos
- perte de poids
- jaunisse
- changements de la digestion
 - difficulté à digérer
 - nausées
 - vomissements
 - perte d'appétit
 - sensation de plénitude après un repas léger
 - ballonnement
 - gaz
- changements du transit intestinal
 - selles graisseuses (stéatorrhée) – selles volumineuses et pâles. diarrhée
- fatigue
- saignement gastro-intestinal
- élévation du taux de glycémie (diabète)
- augmentation du volume de la rate
- enflure des jambes
- ascite (accumulation anormale de liquide dans l'abdomen)
- malaise (sensation généralisée d'inconfort ou de mal-être)
- asthénie
- dépression

- anxiété

Ainsi, parmi nos patients, y a ceux qui présentent, les signes et symptômes rares du cancer du pancréas qui sont les suivants :

- caillots sanguins dans les jambes ou les bras (syndrome de Trousseau),
- augmentation du volume du foie et de la vésicule biliaire,
- ganglion lymphatique enflé dans la région de la clavicule gauche,
- métastases aux ganglions lymphatiques près du nombril.

Les cliniciens affirment qu'aux tous premiers stades, il est possible que le cancer du pancréas ne présente aucun signe ni symptôme. Les symptômes apparaissent lorsque la tumeur se développe dans les tissus et organes avoisinants ; ils dépendent de l'emplacement de la tumeur dans cet organe.

Les signes et symptômes du cancer du pancréas peuvent aussi être causés par d'autres affections médicales. Il est donc important de consulter un médecin, si des symptômes inhabituels se manifestent [29].

68,75% de nos patients sont métastasés après avoir comme origine un cancer du pancréas. Pour le 31,25 % des patients aucune information n'apparaît au niveau du dossier médical, concernant le stade du cancer

2.Âge et Sexe Ratio

Notre échantillon des cancéreux pris globalement, est composé de 16 patients âgés entre 40 et 80 ans et repartis en 10 Hommes et 06 Femmes, représentant respectivement 62,5%, 37,5%.

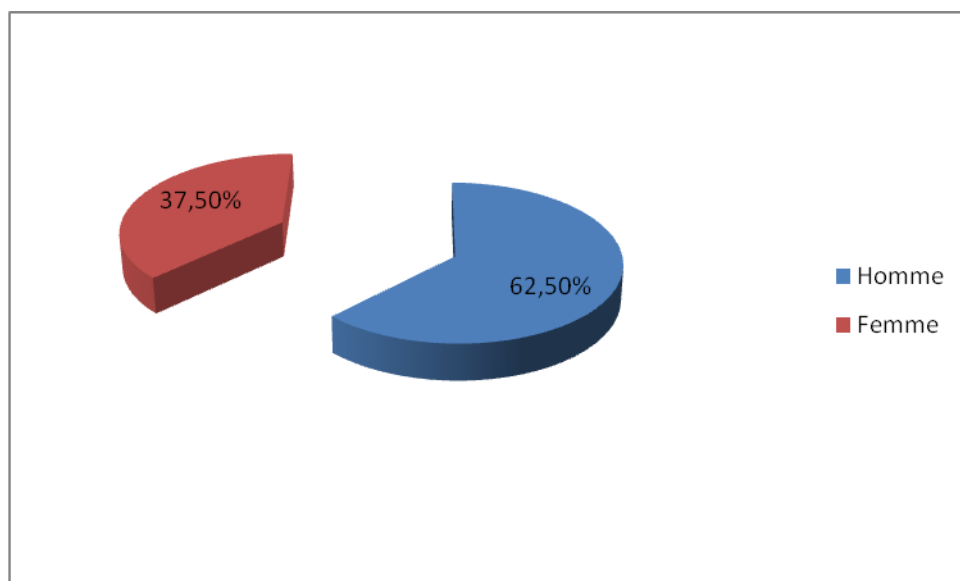


Figure N° 10 : Répartition des Cancereux selon le sexe

Cet échantillonnage est réalisé aléatoirement. Certaines études sur le cancer du pancréas montrent une prépondérance masculine, dans toutes les populations, dont l'âge dépasse la cinquantaine [30].

Dans notre échantillon, le nombre des hommes était supérieur à une proportion de 1,67% par rapport à celui des femmes, l'explication peut être:

- Le Hasard, vu la courte période qui nous a été accordée pour réaliser notre étude.
- Le tabagisme qui concerne surtout la gent masculine et qui multiplie le risque par deux ou trois.
- Le mode de vie. Car, en Algérie le sexe masculin prédomine dans le monde du travail obligeant à la prise de repas rapides, le plus souvent riches en graisse et pauvre en fibre. Or, d'après les chercheurs l'alimentation consommée par une personne tout au long de la vie peut augmenter le risque de développer certains types de cancer [31].
- La masse musculaire et la différence hormonale entre les deux sexes [32].

3. Moyennes d'âge

Tableau N° 05: Moyenne d'âge

	Hommes	Femmes	Total
Moyenne d'âge	60,93 ± 18,54	58,16 ± 18,58	58,69± 21,41

La moyenne d'âge des nos patients est de $58,69 \pm 21,41$ ce qui concorde avec les données de la littérature démontrant que le risque des cancers pancréatiques augmente avec l'âge et que la plupart se produisent chez des personnes âgés de plus de 50 ans [33] ; avec un pic enregistré à 70 ans, indépendamment du sexe [34].

La moyenne d'âge des femmes cancéreuses est de $58,16 \pm 18,58$ tandis que la moyenne d'âge des hommes est de $60,93 \pm 18,54$. Ce qui concorde avec de nombreuses études montrant que le cancer du pancréas touche beaucoup plus les hommes que les femmes à partir d'une moyenne d'âge de 50 ans.

4. Répartition en Tranche d'âge

Tableau N° 06: Répartition en Tranche d'âge

Classe	N	%
[40-50]	03	18,75 %
[51-61]	04	25 %
[62-72]	04	25 %
[73-83]	05	31,25 %
Total	16	100 %

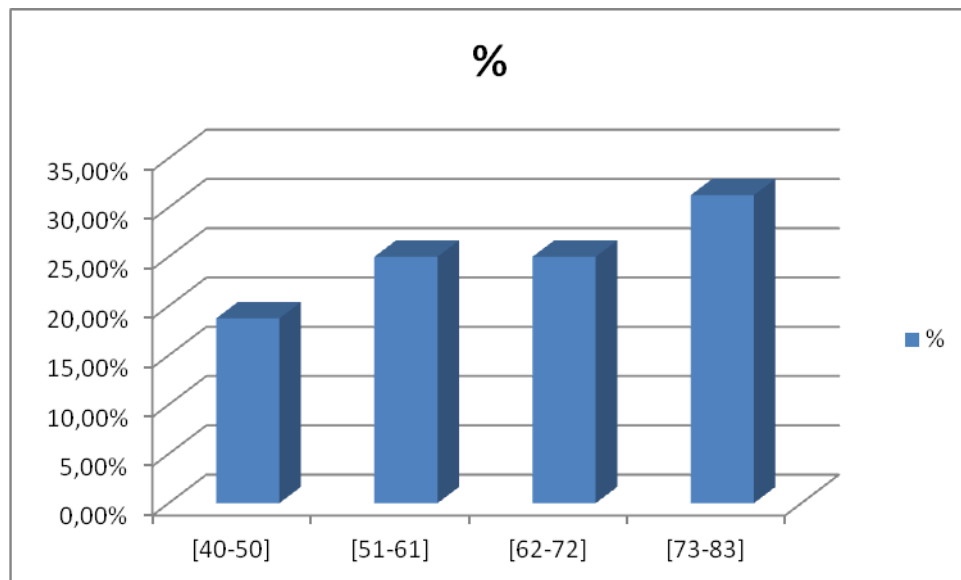


Figure 11 : Répartition en tranche d'âge des patients

Pour la répartition en tranche d'âge, dans notre échantillon, le tableau 06 et la figure 11 ci-dessus montrent que le pic est enregistré à 70 ans, ce qui concorde avec de nombreuses études démontrant que l'apparition de cette pathologie commence à partir de 50 ans et augmente après la cinquantaine, enregistrant un pic à 70ans [35].

5. Répartition des fréquences génotypiques dans les deux groupes

L'étude moléculaire a concerné nos 34 patients, inclus dans l'observation les cas-témoins ; repartis en 16 cancéreux et 18 témoins présumés sains.

Tableau 07 : fréquence génotypique du polymorphisme C677T de la MTHFR

Témoins			Cancéreux		
	N	%		N	%
CC	07	38,89%	CC	06	37,5%
CT	06	33,33%	CT	06	37,5%
TT	05	27,78%	TT	04	25%
Total	18	100%	Total	16	100%

Le tableau 07 montre la comparaison des fréquences génotypiques entre les témoins et les cancéreux.

Nous avons déterminé le génotype de 18 témoins et 16 Cancéreux.

Le génotype C/T présente la même fréquence que le génotype C/C, dans les deux groupes pris séparément.

Dans notre population témoin, prise aléatoirement, le tableau représente 27,78 %. Ceci diffère avec certaines études réalisées à travers le monde et concorde avec d'autres [36]

La distribution des génotypes du polymorphisme de la C677T du MTHFR ne diffère pas beaucoup entre les témoins et les cancéreux, elle présente le même ordre décroissant en fréquences, correspondant aux génotypes CC, CT, en premier lieu puis, à un degré moindre, TT (Tableau 07).

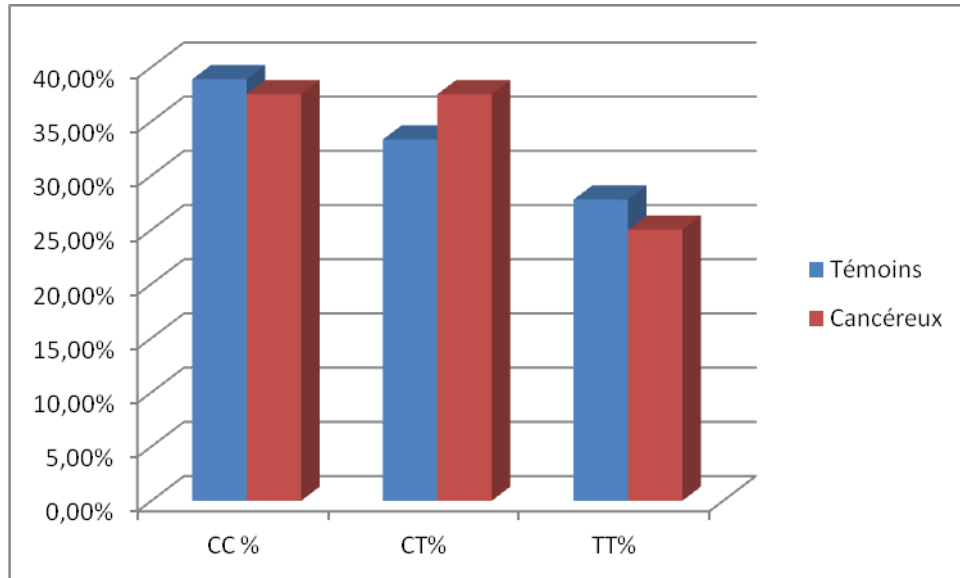


Figure 12 : Répartition des fréquences génotypiques dans les population de témoins et celle des cancéreux

Selon les résultats obtenus (Figure 12), on peut observer que le génotype CT a la même fréquence que le génotype homozygote normal : CC chez les cancéreux et chez les témoins.

Le génotype homozygote muté TT, correspond à une fréquence de 25 % chez les cancéreux. Il est de 27,78% chez les témoins, montrant que la présence de cette mutation n'est pas en corrélation avec la maladie, ni liée à la présence d'un cancer du pancréas. Ce résultat concorde avec un certain nombre d'études [37].

En revanche d'autres études démontrent que la mutation TT 677 de la MTHFR est associée au cancer du pancréas [38] [39]. Ces études ont démontré que la présence de la mutation C677T dans le gène de la MTHFR chez des patients cancéreux est liée à un risque hautement significatif à la survenue d'un cancer du pancréas, indépendamment de tout autre facteur de risque.

La discordance entre notre étude et l'étude de Donghni li et al, peut être expliquée par la taille de l'échantillon, le nôtre étant très restreint.

Un plus grand nombre d'études exhaustives, et/ou multicentriques, pourrait aider à expliquer cette disparité entre les résultats.

6. Répartition des fréquences alléliques dans les deux groupes

Tableau 08: Fréquences alléliques de la MTHFR dans la population malade et témoins.

	Témoins		Cancéreux	
	N	%	N	%
C	20	55,56%	18	56,25%
T	16	44,44%	14	43,75%
Total	36	100%	32	100%

Le tableau 08 montre que la répartition des allèles de la MTHFR est inégale sur l'ensemble de deux groupes. Cependant on constate que l'allèle T présente la même fréquence dans les deux groupes (Figure 13) : chez les témoins il est de 44,44 % tandis qu'il est de 43,75 % chez les cancéreux, ce qui confirme la non implication de l'allèle T dans la survenue d'un cancer du pancréas.

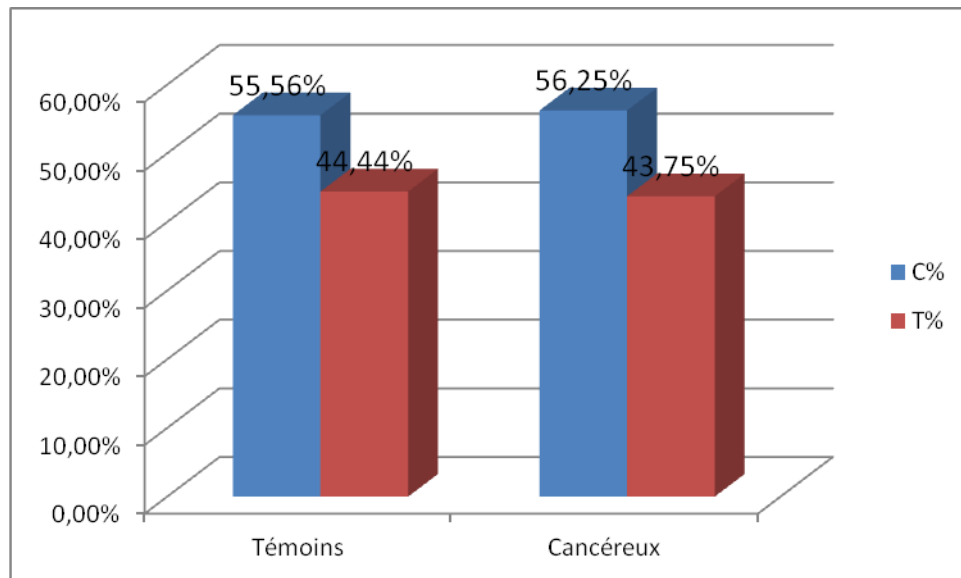


Figure 13 : Répartition des fréquences alléliques de la MTHFR dans la population témoin et dans les Cancéreux

À ce stade de notre travail nous ne pouvons guère tirer de conclusions concernant la relation entre la présence de l'allèle T et la localisation du cancer pancréatique, comme rapporté dans la littérature [40].

Tableau 09 : Calcul des Odds ratio des sujets malades ayant un allèle T par rapport aux témoins ayant un génotype CC.

	Odds ratio	P
TT vs CC	0,93	ns
TT+CT vs CC	0,98	ns

* : Limites de confiance selon Cornfield à 95%

Le calcul de l'Odds ratio montre que :

- les porteurs de l'allèle T ne présentent pas une association significative vis-à-vis du cancer du pancréas, suggérant que les sujets ayant un allèle T ne sont pas prédisposés à développer un cancer du pancréas.

Ceci ne concorde pas avec les nombreuses études qui démontrent l'implication de l'allèle T dans la survenue d'un cancer du pancréas, tel que l'étude réalisée en 2006 par l'Américain Gastroenterological Association (AGA) Institute ; démontrant que l'allèle T joue un rôle prépondérant dans la carcinogénèse du pancréas [41].

Annexe 1 : Le questionnaire

Date :

No.

Nom : Prénom Sexe :

Age : Poids : Taille : Tour de taille :

Situation familiale Marié (e) : Célibataire : Autre :

Niveau d'étude : Primaire : Secondaire : universitaire : Autre....

Fonction :

Origine ethnique :

Autres :

Fumeur : Nbre/J : Café : Nbre/J :

Chique : Alcool :

Tension artérielle : Systolique : Diastolique :

Contraceptifs : Types de contraceptifs :

Age de diabète :

Pathologies associées :

Antécédents Personnels	Antécédents Familiaux

Diagnostic :

Examens complémentaires :

Traitements :

Chol : ... TG : ... HbA1c : μ Alb : ... Hcy : ... Glycémie : ... Autre :

Annexe 2:

-Les étapes de l'extraction de l'ADN :

1- Préparation des leucocytes

- Dans un tube Falcon de 50 ml ; mettre le sang total (7-10 ml) et compléter à 45ml avec du TE 20 :5. Laisser 10 min dans la glace.
- Centrifuger 15 min à 3900 g (3900 rpm).
- Déverser le surnageant prudemment afin de garder le culot leucocytaire précipité au fond de tube.
- Rajouter le TE 20:5 au culot jusqu'à 25-30 ml, agiter pour le remettre en suspension et laisser 10 min dans la glace.
- Centrifuger dans les mêmes conditions précédentes.
- Déverser le surnageant : obtention d'un culot de leucocytes. (Si on s'arrête à ce niveau, les mettre dans un tube nunc de 15 ml avec du TE 10 :1 et les conserver à -20°C dans un congélateur).

2- Extraction de l'ADN

- Décongeler les leucocytes.
- Centrifuger pendant 15 min à 3900 rpm
- dilacérer le culot de leucocytes soigneusement afin de les prendre complètement et les mettre dans un tube Falcon conique de 15 ml.
- Ajouter 3 ml de tampon de lyse (Na Cl 400 mM, EDTA 2mM, Tris 10mM, PH 8.2)
- Ajouter 200 µL de SDS à 10% (100 g SDS + 1000 ml H₂O)
- Ajouter 100 µL de protéinase K (PK) à 10 mg / ml.
- dans l'étuve, Agiter le tube sur une roue rotative à 37°C pendant une nuit.
- Le lendemain ; refroidir dans la glace.
- Ajouter 1 ml de Na Cl 4 M et agiter rigoureusement à la main.
- Remettre 5 min dans la glace (précipitation des protéines).
- Centrifuger 15 min à 2500 rpm.
- Transvaser le surnageant dans un tube Falcon de 50 ml, ajouter 2 fois son volume d'éthanol absolu (100%) préalablement refroidi et agiter en tournant le tube plusieurs fois : **la formation de la méduse** visible à l'œil nu. (Laisser éventuellement 30 min à -20°C si la pelote d'ADN ne se forme pas).
- Récupérer la pelote d'ADN par une pipette pasteur et la rincer 2 fois dans l'éthanol à 70% dans un tube nunc (ependorf) stérile.

3-Solubilisation de l'ADN :

- L'ADN est réhydraté en ajoutant entre 300 et 1000 μL de TE 10 :1 selon la grosseur de la pelote et la concentration souhaitée.
- Laisser une nuit sur agitateur rotateur à 37°C, puis à température ambiante jusqu'à dissolution complète (de 1 jusqu'à 3 jours).
- Pour la réextraction de l'ADN, dans le cas où il est contaminé (par des protéines ou par un ARN), ajouter à la solution d'ADN, 200 μl SDS et 200 μl PK, agiter et laisser dans la roue à une température de 37°C pendant 7 jours, puis déterminer la DO de cette ADN.

Annexe3

Tableau 12: Préparation du milieu réactionnel du PCR pour MTHFR

PCR	MIX	X Nombre D' ADN	Quantité
H2O	35.2 μ		
Tampon 10x sans Mg cl2			
Dntp 2Mm	5 μ		
MgCl2 Mm (1,5mM)	3 μ		
Oligo F (100 pmol/ μ l)	0,2 μ		
Oligo R (100pmol/ μ l)	0,2 μ		
Taq polymérase	0,4 μ		

Dans l'ependorf : 2 μ l ADN + 49 μ l Mix ; puis dans le thermocycleur et appliquer le programme de l'MTHFR.

➤ **Oligo nucléotides utilisés :**

Oligo F (forward primer) : 5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3'

OligoR (reverse primer) : 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'

➤ **Dilutions des solutions mères utilisées**

- ❖ Oligo F solution mère 268 ,2ml (dilution 1/25)

Oligo F solution fille : 37,28 ml de Oligo F solution mère + 62,72 ml H2O distillé.

- ❖ Oligo R solution mère 333ml

Oligo R solution fille : 30 ml de Oligo R solution mère + 69,97 ml H2O distillé.

- ❖ dNTP solution mère

dNTP solution fille : 10 ml de dNTP solution mère + 90 ml H2O

- ❖ MgCl2 solution mère

50ml MgCl2 + 50ml H2O distillé

Tableau 13: Déroulement des cycles de la PCR dans le thermocycleur

Nombre de cycles	Etape	Température (°C)	Durée
X1	Dénaturation	94	5min
X30	Dénaturation	94	30s
	Hybridation	65	30s
	Elongation	72	40s
		72	10min
		4	5min-24h

Annexe 4

Tableau 14: préparation du milieu de digestion par l'enzyme Hinf I

Milieu de digestion	Quantité en μ l
Tampon de Hinf I	5
Hinf	1
H2O	4
BSA (Bovine sérum albumine)	0,2

X (nombre de produit de PCR) 30 ml produit PCR +10 ml de Mix
- le BSA est un activateur.

Préparation du gel d'agarose :

1, 5 g d'agarose + 100 ml TBE 1X + 10 ml BET (Bromure d'etidium)

Dépôts des échantillons :

- 15 μ l de produits de digestion + 2 à 3 μ l de Bleu de promophéno

- 3 μ l de marqueur (PM 20pb LADDER ref.018206) + 2 à 3 μ l de Bleu Bromophéno.

Préparation de Bleu de Bromophéno (BBP) : BBP 20mg

[(Tris 0.5M: 2ml + Glycérol: 5ml) PH 7.5] Qsp 10 ml H₂O

Préparation de TBE 10X: Tris 108g

- Acide borique 55g

- Ajuster le PH à 8.3 avec l'acide acétique glacial

- EDTA 9.3g

- QSP 1L H₂O

Référence

- [1]_ **Registre du cancer de Sétif .Algérie.** Cancer Incidence in Five Continents, Vol. VI, VII, IX.)
- [2]Laurent Bochatay, Marc Girardin, Philippe Bichard, Jean-Louis Frossard .**Cancer pancréatique en 2014: épidémiologie et dépistage, Rev Med Suisse** 2014;1582-1585
- [3] **Le petit Larousse de la médecine.** p674, édition (2008).
- [4] **In VS.** Rapport sur l'évolution de l'incidence et de la mortalité par cancer en France de 1978 à 2000. (2003), www.invs.santé.fr
- [5]**Cowgill SM, Muscarella P.** The genetics of pancreatic cancer. *Am J Surg.* (2003);186(3):279-86.
- [6]_ Whipple A.O, Parsons W.B, Mullins C.R Treatment of carcinoma of the ampulla of Vater. *Ann Surg.* 102 (1935) 736.
- [7]_ **Marieb, E.** Anatomie et physiologie humaines.- ed 4 américaine : de Boek université, 1999,p 614.
- [8]_]_ FISCHER, F.Prise en charge actuelle des cancers du pancréas, *J Pharm Clin, vol. 26, n° 1, mars 2007.P26-27.*
- [9]_ **Buecher.B.**Les syndromes de prédisposition héréditaire aux adénocarcinomespancréatiques,vol. 19 n8 10, décembre, 2012. p 333-334.
- [10]_ LAFITTE, M. Adénocarcinome canalaire pancréatique Mécanisme moléculaire et approche thérapeutique. Thèse Doctorat option génétique de l'université bordeaux 2. (2012).p 17.
- [11]_ **Annie J. Sasco,** *Epidémiologie des cancers, Médecine thérapeutique* 2000; 6:820-5.)
- [12]_ **Oukkal.M., Bouzid.K.** *Mise au point sur le traitement médical du cancer du pancréas,* Santé-mag, Novembre(2012); N 03.
- [13]_ **Warshaw AL., Fernandez del Castillo C.***panreaticcarcinoma,* N Eng J Med 1992; 326 : 455-465
- [14]_ **Sielezneff I., Cowen D., Payan MJ.** « *Tumeurs du pancréas (155)* », Juin 2005
- [15]_ **BUSCAIL, L.** Facteurs de risque de l'adénocarcinome pancréatique.(2007). TSA 50032, 31059 Toulouse Cedex 9.p 1-2.
- [16]_Buscail, L., Bournet, B., Facteurs de risque du cancer du pancréas, tome 36 > n° 9 > septembre 2007 > cahier 2. P 1247.

[17]_ **Astrid, L., Pierre. L.**, La voie de signalisation RAS/MAPK. (2010), Cancérologie. Vol. 2 N° 1 - 2010 - 38-42 DOI 10.4267/2042/30747. p 2-3.

[18]_ **Neuzillet, C.** Inhibition de la voie de MEK, Vol. XXI - n° 7 - septembre 2012.p 335.

[19]_ **Rouayrenc, J.** La famille des facteurs TGF- β et leur connexion au noyau, m/s n° 11, vol. 12, novembre 96, P1265-1266.

[20]_ **Jean-Jacques, L.**, Rôle du TGF β dans le cancer chez l'humain : de la suppression tumorale vers le développement des métastases,(2012).p4-5.

[21]_ **Turrini, O. et al .**,Les altérations génétiques dans les lésions précancéreuses pancréatiques et leurs implications en clinique, Gastroentérologie Clinique et Biologique (2009) **33**, e1—e9, P3.

[22]_ **Thierry ,S.** Cycle cellulaire et apoptose :le gène suppresseur de tumeur *p53*,(2000) *médecine/sciences 2000 ; 16 : 469-72.p1-2.*

[23]_ **Thierry, S. Dehouche, K. Bérout, C.,***L'analyse des mutations du gène p53 dans les cancers humains : le lien entre l'épidémiologie et la carcinogénèse,m/s n° 12, vol. 16, décembre 2000, P1387.*

[24]_ **Leclerc, D., Rozen, R.,** Génétique moléculaire de *MTHFR* Les polymorphismes ne sont pas tous bénins, M/S n° 3, vol. 23, mars 2007, P297-299.

[25]_ **VALDIGUIE. P.** *Biochimie clinique.* Médicales internationales. 2eme édition (1995).Paris.

[26]_ **DELPECH M.** *les techniques d'extraction de l'ADN à partir d'un échantillon sanguin.* Ann Biol Clin. (1997) 57 :77-84.

[27]_ **Rumeau-Rouquette C., Blondel B., Kaminski M, Bréart G.** *Epidémiologie : méthodes et pratique.* Flammarion-Médecine, Paris, 1993.

[28]_ **FRANOIS D., DRUCKER J., MOREN A.** *Epidémiologie d'intervention.*EditionsArnette (1992) :589

[29]_ **Encyclopedie canadienne de Cancer.** Journal of Gastrointestinal Cancer. 2012.

[30]_ **Fournet J.** Cancer du Pancréas, 2003.

[31]_ **Encyclopedie canadienne de Cancer.** Journal of Gastrointestinal Cancer. 2012.

[32]_ **MediResource.** Cancer pancréatique. 2012.

[33]_ **Lebeau. JP,** Dictionnaire médical, (2010).

[34]_ Société canadienne du cancer(2012)

[35]_ Lorenzo D., Botto, Quanhe Yang. National Office of Public Health Genomics, HuGENetTM, November 2,(2007).

[36]_ Larsson. S *et al.* **Folate intake, MTHFR Polymorphisms, and Risk of Esophageal, Gastric, and Pancreatic Cancer, (2006).**

[37]_ Hambaba. L., *et al.*, Relation entre hyperhomocystéinémie et polymorphisme C677T du gène de la méthylène tétrahydrofolate réductase dans la population algérienne saine Ann Biol Clin 2008 ; 66 (6) : 637-41

[38]_ Donghni li *et al.* **5. 10 méthylène tétrahydrofolate réductase polymorphisms and the risk of Pancreatic cancer, (April 2005).**

[39]_ *Cancer Epidemiol Biomarkers, 1470*

[40]_ **Hruban RH. et al.** Progression model for pancreatic cancer. Clin Cancer Res. (2000); 6(8):2969-72

[41]_ **lorenzo D., Botto Quanhe Yang. National Office Of Public Health Genomics, HuGen et TM, November 2, (2007).**