

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
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
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 : Sciences Biologiques

Spécialité : *Génétique Moléculaire*

Intitulé :

Etude moléculaire du cancer du rein

Présenté et soutenu par : Bouchemal Amina

le : 30/06/2015

Jury d'évaluation :

Président du jury : Pr. Satta D

Professeur- Université des frères Mentouri Constantine

Rapporteur : Dr. Rezgoune-Chellat.D

Maitre de conférences - Université des frères Mentouri
Constantine

Examineurs : Mme Ziada.H

Maitre assistant - Université des frères Mentouri Constantine

Année universitaire
2014 - 2015

Table des matières

REMERCIEMENTS ET DÉDICACES

LISTE DES ABRÉVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

Introduction	1
I. Généralités	2
1. Anatomie du rein	2
1.1 Morphologie	2
1.2 Vascularisation	2
2. Histologie du rein	2
1. Physiologie du rein	3
3.1 Fonctions exocrine du rein	3
3.2 Fonctions endocrine	3
3.3 Fonctions métaboliques	4
4. cancer du rein	4
4.1 Historique	4
4.2 Epidémiologie	5
4.3 Anatomopathologie	6
4.4 Circonstances de découverte et diagnostique	7
4.5 Pronostic	8
II. Aspect moléculaire du cancer du rein	8
1. Les marqueurs génétiques	8
1.1 VEGF	8
1.2 Anhydrase carbonique	9
1.3 CXCR	9
1.4 ARNm	9
2. Les voies moléculaires du cancer du rein	10
2.1 Voies de signalisation dans le ccRCC	10
2.2 Les voies de signalisation du CCR tubulo-papillaire	13

3. La MTHFR.....	13
3.1 Protéine MTHFR.....	13
3.2 Fonction	13
3.3 Gène MTHFR	14

Partie expérimentale

I. Méthodologie	16
1. Patients et méthodes.....	16
1.1 Recrutement.....	16
1.2 Les critères d'inclusions/ exclusions.....	16
1.3 Collecte des échantillons.....	16
1.4 Questionnaire	16
1.5 Techniques réalisées.....	17
2 Analyse statistique.....	21
II. Résultats et discussion	23
1.Répartition selon le sexe.....	23
2.Répartition selon l'âge.....	24
3.Répartition selon le type histologique	24
4. Association entre cancer et autres pathologies.....	25
5.Habitudes toxiques	25
6.Antécédents familiaux.....	25
7.Répartition selon le génotype.....	25
Conclusion et perspectives.....	27

Références bibliographiques

Annexes

Résumés

Remerciements

Je voudrais exprimer mes sincères remerciements :

A Mme le professeur Satta responsable de la filière de génétique, pour son dévouement et suivi

Durant toute notre formation et qui me fait l'honneur d'être la présidente du jury de ce mémoire.

A Mr le professeur Abadi et Mme le professeur Benlatrèche qui nous ont ouvert la porte du laboratoire de recherche de biologie moléculaire pour réaliser ce travail.

A Mr le professeur Dahdouh qui nous a accueilli dans le service d'urologie

A Mme le docteur Rezgoune-chellat mon encadreur pour sa précieuse aide

Aux membres du jury de ce mémoire :

Dr satta . D

Dr Rezgoune-Chellat. D

Mme Ziada . H

Dédicaces

*Je dédie ce travail à ces personnes qui m'ont aidé
et soutenu durant tout le travail :*

Mes parents

Mes frères

Ma sœur et mon beau frère

Racim et Rasha line

Miryam, Lyliã, Rymã et Hana

A toute ma famille et mes amis

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNmi	Micro- Acide ribonucléique messenger
BET	Bromure d'éthidium
BHD	Birt-Hogg-Dubé
CA	Anhydrase carbonique
ccRCC	Carcinome rénal à cellules conventionnelles
chRCC	Carcinome à cellules rénales chromophobes
cpRCC	Carcinome tubulo-papillaire
CXCL12	C-X-C motif chemokine 12
CXCR	CXC chemokine receptors 4
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR	Epidermal growth factor receptor
FH	Fumarate Hydratase
GLUT	Glucose transporter
HCY	Homocystéine
HIF	Hypoxia-inducible factor
ILK2	Interleukine 2
IMC	Index de masse corporelle
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
Mbo	Moraxella bovis
MET/HGFR	Hepatocyte growth factor receptor
MTHFR	Methylenetetrahydrofolate reductase
mTOR	Mammalian target or rapamycin

PCR	Polymerase chain reaction
PDGFβ	Platelet-derived growth factor
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIP2	Phosphatidyl-inositol-diphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol 3, 4, 5 trisphosphate
PKB /Akt	Protéine kinase B
PNET	Tumeurs primitives neuro-ectodermiques
PTEN	Phosphatase and tensin homolog)
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
SDS	Sodium dodecyl sulfate
STB	Sclérose tubéreuse de Bourneville
TNM	Tumeur primitive, node, metastases
TSC	Tuberous sclerosis complex
TGF	Transforming growth factor
Taq p	Thermus aquaticus polymerase
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
VHL	Von Hippel Lindeau

Liste des figures

Figure 1 : Schéma représentant les différentes parties du néphron.	3
Figure 2 : L'accumulation du HIF induit l'activation de gènes comme celui du <i>VEGF</i> .	11
Figure 3 : Voie de signalisation PI3K / AKT / mTOR.	13
Figure 4 : structure de gène de la MTHFR avec la localisation des protéines et de mutations Connus	15
Figure 5 : Profil du contrôle de la PCR.	19
Figure 6 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments issus par clivage du MboII présentant différents génotypes du polymorphisme A1298C de la MTHFR	21
Figure 7 : Répartition des patients selon le sexe.	23
Figure 8 : Répartition des patients selon l'âge.	24

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composants du mélange réactionnel de PCR pour le polymorphisme A1289C de la MTHFR.	18
Tableau 2 : Programme d'amplification PCR de la MTHFR.	18
Tableau 3 : Tailles des différents fragments obtenus selon les différents génotypes.	20
Tableau 4 : Tableau de contingence.	21
Tableau 5 : Répartition des patients selon le sexe.	23
Tableau 6 : Répartition des patients selon la tranche d'âge.	24
Tableau 7 : Répartition des témoins et patients selon le génotype.	25

Liste des figures

Figure 1 : Schéma représentant les différentes parties du néphron.	3
Figure 2 : L'accumulation du HIF induit l'activation de gènes comme celui du <i>VEGF</i> .	11
Figure 3 : Voie de signalisation PI3K / AKT / mTOR.	13
Figure 4 : structure de gène de la MTHFR avec la localisation des protéines et de mutations Connus	15
Figure 5 : Profil du contrôle de la PCR.	19
Figure 6 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments issus par clivage du MboII présentant différents génotypes du polymorphisme A1298C de la MTHFR	21
Figure 7 : Répartition des patients selon le sexe.	23
Figure 8 : Répartition des patients selon l'âge.	24

La survenue d'un cancer reste encore de nos jours un véritable problème, notamment pour les cancers diagnostiqués tardivement car se développant à bas bruit. Le cancer du rein, en est un parfait exemple. Considéré comme cancer relativement rare, son incidence est en augmentation croissante ces dernières années (2 à 4 % par an) [1]. Il représente 2 à 3 % des cancers de l'adulte [2].

C'est une pathologie qui est hétérogène du point de vue histologique [3,4]. De ce fait, il existe différents types histologiques : le carcinome à cellules conventionnelles ccRCC, le carcinome tubulo-papillaire cpRCC, le carcinome chromophile chRCC, le carcinome des tubes collecteurs (Bellini) et le carcinome sarcomatoïde.

Plusieurs facteurs de risque ont été incriminés. On retrouve essentiellement des facteurs liés aux comportements individuels, des facteurs liés à l'environnement et des facteurs de risque génétiques caractérisés par des affections héréditaires [4,5]. L'étude de ces pathologies héréditaires prédisposant au cancer rénal a permis une meilleure compréhension des mécanismes aboutissant à la cancérogenèse du rein. Il apparaît à travers de nombreuses études que des voies moléculaires communes avec les formes sporadiques et distinctes selon chaque type histologique ont été mises en évidence. Ces connaissances ont ouvert la voie vers la thérapie ciblée [6,8].

Le métabolisme des folates a un rôle prépondérant dans la synthèse des acides nucléiques et le profil de la méthylation de l'ADN, par conséquent, toute altération dans l'une des différentes étapes peut interférer dans le processus de développement tumoral [9]. Le gène de la MTHFR fait parti des gènes impliqués dans ce métabolisme. Plusieurs équipes de recherches ont étudié l'impact des polymorphismes de ce gène (le C677T et A1298C) sur l'activité enzymatique et sur la survenue de plusieurs pathologies dont le cancer du rein et ont démontré son implication dans la cancérogenèse [10,11].

L'objectif de notre mémoire sera d'étudier:

- L'étiopathogénie du cancer du rein.
- L'implication du polymorphisme A1298C dans la survenue du cancer rénal en s'appuyant sur la réalisation du génotypage A1298C de la MTHFR.

I. Généralités

Le rein est un organe vital. Les êtres humains en possèdent deux, mais il est possible de vivre avec un seul. La paire rénale, les voies excrétrices (les uretères et l'urètre) ainsi que la vessie composent l'appareil urinaire.

Les reins, filtrent le sang et excrètent l'urine qui sera véhiculée par les voies excrétrices jusqu'à la vessie où elle sera évacuée pendant la miction. Sa fonction principale est l'élimination des déchets et a un rôle prépondérant dans l'homéostasie de l'organisme [12].

1. Anatomie du rein

1.1 Morphologie

Les reins sont des organes paires encapsulés, de couleur rouge brun, aplatis et ovoïdes « en haricot » la face externe est convexe, la face interne est concave et accueille le hile qui constitue la zone de transit des éléments vasculo-nerveux et des voies excrétrices urinaires [13]. Ils pèsent 120 à 140 g et mesurent 12 cm de longueur, 6 cm de largeur et 3 cm d'épaisseur [12].

1.2 Vascularisation

Les vaisseaux (artère rénale, veine rénale et vaisseaux lymphatiques) pénètrent dans le rein par le hile rénal. L'uretère ressort du rein par le hile rénal et s'abouche à la vessie.

L'artère rénale pénètre au niveau du hile rénal et donne :

- **Les artères intra-rénales** : les branches de division de l'artère rénale, donnent naissance aux artères inter-lobaires, d'où partent les artères arquées, puis, les artères inter-lobulaires, desquelles partent les artérioles afférentes, puis les artérioles efférentes, qui donnent naissance aux capillaires péri-tubulaires.
- **Les veines** suivent sensiblement la même disposition que les artères avec présence d'anastomoses. La veine rénale s'abouchera dans la veine cave inférieure [12].

2. Histologie du rein

D'un point de vue histologique, le rein est lobé, les différentes formations, notamment le néphron (figure 1) qui constitue l'unité structurale et fonctionnelle du rein sont vues grâce à des coupes. Sur coupe sagittale du parenchyme rénale, on distingue deux zones :

- La zone corticale (le cortex) : périphérique, environ 1cm d'épaisseur.
- La zone médullaire (la médulla) : centrale, formée de striation ; correspondant aux pyramides de Malpighi (8 à 13) séparées par des expansions du cortex, les sommets des pyramides

sont appelés : papilles rénales .Ces pyramides coiffent de petits calices qui s'abouchent dans des grands calices qui vont dans le pelvis (le bassin) lequel se poursuit par l'uretère.

- Le néphron : Chaque rein humain compte environ un million. Il est composé du glomérule (ou corpuscule rénal de Malpighi) principalement localisés dans la corticale et du tubule [12].

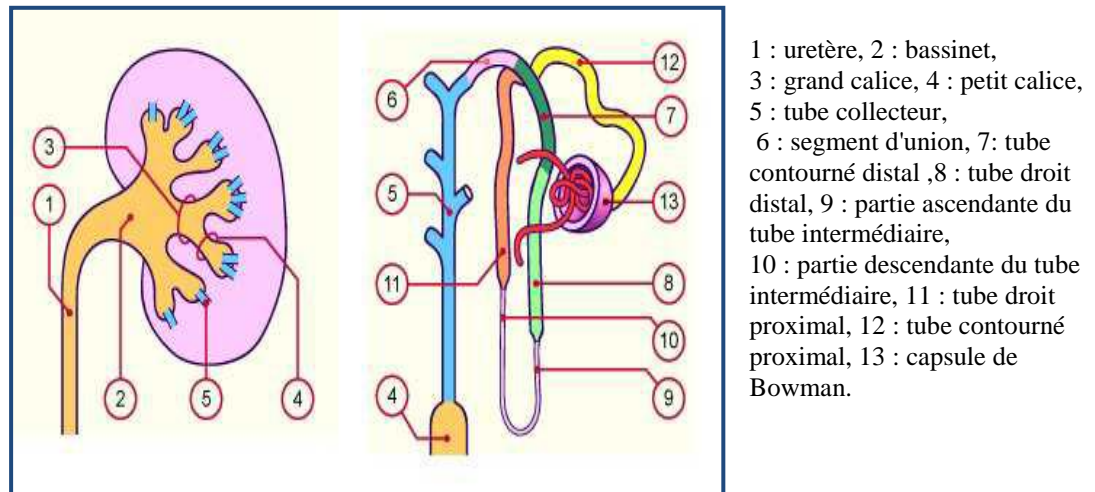


Figure 1 : schéma représentant les différentes parties du néphron [12].

3. Physiologie du rein

Le rein exerce diverses fonctions :

3.1 Fonctions exocrine du rein

Elle assure l'équilibre de l'organisme en eau, en minéraux et en électrolytes (molécules de sodium, potassium, chlore, bicarbonate, phosphate etc.) Par une fine régulation électrolytique et acido-basique tenant compte des variations imposées à chaque instant. Le rein est le seul organe à assurer la régulation de la kaliémie tenant compte à la fois des apports alimentaires en potassium et des pertes digestives. Par ailleurs grâce à la régulation de la volémie ; Il assure à lui seul la régulation lente de la pression artérielle.

Elle permet la détoxification et l'excrétion des déchets métaboliques terminaux (urée, créatinine, acide urique, oxalate).

3.2 Fonctions endocrines

Le rein représente le site de formation de plusieurs hormones [13], opérant dans diverses fonctions :

- La rénine (grâce au système rénine-angiotensine-aldostérone), les kinines et les prostaglandines, facteurs vaso-actifs, permettent de réguler la pression sanguine artérielle.

- L'érythropoïétine, facteur de croissance riche en acide sialique synthétisée par les cellules endothéliales du cortex et de la médullaire. Elle stimule l'érythropoïèse médullaire en agissant sur la différenciation, la prolifération et la maturation des précurseurs des hématies.

3.3 Fonctions métaboliques

Le rein est le siège de diverses voies métaboliques [14] :

- Avec le foie, les reins sont les seuls organes capables de néoglucogenèse. En cas de jeûne prolongé, le rein peut assurer jusqu'à 50 % de la néoglucogenèse à partir d'acides aminés et d'acide lactique.

- Les cellules tubulaires proximales assurent l'hydroxylation de la vitamine D inactive, la 25-hydroxy- vitamine D en 1,25 dihydroxy- vitamine D grâce à la 1- α - hydroxylase.

- Catabolisme de l'homocystéine (Hcy) par les voies de réméthylation et trans-sulfuration.

4. Cancer du rein

Le cancer du rein est une tumeur maligne développée à partir du parenchyme rénal [15]. **Moins de 10% des tumeurs du rein sont bénignes** : c'est par exemple le cas des oncocytomes, des adénomes papillaires et des angiomyolipomes (les plus fréquents) [3].

4.1 Historique

- Le premier cas de cancer du rein publié, remonte à 1810, découvert lors de l'autopsie d'une femme enceinte de 35 ans.

- La première classification des tumeurs du rein a été proposée dès 1841 par Pierre François Olive Rayer.

- Le débat sur l'origine du cancer du rein a été initié dès 1855. En 1883 Robson a introduit l'origine surrénalienne du cancer du rein. Cette hypothèse a été controversée en 1960 par Oberling qui a prouvé l'origine rénale du cancer justifiant le terme d'adénocarcinome.

- En 1968 Robson a proposé une classification anatomopathologique remplacée en 1978 par la classification TNM.

- Le XIXème siècle a été marqué par l'avènement de la biologie moléculaire modifiant ainsi le profil thérapeutique du cancer du rein. En effet, en 1976 l'interleukine 2 (ILK2) a été découverte par Morgan, constituant pendant plusieurs années le traitement de choix du cancer du rein métastatique.

- Les travaux de Zbar débutés en 1990 concernant le clonage du gène de la maladie de Von Hippel Lindeau (VHL) ont été la base des nouveaux traitements anti-angiogéniques constituant ainsi un espoir thérapeutique pour les cancers du rein métastatiques.

4.2 Epidémiologie

4.2.1 Fréquence

Il s'agit du troisième cancer urologique après ceux de la prostate et de la vessie [2]. Il représente 2 à 3 % des cancers de l'adulte. Son incidence est en constante augmentation (2% à 4% par an) [4]. Chaque année dans le monde, 200000 nouveaux cas de cancer du rein sont diagnostiqués et le nombre de décès est estimé à 100000 [4]. Le sex-ratio est de 2 hommes pour 1 femme. L'âge moyen de survenue de 67ans chez l'homme et de 70 ans chez la femme. Cependant le cancer du rein peut se voir à tout âge [3,6].

4.2.2 Facteurs de risque

L'étiopathogénie du cancer du rein est multifactorielle. En effet, plusieurs études internationales ont démontré le rôle de facteurs personnels ou environnementaux dans la genèse du cancer du rein [4,5].

4.2.2.1 Facteurs de risque liés aux comportements individuels

- **Le tabac** : Le tabagisme est un facteur de risque admis de cancer du rein. Par rapport aux personnes n'ayant jamais fumé, le risque est augmenté approximativement de 50% chez l'homme fumeur et 20% chez la femme fumeuse [16].

- **L'obésité** : L'obésité est reconnu comme étant un facteur de risque tant chez l'homme que chez la femme [16,17].

- **L'hypertension** : n'est pas un facteur étiologique indépendant du cancer du rein, souvent il existe un lien entre l'index de masse corporelle (IMC) et l'hypertension [16,18].

D'autres facteurs peuvent être aussi à l'origine du cancer rénal tels que :

- **Hémodialyses avec dysplasie multi-kystique** : Les sujets insuffisants rénaux chroniques sous dialyse ont un risque multiplié par dix de développer un cancer du rein (après une durée de plus de 3 ans) [3].

- **Patients transplantés** : Le risque de développer un cancer du rein sur rein natif est deux fois plus fréquent chez les patients transplantés, que dans la population générale [3,19].

4.2.2.1 Facteurs liés à l'environnement

- Certaines expositions professionnelles (les employés des hauts fourneaux, industries sidérurgique etc.) Auraient un risque de développer un cancer du rein [5]. Les produits incriminés sont : le trichloroéthylène , le pentachlorophenol ,le tetrachlorophenol ; l'amiante, le cadmium [3].

- L'exposition aux **radiations ionisantes** représente un facteur de risque avéré du cancer du rein : un excès de risque de cancer du rein a été démontré chez les survivants d'accidents nucléaires et chez les patients [20].

4.2.2.2 Facteurs de risque génétiques

Il existe des syndromes relativement rares qui prédisposent à la survenue du cancer du rein et caractérisent ce qu'on appelle les formes héréditaires ou familiales, en raison de la fréquence des manifestations cancéreuses dans ces pathologies [21]. On retrouve :

- **La maladie de Von Hippel-Lindau (VHL)** : de transmission autosomique dominante bien que rare est la forme familiale la plus fréquente et le modèle de l'angiogenèse tumorale dans laquelle un seul gène est impliqué : le gène VHL qui est situé sur le chromosome 3 [22].

- **La maladie de Birt-Hogg-Dubé (BHD)** : une maladie génétique à transmission autosomique dominante. Elle associe une atteinte pulmonaire et cutanée dans 90% des cas ainsi qu'une atteinte rénale dans 15 à 30% des cas. Les tumeurs du rein retrouvées sont souvent bilatérales, multifocales et de types histologiques variés ; le gène muté est le BHD situé sur le chromosome 7.

- **La sclérose tubéreuse de Bourneville (STB)** : une affection héréditaire autosomique dominante associant chez l'adulte diverses atteintes, comporte surtout des angiomyolipomes et des kystes rénaux comme lésions rénales mais des carcinomes à cellules rénales peuvent s'observer.

L'expression de la maladie est très variable d'un cas à un autre. Le gène incriminé est le gène TSC (*Tuberous sclerosis complex*) présent sur deux chromosomes : le chromosome 9 (TSC1) et le chromosome 16 (TSC2). Ce sont des gènes suppresseurs de tumeurs.

4.3 Anatomopathologie

La forme la plus fréquente du cancer du rein est le carcinome à cellules rénales 85% il est le plus souvent sporadique [4, 15,23].

4.3.1 Les carcinomes à cellules rénales (RCC) de l'adulte

Le carcinome à cellules rénales est un adénocarcinome. Selon l'endroit où il se développe, les expressions histologiques différentes. Il existerait une corrélation entre la cytogénétique et les différentes formes anatomo-pathologiques ce qui permettrait d'affiner les résultats obtenus par les techniques classiques [3].

✓ **Carcinome rénal à cellules conventionnelles ou cellules claires (ccRCC)**

Il représente 60 % à 80 % des cancers du rein. L'origine des cellules tumorales est l'épithélium du tube contourné proximal. Les altérations génétiques retrouvées sont : délétion du bras court du chromosome 3p25-26 (VHL), mutation des gènes TSC1 et TSC2 codant l'hamartine et la tubérine (STB), mutation du gène PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) (maladie de Cowden) .

✓ **Carcinome tubulo-papillaire (cpRCC)**

Tumeurs développées à partir du tube contourné distal représentant 10 à 15% des cancers du rein. Il y a de 2 types: type I (75 %) souvent multifocal et de bas grade, constitué de petites cellules basophiles et le type II uni focal et de haut grade, constitué de grandes cellules éosinophiles. Les altérations génétiques les plus fréquemment observées dans ce groupe de tumeurs sont : la perte du chromosome Y et une trisomie des chromosomes 7 et 17.

✓ **Carcinome à cellules rénales chromophobes (chRCC)**

Il représente 4 à 7 % des cancers du rein. Il se développe à partir des cellules intercalaires de type B du tube collecteur. Il est caractérisé par une perte des chromosomes 1, 2 ou 13 et par une perte du bras court du chromosome 3 dans 50% des cas.

✓ **Carcinome des tubes collecteurs (Bellini)**

Tumeurs de très mauvais pronostic représentant moins de 1 % des cancers du rein et touchant l'homme jeune. D'un point de vue génétique, les monosomies 18 et 21 et la perte du chromosome Y sont les anomalies prédominantes. Des délétions au niveau du bras long du chromosome 1 et du bras court du chromosome 8 ont été décrites.

✓ **Carcinome sarcomatoïde**

Représente 1% des carcinomes à cellules rénales. Se développe à partir du Tube contourné ou tube collecteur. Les anomalies chromosomiques rapportées sont la perte du chromosome 8,9, et 14.

✓ **Carcinome à cellules rénales inclassables:**

5 % des CCR que l'analyse morphologique seule ne peut typer.

4.3.2 Les autres tumeurs du rein

Elles sont plus rares et on peut citer : les tumeurs primitives neuro-ectodermiques (PNET) et les sarcomes.

4.4 Circonstance de découverte et diagnostic

Le cancer du rein peut être découvert : fortuitement lors d'une échographie, lors de symptomatologies clinique (Manifestations urologiques : Hématurie, douleur lombaire ; Signes

généraux : asthénie, amaigrissement, anorexie...) ou lors de détection de Métastases (surrénales, poumons, foie...) [3].

Le diagnostic repose essentiellement sur l'imagerie (échographie, tomodensitométrie, IRM) [22].

4.5 Pronostic

Le pronostic du cancer du rein au moment du diagnostic dépend de plusieurs facteurs :

- Le type histologique.
- Le stade pTNMx (annexe 1).
- Grade nucléaire de Fuhrman : il se repose sur la morphologie et la taille du noyau des cellules cancéreuses [23].

II. Aspect moléculaire du cancer du rein

Les cancers sont caractérisés par des modifications du matériel génétique. Dans le tissu tumoral, il existe des anomalies de nombre et des anomalies de structure (Délétion, translocation etc.) [24] Le cancer du rein de l'adulte n'échappe pas à cette règle. On exposera ci-dessous la répercussion de ces anomalies dans la carcinogenèse du rein et la potentielle utilisation de certains gènes comme marqueurs.

1. Les marqueurs génétiques

Il existe 3 gènes marqueurs connus qui sont : le **VEGF**, le **CA** et le **CXCR4**.

1.1 VEGF (Vascular endothelial growth factor)

Puissant facteur pro-angiogénique impliqués dans la croissance tumorale et la survenue de métastases [24].

1.1.1 VEGF et RCC :

Les études de l'expression du VEGF dans le RCC sont faites sur les isoformes solubles 121 et 165 du VEGF ou sur le dosage des récepteurs VEGFR2 solubles. Il semblerait y avoir une corrélation entre la concentration sérique du VEGF et le pronostic dans des groupes prédéfinis par le grade et le stade [25].

Une équipe de recherche a démontré une corrélation inverse entre le taux des transcrits et la concentration sérique de VEGF, avec une diminution des transcrits VEGF 121 dans les formes les plus avancées. Ce fait pourrait être lié à une activation de la traduction des formes 121 et 165 [26].

La motivation de l'utilisation du VEGF circulant comme potentiel marqueur pour déterminer les doses optimales de traitements ciblés chez les patients, vient d'une augmentation du VEGF

plasmatique après traitement par un anticorps anti-VEGFR2 à une dose préalablement déterminée comme optimale [27].

1.2 Anhydrase carbonique (CA)

Enzyme jouant un rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire en réponse à des conditions hypoxiques et sont impliquées dans l'oncogenèse et la progression tumorale [25].

1.2.1 CA et RCC :

L'étude de l'expression du CA permettrait d'identifier les sous-types de RCC et pour cause : La protéine CA9 n'est pas exprimée dans le rein adulte normal, Contrairement à la protéine CA12. Les protéines CA9 et CA12 sont exprimées dans les ccRCC. CA9 n'est pas exprimée dans les cellules de chRCC. La co-expression CA9-CA12 est parfois observée dans les cellules de cpRCC [25].

L'ARNm CA9 peut compléter le stade TNM et le grade Führman dans l'évaluation du risque métastatique du ccRCC [28].

1.3 CXCR4 (CXC chemokine receptors 4)

Récepteur membranaire couplé aux protéines G, de la famille des récepteurs de chimiokines. Il joue un rôle central dans plusieurs pathologies dont le cancer. Le récepteur CXCR4 est surexprimé dans un grand nombre de cancers dont le cancer du rein [25].

La fixation du ligand SDF-1 (*Stromal cell-derived factor 1*) CXCL12 (sécrété en grande quantité par les cellules des ganglions lymphatiques, de la moelle osseuse, du foie, du poumon) déclenche une cascade rapide de signalisation, aboutissant à l'acquisition de nouvelles propriétés favorisant la migration. Une étude sur des tumeurs primitives et métastatiques de type adénocarcinome rénal à cellules claires, a retrouvé un marquage nucléaire qu'au sein des métastases [29- 31].

1.4 ARNmi :

Il existe de nouvelles études [25] stipulant que l'étude de l'expression des miARNs pourrait aider à :

- Distinguer le tissu normal et le tissu cancéreux.
- Classifier les tumeurs agressives ou mal différenciées.

2. Voies moléculaires du cancer du rein

Les altérations de certains gènes sont la cause de la transformation maligne. Ceci est due à l'activation de certaines voies de signalisation qui diffèrent selon chaque type histologique de CCR. Actuellement ces voies sont prises en compte dans les choix thérapeutiques [6, 7, 8].

2.1 Voies de signalisation dans le ccRCC

Dans le ccRCC, on retrouve trois voies principales et interdépendantes. Celles-ci ont été mises en évidence dans leur participation à la cancérogénèse du rein par la promotion de l'angiogénèse, la survie cellulaire et la prolifération tumorale [7].

2.1.1 Voie VHL /HIF /VEGF

C'est la voie de prédilection pour les ccRCC. Les cellules tumorales en phase de croissance sur-expriment des facteurs pro-angiogéniques qui activeront à leur tour les cellules endothéliales. (figure 3) Ceci aboutira à une néo-angiogénèse tumorale, essentielle à la fois, pour le développement mais également pour la dissémination et le potentiel métastatique, ce qui fait de cette voie une cible thérapeutique majeure [7]. Les gènes et leurs produits impliqués dans cette voie sont :

- **VHL** : gène suppresseur de tumeur, sa perte de fonction est causée par la présence d'une mutation inactivatrice germinale sur le premier allèle du chromosome 3 suivie d'une seconde sur le deuxième allèle (selon la théorie des deux coups de Knudson) dans les formes familiales [32]. Les altérations génétiques (mutation de la séquence codante /altération du promoteur) de ce gène sont retrouvées dans 30 à 60% des ccRCC sporadiques avec un âge de survenue avancé et une atteinte unilatérale [3].

La principale fonction du VHL est la régulation du facteur HIF (*Hypoxia-inducible factor*) en cas de normoxie. Pour ce faire la protéine VHL (*pVHL*) avec un complexe multienzymatique permet l'ubiquitylation de la sous-unité α de l'HIF, puis sa dégradation dans le protéasome.

Cependant en conditions d'hypoxie ou d'inactivation de VHL, le produit du gène HIF agira comme facteur de transcription et activera le VEGF permettant le maintien des néo-vaisseaux et vaisseaux matures (figure 2) [33].

- **HIF** : il active également de nombreux autres gènes aux diverses fonctions :

Prolifération cellulaire via le PDGF β (*Platelet-derived growth factor*) et TGF α (*transforming growth factor*) : facteur de croissance des tissus épithéliaux, qui joue un rôle autocrine de stimulation de la prolifération pour la cellule tumorale.

Contrôle du pH, protégeant ainsi les cellules en situation de stress hypoxique par les anhydrases carboniques, dont la CA 9.

Métabolisme du glucose au niveau de son transport GLUT1 (*Glucose transporter*) ou de la glycolyse par 6-phosphofructose-2-kinase, facilitent certainement la survie de la cellule tumorale en situation de stress.

Ces facteurs conduisent en situation physiologique à faciliter la survie cellulaire en condition d'hypoxie, et en situation pathologique à stimuler la croissance tumorale et stopper l'entrée des cellules en apoptose [34].

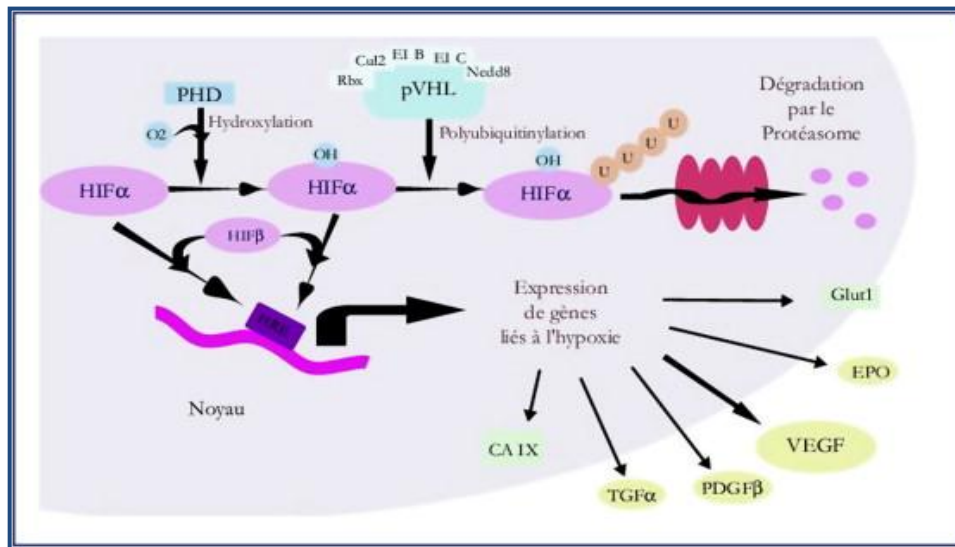


Figure 2 : L'accumulation du HIF induit l'activation de gènes comme celui du *VEGF* [2iw]

2.1.2 Voie PI3K/Akt/mTOR

C'est une voie de signalisation intracellulaire, jouant un rôle-clé dans l'homéostasie cellulaire par sa fonction de régulation de l'apoptose, la croissance et du cycle cellulaire (figure 3) [35].

- Phosphoinositide 3-kinase (**PI3K**) est une enzyme, activée par les récepteurs membranaires ou par mutation, elle peut être inhibée par le PTEN, gène suppresseur de tumeurs (chromosome 10) dont on retrouve souvent une diminution d'expression. La PI3K active la protéine kinase B (*PKB/Akt*) en phosphorylant le (PIP2) en (PIP3) Akt proto-oncogène agit alors en régulant de nombreux substrats, dont mTOR en inactivant ses inhibiteurs.

- **mTOR** (*mammalian target or rapamycin*) agit au niveau de la cellule tumorale et de la cellule endothéliale, il est observé à plusieurs niveaux de la carcinogénèse du ccRCC :

Interaction avec la voie VHL/HIF/VEGF : l'activation de mTOR conduit à l'augmentation de la traduction des ARNm de HIFα. Il agit donc, par l'intermédiaire de HIF, sur la néoangiogénèse tumorale indépendamment de VHL.

Transduction du signal : il agit très en aval de la chaîne de transduction, en favorisant

fortement le métabolisme tumoral car il augmente la synthèse protéique. Cette dernière, peu spécifique, touche l'ensemble du métabolisme tumoral, et mène à une surexpression des molécules impliquées dans la carcinogénèse, telles que les molécules favorisant l'entrée en cycle, ou les molécules anti-apoptotiques.

Contrôle du cytosquelette : parmi les cibles d'aval de mTOR on retrouve les protéines

Contrôlant le cytosquelette

* NB : aucune mutation du mTOR n'a été retrouvée jusqu'à présent ce qui en fait un cible de choix dans les thérapies ciblées.

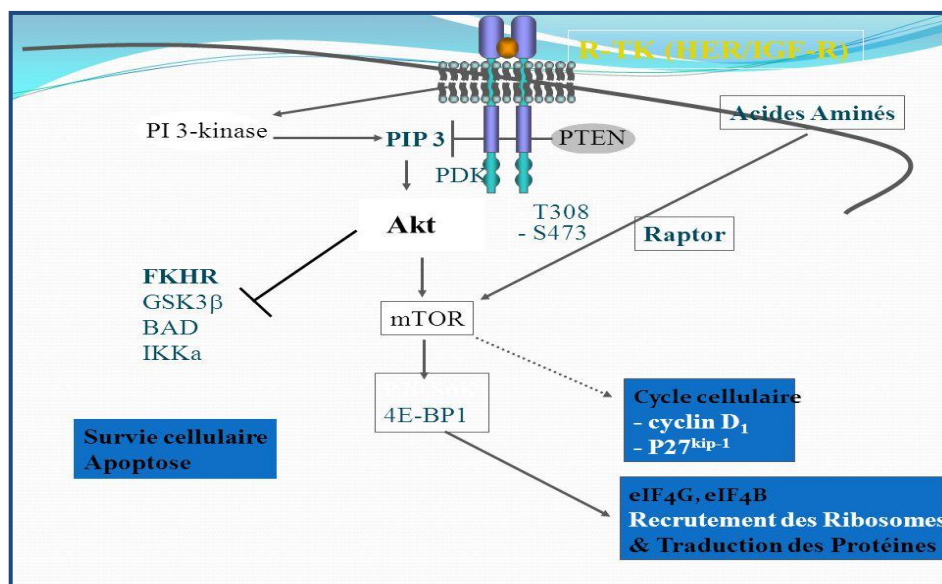


Figure 3 : Voie de signalisation PI3K / AKT / mTOR. [35]

2.1.3 Voie de l'EGFR et MAPKineses

Les voies de signalisation sous la dépendance de l'EGFR (*Epidermal growth factor receptor*) sont connues pour leur rôle dans la carcinogénèse de nombreux cancers, conduisant à la stimulation de la prolifération et à l'inhibition de l'apoptose des cellules tumorales. Il apparaît fréquemment surexprimé dans le cancer du rein. Adjoignant à ceci que l'expression de $TGF\alpha$ (un de ses ligands) dépend de la voie VHL/HIF, donc, l'activation de cette voie, permet la surexpression de $TGF\alpha$, qui entraîne subséquentement la prolifération tumorale via l'EGFR.[8]

Dans la voie MAPK, (*Mitogen-activated protein kinase*) plusieurs kinases (Ras, Raf, MEK, ERK) sont successivement activées selon une cascade de signalisation qui aboutira à la modification de l'expression génique qui a un impact capital sur le processus tumoral (mTOR peut être directement activée par ERK ce qui révèle une relation entre les deux voies).

2.2 Les voies de signalisation du CCR tubulo-papillaire

2.2.1 sous-type1

Comportent des mutations non-sens sur le domaine tyrosine kinase du proto-oncogène MET/HGFR (*hepatocyte growth factor receptor*). MET y est fréquemment surexprimé, notamment par des anomalies de nombre du chromosome 7. L'activation de MET conduit, par l'intermédiaire des voies des MAPKinases et PI3K/Akt à des signaux de survie cellulaire, de prolifération et de modifications du cytosquelette. Rappelons que l'expression de MET est sous la dépendance de HIF. [36]

2.2.2 sous-type 2

Les mutations portant sur le gène FH (chromosome 1) codant pour une enzyme clé du cycle de Krebs, la Fumarate Hydratase, (catalyse l'hydratation réversible du fumarate en malate) entraînent une diminution de son activité aboutissant à une surexpression de la succinate qui permet une stabilisation du HIF [36].

3. La MTHFR

Le méthylène tetrahydrofolate reductase (MTHFR) est une enzyme clé dans la régulation du métabolisme des folates ; essentiel à la synthèse de l'ADN et sa méthylation ainsi que la synthèse d'acides aminés (méthionine).[37]

3.1 Protéine MTHFR

C'est une protéine homodimère comportant 656 acides aminés présente dans le cytoplasme. Son poids moléculaire est de 74597 Da [37,38]. Elle est localisée dans la rate, les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse.

3.2 Fonction

La MTHFR catalyse la conversion irréversible du 5,10-méthylentetrahydrofolate en 5-méthyltetrahydrofolate qui est la forme prédominante du folate circulant et qui constitue le donneur de méthyle pour la reméthylation de l'homocystéine en méthionine [37]. Ce recyclage de l'hcy repose principalement sur l'activité enzymatique de la MTHFR ce qui lui donne un rôle crucial compte tenu des effets néfastes d'une hyper-homocystéinémie (endommagement de l'ADN, stress cellulaire ...)

3.3 Gène de la MTHFR

Le gène de la MTHFR est située en p1 (1p36.3), (Figure4) sa taille est de 2,2Kb contenant 11 exons.

Plusieurs sites d'amorce de la transcription, d'épissage alternatif et de polyadénylation ont été observés pour le gène MTHFR. [38]

Les différentes études menées sur la région régulatrice du gène ont montré que le gène ne contient pas de TATA box, mais contient plusieurs îlots CpG très importants pour les sites d'union pour les autres facteurs de transcription.

Il existe plusieurs mutations et polymorphismes de ce gène avec des prévalences différentes selon l'ethnie et la géographie; (Figure4) C677T et A1298C sont les deux polymorphismes les plus fréquents particulièrement chez les caucasiens et le A1793G récemment découvert; ces polymorphismes engendrent une baisse de l'activité enzymatique. Plusieurs équipes de recherches ont étudiés le lien de ces polymorphismes avec différentes pathologies : maladies cardiovasculaires, schizophrénie et notamment le cancer [10,11].

Le polymorphisme C677T correspond a une substitution d'une alanine pour une valine dans la séquence protéique rend MTHFR thermolabile avec une diminution de 50% de son activité.

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.[37]

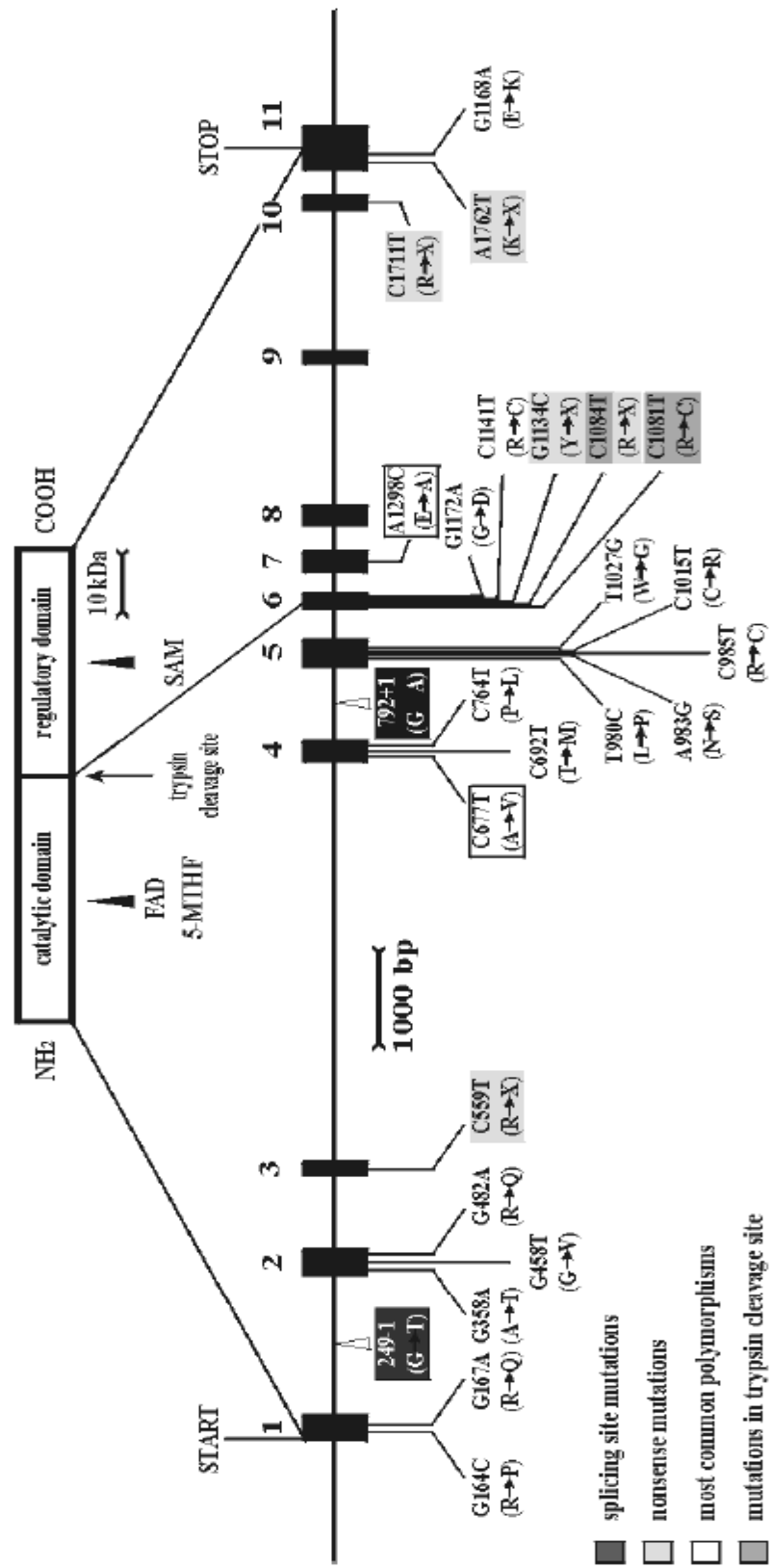


Figure 4 : structure de gène de la MTHFR avec la localisation des protéines et de mutations connus [38].

Dans notre partie expérimentale, nous avons réalisé une étude transversale de type cas témoin ; sur une durée de 3 mois. Cette étude a été établie sur deux catégories de populations : une première de témoins (sujets présumés sains) et la seconde de patients ayant un cancer rénal.

1. Patients et méthodes

1.1 Recrutement

1.1.1 Les patients :

9 cas atteints d'une tumeur rénale maligne de type cancer à cellule rénale (RCC), d'aspects histologiques différents, des deux sexes et d'âge variant entre 32- 66 ans ; ont été recruté au niveau de l'établissement hospitalier spécialisé en Uro-néphrologie (EHS Daksi Constantine).

1.1.2 Les témoins

16 sujets présumés en bonne santé volontaires, des deux sexes, de la même tranche d'âge que les patients, faisant partie de la population de Constantine ou de sa périphérie ont été inclus dans cette étude.

1.2 Les critères d'inclusion/exclusion

1.2.1 Les critères d'inclusion :

Tout patient atteint de RCC détenant un diagnostic anatomo-pathologique avec classification TNM.

1.2.2 Les critères d'exclusion :

- Patients métastasés suivant une chimio/radiothérapie
- Patients transfusés ont étaient exclu de notre étude.

NB : les témoins ont été choisis par appariement avec les patients mais n'ayant aucun antécédent de cancer dans leurs familles.

1.3 Collecte des échantillons :

Nous avons prélevé du sang veineux (5 à 10mL) au pli du coude ; recueilli sur des tubes EDTA (non pas sur des tubes héparinés « inhibiteur de la Taq polymérase). Ces prélèvements ont été étiquetés et numérotés suivant un code précis.

1.4 Questionnaire :

Nous avons effectué un questionnaire pour tous nos patients pour rassembler les différentes données (Annexe 2).

1.5 Techniques réalisées

1.5.1 Extraction d'ADN à partir du sang total :

L'extraction d'ADN est requise pour des applications de biologie moléculaire telles que la PCR, la digestion par les enzymes de restriction etc. Il existe d'innombrables techniques d'extraction et de kits dans le commerce. Le choix adéquat doit prendre en considération plusieurs facteurs : l'origine de l'échantillon, la méthode de préparation de l'échantillon, usage prévu, simplicité...

Principe :

- Isolement des leucocytes pour faciliter l'extraction de l'ADN.
- Lyse cellulaire des leucocytes accomplie chimiquement par un tampon de lyse, une protéinase K et un détergeant SDS (sodium dodecyl sulfate)
- Extraction d'ADN : le Na Cl permet de précipiter les protéines dégradées et liées à l'ADN, ce dernier sera libéré dans le lysat.
- Précipitation et lavage : l'éthanol pur permettra la formation de la pelote d'ADN.
- Dilution : l'ADN est solubilisé dans de l'eau stérile (Annexe 3).

1.5.2 Génotypage de la MTHFR :

Pour aboutir au génotypage de la MTHFR nous avons réalisé ces différentes étapes :

- La PCR suivi d'un contrôle de PCR sur gel d'agarose.
- Digestion des produits de PCR.
- Migration sur gel d'agarose des fragments obtenus.
- Visualisation après exposition sous UV.

1.5.2.1 La PCR

Une technique de biologie moléculaire reproduisant une répliation d'ADN ciblé in vitro.

➤ préparation du milieu réactionnel (mix) :

Ce milieu contient tout les éléments nécessaires pour le déroulement de la PCR, la quantité est multiplié par le nombre de tubes voulus + un tube témoin négatif (uniquement le mélange sans ADN) + un tube témoin positif (avec un ADN amplifié précédemment) (Tableau 1).

Tableau 1 : Composants du mélange réactionnel de PCR pour le polymorphisme A1289C de la MTHFR

Mix	Vol (µl)/tube de PCR
H ₂ O	4,02
MgCl ₂ à 1,5 final (50mM)	0,3
Amorce sens (100 ng/µl)	1
Amorce anti-sens (100 ng/µl)	1
Tampon 10X	1
Taq DNA 5U/µl	0,08
dNTP 0,2 final	1,6
DNA 20 à 50 ng/µl	1

➤ **Programmation des cycles de PCR :**

Nous avons programmé le thermocycleur pour 40 cycles dont chacun est constitué d'une série de trois étapes : dénaturation de l'ADN double brin, hybridation des amorces et élongation par la polymérase.

Tableau 2 : Programme d'amplification PCR de la MTHFR

Étapes	Température (°C)	Durée
Dénaturation initiale	95	5-6min
Dénaturation	95	30s
Hybridation	65	30s
Elongation	72	1 min

La séquence des amorces MTHFR A1298C utilisée est :

Sens : 5'-CTT TTG GGA GCT GAA GGA CTA CTA C-3'

Antisens : 5'-CAC TTT GTG ACC ATT CCG GTT TG-3'

➤ **Contrôle de la PCR :**

Il nous permet de vérifier le bon déroulement de la technique de PCR et d'observer si une éventuelle contamination de l'ADN a eu lieu (grâce au témoin -).

Ce contrôle est assuré par une électrophorèse sur gel d'agarose à 2% sur une cuve horizontale. Le gel a été préparé en mélangeant 2g de poudre d'agarose avec 100ml du TBE 1X (Tris Borate EDTA) auquel nous avons ajouté 10 µl de BET (Bromure d'éthidium), un agent intercalant se fixant entre les bases nucléiques rendant l'ADN fluorescent par exposition aux UV. Dans chaque puits du gel, la quantité de 10µl du produit de PCR mélangée à 3µl de Bleu de Bromophénol a été déposée. Ce dernier, permet de suivre le front de migration.

NB : Dans le dernier puits, nous avons déposé 5µl de marquer de taille qui nous aidera à estimer la taille des fragments.

Après migration des fragments sur le gel et exposition de ce dernier sous UV on peut visualiser les fragments amplifiés sous forme de bandes fluorescentes.

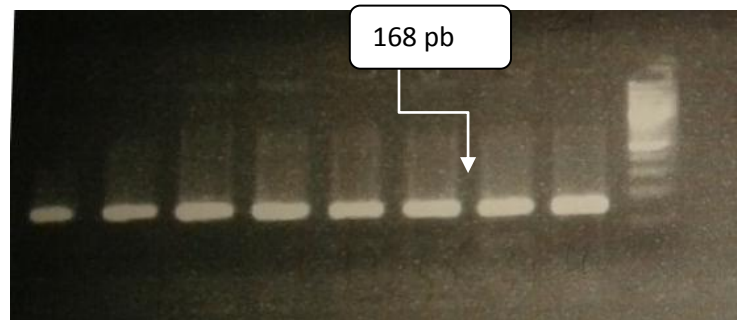


Figure 5 : Profil du contrôle de la PCR.

1.5.2.2 Digestion des produits de la PCR

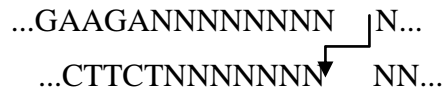
Les produits de la PCR subissent une digestion enzymatique, qui s'opérera à des endroits précis appelés sites de restriction. Toute modification génique à leurs niveaux pourrait entraîner ou empêcher l'action de l'enzyme. Ces modifications de l'ADN sont détectées par des variations du nombre de la longueur des fragments de restriction obtenus après digestion enzymatique.

- **Digestion par MboII**

Pour le polymorphisme A1298C de la MTHFR, nous avons utilisé comme enzyme de restriction le MboII. Cette enzyme est produite par *Moraxella bovis*. Le site de reconnaissance de l'enzyme MboII est:

...GAAGANNNNNNNNN...
...CTTCTNNNNNNNNN...

- 1 µl de l'enzyme MboII est ajouté aux produits de PCR (10µl) où ils seront incubés dans l'étuve une nuit à 37°C. **Séquence des fragments générés après coupure par le MboII (bouts cohésifs) :**



➤ **Électrophorèse**

Dépôt de 10 µl des produits de digestion obtenus + 3 µl de bleu de bromo-phénol sur gel d'agarose à 4%.

Révélation

Le BET fluorescent sous UV se fixe sur l'ADN et permet ainsi de visualiser les fragments de restriction dans le gel qui sera photographié après trans-illumination aux UV.

1.5.2.3 Profils RFLP obtenus

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.

La digestion enzymatique de l'amplification de la MTHFR par le MboII a donné plusieurs fragments (Tableau 3)

Tableau 3 : Taille des différents fragments obtenus selon les différents génotypes

Génotype	Tailles des fragments obtenus (pb)
Homozygote normal AA	56, 31, 30, 28, 18
Homozygote muté CC	84, 31, 30, 18
Hétérozygote AC	84, 56, 31, 30, 28, 18

- Le premier génotype qui correspond à l'homozygote normal AA, apparait sur le profil sous forme de 2 bandes, avec une bande 56 pb, la seconde de 31pb, 30pb (ces deux dernières apparaissant sous forme d'une seule bande), 28pb, 18pb (la taille de ces fragments est trop petite et de ce fait, elle ne peut pas se voir sur le gel).

- Le deuxième génotype trouvé parmi nos échantillon et représenté dans la figure 6 est celui de l'hétérozygote AC qui apparait sur le profil sous forme de 3 bandes, avec une bande de 84pb , une autre de 56pb et celle du 31,30pb, 28pb , 18pb (Figure 6).

- Le génotype homozygote muté CC n'a pas été trouvé parmi les patients et les témoins, mais normalement les 2 bandes qui peuvent se voir sont celles de 84pb et de 31,30pb.

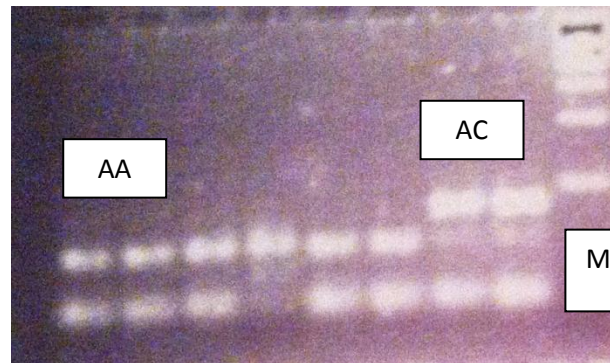


Figure 6 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments issus par clivage du MboII présentant différents génotypes du polymorphisme A1298C de la MTHFR

2. Analyse statistique (résultats obtenus)

Les résultats statistiques de tous les paramètres étudiés chez les patients recrutés ont été traités par Excel et par le logiciel Epi info version 6.0. Différentes méthodes, ainsi que différents tests ont été utilisées afin de déterminer :

1. s'il existe une association significative entre le polymorphisme A1298C de la MTHFR étudié et le cancer du rein : ceci se fait par la comparaison du nombre de fois où l'allèle est observé chez les patients par rapport au nombre de fois où il est présent chez les contrôles (test de χ^2 et calcul de l'odds ratio (OR)).

➤ Calcul de l'odds ratio

Pour calculer l'odds ratio nous avons établi un tableau de contingence croisé 2x2 (Tableau ci-dessous).

Tableau 4 : Tableau de contingence

	Patients	Contrôles	Total
Présence du facteur présumé de risque de maladie	a	b	a+b
Absence du facteur présumé de risque de maladie	c	d	c+d
	a+c	b+d	a+b+c+d

➤ **P value**

Pour tous les calculs, deux groupes de valeurs ont été considérés comme significativement différents si $p < 0,05$.

Nous exposerons ci-dessous les résultats que nous avons obtenus lors de notre partie pratique qui a porté sur 9 patients atteints de cancer du rein et 16 témoins (sujets présumés sains).

1. Répartition selon le sexe

Sur les 9 patients que nous avons, 3 soit 33,33% étaient de sexe féminin, le nombre restant 6 soit 66,66% était de sexe masculin.

Tableau 5: répartition des patients selon le sexe

Sexe	Fréquence
homme	6
femme	3

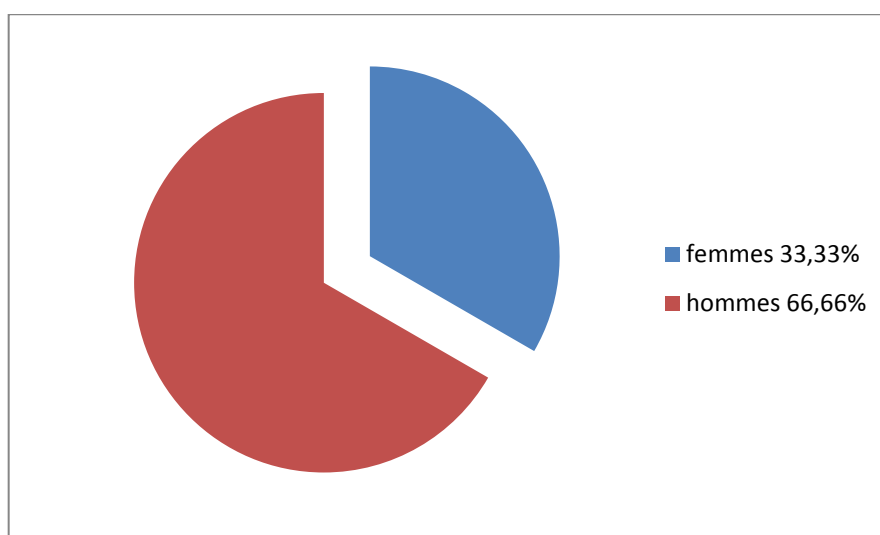


Figure 7 : Répartition des patients selon le sexe

Le sex-ratio dans notre population de patients est de 2/1 (2hommes pour 1 femmes) ceci concorde avec différentes études publiées précédemment où l'incidence est estimée à 12,2 pour 100000 hommes et 5,7 pour 100000 femmes [5]. En Algérie, dans une étude sur 348 cas de cancer du rein (sur une période de 12 ans) 317 (91,09%) étaient des hommes [39].

2. Répartition selon l'âge

L'âge de nos patients varie entre 32 et 66ans, avec une moyenne d'âge de 56,7±11

Tableau 6 : Répartition des patients selon la tranche d'âge

Age	Fréquence
[30-39]	1(11,11%)
[40-49]	0 (0%)
[50-59]	3(33,33%)
[60-69]	5(55,56%)

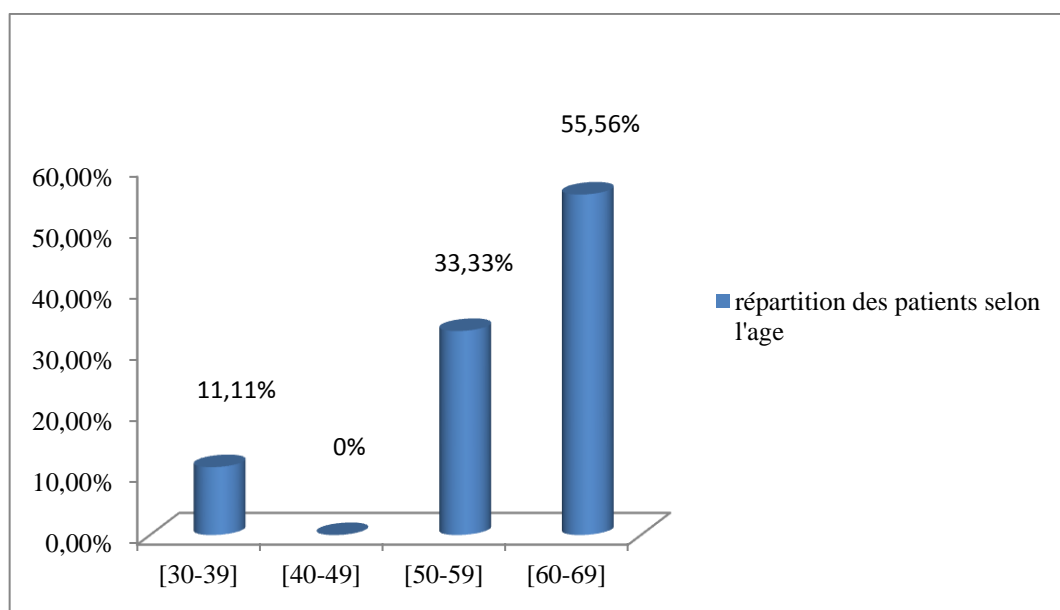


Figure 8 : Répartition des patients selon l'âge.

Nous avons constaté dans notre population de patients où la moyenne d'âge était de $56,7 \pm 11$ une prédominance de survenue du cancer dans la tranche d'âge [60-69 ans]. Dans les autres études le taux d'incidence s'élève à partir de 35 ans pour atteindre son maximum à 70 ans, la moyenne d'âge variée entre 67 ans chez l'homme et 70 ans chez la femme. Cependant il faut noter que le cancer du rein peut se voir à tout âge. [2, 3]

3. Répartition des patients selon le type histologique

Tous les patients étudiés étaient atteints d'un RCC, l'expression histologique la plus fréquente était le ccRCC (4 cas) suivi par le chRCC (3 cas) et en dernière position le cpRCC de type I (2 cas). Cette répartition correspond globalement à la fréquence de chaque type selon les différentes études

où le ccRCC est le plus fréquent (60% à 80) et suivit par le cpRCC d'abord (10 à15%) ensuite par le chRCC (4% à 7%) [5, 7, 10,15].

4. Association entre cancer du rein et autres pathologies :

Sur les 9 patients étudiés, un seul cas était diabétique et présentait une HTA.

Concernant le diabète, son rôle comme facteur de risque reste controversé. Il semblerait que ce soit plutôt l'excès de poids fréquent chez les diabétiques de type 2 qui serait responsable de l'augmentation du risque, mais pas le diabète lui-même [2].

5. Habitudes toxiques

Aucun des 9 cas étudiés ne consommait de l'alcool, cependant 2 d'entre eux sont des fumeurs et un a arrêté de fumer depuis 30 ans.

6. Antécédents familiaux

Deux patients avaient un membre dans leurs familles atteint d'un cancer du rein (le premier une sœur, le deuxième une cousine). Mais, au vu de la taille de notre échantillon aucune conclusion concernant l'impact de l'hérédité ne peut être donnée.

7. Répartition selon le génotype

Après génotypage du polymorphisme A1298C de la MTHFR dans les deux populations de patients (9) et témoins (16), nous avons obtenus les résultats représentés dans le tableau (7).

Tableau 7: Répartition des témoins et patients selon le génotype

	Patients		Témoins		OR	P
	%	n	%	n	1	
1298 AA	77,77	7	62,5	10	-	-
1298 AC	22,2	32	37,5	6	0,48 (0,05-4,07)	0,73 NS
1298 CC	0	0	0	0	/	/
AC+CC	22,23	2	37,5	6	0,48 (0,05-4,07)	0,73 NS
A allele	88,88	16	81,25	26	-	-
C allele	11,15	2	18,75	6	0,48 (0,05-4,07)	0,73 NS

Le génotype normal AA est le génotype le plus fréquent dans notre population de patients ainsi que dans notre population de témoins. Nous n'avons trouvé aucun génotype muté CC que ce soit parmi les témoins ou parmi les patients.

Le calcul de la p-value et de l'odds ratio (OR) (tableau 4) démontrent que le polymorphisme A1298C n'est pas impliqué dans la survenue du cancer du rein. Ce résultat est en accord avec ceux rapportés par Ferrera *et al.* (2009), Moore *et al* (2008) [11].

Toutefois, les résultats publiés par Sakano *et al* (2010) [11], Saferinjad *et al* (2012). [10] attestent de l'implication de ce polymorphisme dans la survenue du cancer rénal. Ces résultats sont affirmés par une étude menée par Lei Zhang *et al* (2011) [40] étudiant l'impact de plusieurs polymorphismes impliqués dans le métabolisme des folates dont le polymorphisme de la MTHFR et qui a conclu qu'il existe une association entre ce dernier et la survenue du cancer rénal.

Il est intéressant de noter qu'une étude menée par Trovato *et al* (2015) [41] étudiant la relation entre les polymorphismes A1298C et C677T et l'insuffisance rénale a abouti à un effet protecteur de ces polymorphismes sur la fonction rénale (la fréquence de génotypes mutés était beaucoup moins importante chez les insuffisants chroniques nécessitant une dialyse).

Le travail que nous présentons dans ce mémoire avait pour objectif l'étude génétique et moléculaire de patients atteints du cancer du rein recrutés au niveau de la clinique rénale de Daksi à Constantine. Nos résultats ont montré que le cancer du rein constitue un groupe hétérogène de tumeurs représenté par trois types histologiques différents :ccRCC, suivit par le chRCC et le cpRCC de type I. A travers ce modeste travail et l'enquête mené auprès des médecins et de chercheurs en génétique travaillant sur ce thème, nous avons pu constater que le degré d'agressivité de ce type de cancer était élevé.

L'analyse moléculaire que nous avons entreprise sur le polymorphisme A1298C de la MTHFR ne montre aucune association entre ce dernier et la cancérogenèse et la progression tumorale rénale. Cependant la taille de notre échantillon de patients ne nous permet pas d'apporter des éléments expliquant ces résultats.

Il serait intéressant de prévoir dans nos perspectives :

- D'élargir la taille de l'échantillon étudié afin de pouvoir tirer des conclusions sur l'association du polymorphisme A1298C et le cancer rénal.
- D'étudier les gènes de prédisposition pour les cas familiaux tels que les gènes : ***PBRM***, ***CDKN2B*** et ***BAP1***.
- De rechercher d'autres associations des autres polymorphismes impliqués dans la survenue du cancer rénal comme ***Caveolin-1*** et ***RhoA/ROCK1*** ainsi que les polymorphismes des gènes de réparation de l'ADN tels que ***XRCCI***, ***XPD***.

La recherche et la compréhension du rôle des principaux gènes de prédisposition dans le développement des cancers rénaux héréditaires mais aussi sporadiques permettraient la prise en charge précoce des patients. Ainsi, la caractérisation des profils d'expression génique spécifiques des tumeurs rénales des différents syndromes pourrait mettre en évidence des cibles thérapeutiques potentielles et permettrait d'identifier des facteurs de réponse aux traitements, ceci serait avantageux dans le cas de résistance au traitement.

Références bibliographiques

- [1] : COULANGE C, RAMBEAU JJ. **Cancer du rein de l'adulte : clinique**. Rapport du 97^e Congrès de l'Association Française d'Urologie. Prog Urol.1997;7:807–12.
- [2] : MEJEAN A. **Epidémiologie des tumeurs du rein**. Prog Urol. 2003; 13 :1193.
- [3] : AGOUZAL K. **Cancer du rein de l'adulte (à propos de 141 cas)** .Thèse en médecine. Maroc (Rabat) : Université Mohamed V.2009.
- [4]: GORIS G , LECLERCQ R ET AL . **Les tumeurs rénales**. First edition. Flying publisher guide. 2012, 108p
- [5]: DEMERS P, DAVIES H ET AL. **Cancer and occupational exposure to pentachlorophenol and tetrachlorophenol** (Canada). Cancer Causes Control. 2006;17: 749.
- [6] : DORMOY,V . **Du développement au cancer: implication des voies néphrogéniques dans la croissance du carcinome à cellules rénales humain**. Thèse en biologie : recherche clinique Innovation technologique Santé publique France : université de Strasbourg, 2010.
- [7] : PERRIN C, EDELINE J ET AL. **Carcinome à cellules rénales : de la pathologie aux voies moléculaires de la carcinogénèse**. Oncologie.2009 ; 11 : 254-259.
- [8] : LEROY K, DE CEMOUX P. **Anomalies moléculaires des cancers: Ciblage thérapeutique**. Jhon Libbey Eurotext. France.2014 ; P166-168.
- [9] : LARAQUI A. **Etude des Facteurs Métaboliques et Polymorphismes Génétiques Prédisposant à la Survenue de l'Athérosclérose Coronaire**. Thèse en biologie :biochimie. Maroc: Université Mohamed V. 2006.
- [10]: M R Safarinejad, N Shafiei ET AL. **Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Gene C677T, A1298C and G1793A Polymorphisms: Association with Risk for Clear Cell Renal Cell Carcinoma and Tumour Behaviour in Men**. Clinical Oncology.2010; 24: 269-281
- [11]: MUZEYYEN I. **A literature review of MTHFR (C677Tand A1298C polymorphisms) and cancer risk**. Turkey Mol Biol Rep.2012; 2101:2.
- [12]: RAME A, THEROND S .**Anatomie et physiologie**. Elsevier Masson, Chabert. 2007 ; p244-252.
- [13] : TORTORA G, DERRICKSON B. **Principes d'anatomies et de physiologie**. 4^{ème}Edition par Boeck .2007 ; p1075.
- [14] : GOUGOUX A. **Physiologie des reins et des liquides corporels**. Multimondes éditions. 2005.
- [15] : MEJEAN, A., CORREAS, JM ET AL. **Tumeurs du rein**. Prog Urol. 2007 ;17 :1101-1144.
- [16]: FLAHERTY, K. T., FUCHS, C.ET AL. **A prospective study of body mass index, hypertension, and smoking and the risk of renal cell carcinoma** (United States). Cancer Causes Control. 2005; 16: 1099.
- [17]: BJORGE, T., TRETLLI, S ET AL . **Relation of height and body mass index to renal cell carcinoma in two million Norwegian men and women**. Am J Epidemiol. 2004; 160: 1168.

Références bibliographiques

- [18] : FRYZEK, J. P., POULSEN, A ET AL. **A cohort study of antihypertensive treatments and risk of renal cell cancer.** Br J Cancer. 2005 ; 92: 1302.
- [19]: NEUZILLET, Y., LAY, F ET AL. **De novo renal cell carcinoma of native kidney in renal transplant recipients.** Cancer. 2005 ; 103: 251.
- [20] : ANDRIEU . JM., COLONA .P ET AL . **Cancers: guide pratique d'évaluation de traitement et de surveillance.** Edité par ESTEM. 1997, p58-63
- [21] : RICHARD S. 2013 : **Prédispositions héréditaires aux cancers du rein.** Société de la néphrologie. 9eme séminaire de formation médicale continue, Paris 28 et 29 mars 2013, p45.
- [22] : VALLONE. A. **Les thérapies ciblées dans la prise en charge du cancer du rein métastatique.** Thèse en pharmacie. France : Université de Lorraine. 2012.
- [23] : MELLAS.N., MELLAS S. **Mise au point sur le traitement médical du cancer du rein métastatique.** J. Afr. Cancer. 2009 ; 1 :154-158.
- [24] : HANTRAYE. B. **Les thérapies ciblées par voie orale dans la prise en charge du cancer du rein métastatique : importance du lien ville / hôpital pour le patient dans la gestion de son traitement et des effets secondaires.** Thèse en science pharmaceutique et ingénierie de la santé. France : Université Angers, 2012.
- [25] : ZHAO, A. **Etude des petits ARNs extracellulaires pour le diagnostic de cancer du rein à cellules claires.** Recherche clinique innovation technologique santé publique : recherche clinique Innovation technologique Santé publique France (Saint-Etienne) : Université Jean Monnet, 2013.
- [26] : JACOBSEN J ., RASMUSON. T ET AL. **Vascular endothelial growth factor as prognostic factor in renal cell carcinoma.** J Urol. 2000 Jan; 163(1):343-7.
- [27] : BOCCI.G. , MAN.S ET AL. **Increased plasma vascular endothelial growth factor (VEGF) as a surrogate marker for optimal therapeutic dosing of VEGF receptor-2 monoclonal antibodies.** Cancer Res. 2004; 64 (18): 6616-25.
- [28] : LI G, FENG G ET AL. **CA9 gene expression in conventional renal cell carcinoma: a potential marker for prediction of early metastasis after nephrectomy.** Clin Exp Metastasis. 2007; 24(3): 149-55.
- [29]: FURUSATO.B, MOHAMED A ET AL. **Cxcr4 and Cancer.** Pathol Int. 2010; 60(7): 497-505.
- [30]: RICHARD CL, BLAY J. **Cxcr4 in Cancer and Its Regulation by Ppargamma.** PPAR Res. 2008: 769413.
- [31]: Wang L, Yang B, ET AL **Strong Expression of Chemokine Receptor Cxcr4 by Renal Cell Carcinoma Cells Correlates with Metastasis.** Clin Exp Metastasis. 2009; 26(8): 1049-54.
- [32]: SHAGUFTA K., SADIA A ET AL. **Unique molecular alteration patterns in von Hippel-Lindau (VHL) gene in a cohort of sporadic renal cell carcinoma patients from Pakistan.** ELSEVIER. Mutation Research. 2014 ; 763–764 45–52.

Références bibliographiques

- [33] : MEJEAN A, LEBRET V. **Angiogenèse : l'exemple du cancer rénal.** Prog Urol. 2008 ; Suppl. 7, S309–S314.
- [34] : CULINE S, PATARD JC. **Le cancer du rein.** Springer-Verlag. France, paris 2008.
- [35] : DREYER C, RAYMOND E ET AL. **La voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR.** Cancéro dig. Vol 1 N°3. 2009 ; 187-189.
- [36] : EDELINE J, VIGNEAU C. **Voies moléculaires dans le cancer du rein : de la biologie aux traitements de demain.** Bull. Cancer. 2010 ; 97:5-15.
- [37] : CHABI W. **Relations gène-environnement des déterminants du métabolisme des mono-carbones et associations avec la pathologie en Afrique de l'Ouest.** Thèse en biologie :biologie cellulaire et nutrition France : Université Nancy. 2009.
- [38] : BENLATRECHE M. **Étude de la relation entre le polymorphisme de la méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR), et la survenue des complications dégénératives chez le diabétique de type 2 (DNID) dans la commune de Constantine.** Thèse en biologie :Génétique des pathologies humaines .Algérie : université constantine1. 2008
- [39] : SALAH, R., HARIR, N ET AL. **Cancers urologiques en Algérie : profil histopathologique à propos de 348 cas .**J Afr Cancer. 2014 ; 12558-0342-9.
- [40]: LEI ZHANG, HIAOXIN MENG. **One-Carbon Metabolism Pathway Gene Variants and Risk of Clear Cell Renal Cell Carcinoma in a Chinese Population.** Journal.Pone. 2011; 0081129.
- [41]: TROVATO F, CATALANO D. **Relationship of MTHFR gene polymorphisms with renal andcardiac disease.** World J Nephrol .2015 February 6; 4(1): 127-137.

Sites internet

[1iw] : www.embryology.ch consulté la dernière fois le 06/2015.

[2iw] :[http://urofrance.org/nc/science-et-recherche/basebibliographique /article/html/lesmedicaments-du-cancer-du-rein.html](http://urofrance.org/nc/science-et-recherche/basebibliographique/article/html/lesmedicaments-du-cancer-du-rein.html). Consulté la dernière fois le 06/2015.

Références bibliographiques

Résumé

Le cancer du rein n'est pas une maladie univoque, c'est une pathologie hétérogène du point de vue histologique. Son incidence est en augmentation croissante ces dernières années. De nombreux facteurs de risques ont été révélés. Nous présentons dans ce mémoire les plus étudiés.

L'objectif de notre étude est la recherche d'éventuelle association du polymorphisme A1298C dans la survenue du cancer rénal en s'appuyant sur la réalisation d'un génotypage de la MTHFR.

Méthodes : 9 patients des deux sexes atteints d'un cancer du rein ont été recrutés. Nous avons réalisé le génotypage de la MTHFR en procédant par une PCR-RFLP.

Résultats : les patients étaient représentés par 3 types histologiques différents : ccRCC, suivit par le chRCC et le cpRCC de type I. L'analyse statistique des résultats du génotypage du polymorphisme A1298C de la MTHFR était non significative.

Conclusion : nous avons pu déceler à travers notre étude le degré d'agressivité du cancer rénal cependant, nous n'avons trouvé aucune preuve d'une association entre le polymorphisme et la cancérogénèse du rein. Cependant, notre échantillon n'était pas représentatif de la population algérienne.

Mots clés : Cancer du rein, polymorphisme, PCR/RFLP, MTHFR A1298C, facteurs de risque.

Abstract

The renal cancer is not an unequivocal illness. From a histological point of view, it is considered as a heterogeneous pathology. Moreover, its impact is in growing increase these last years. For this specific reason, we wanted to highlight through our study the numerous factors of risk involving renal cancer.

The aim of our study is seeking a possible role of the polymorphism A1298C in the apparition of the renal cancer relying on the realization of a génotypage of MTHFR.

Specific research method has been followed throughout our study. In fact, Nine (09) patients of both genders suffering from a renal cancer have been recruited. Then, Génotypage of MTHFR using the PCR-RFLP technique was accomplished. The results obtained have spread our patients into three different histological types: ccRCC, chRCC and the cpRCC of type I. The results obtained from the génotypage of the polymorphism A1298C of MTHFR have been submitted to a statistical analysis and were not significant.

Across our study, we could disclose the degree of aggressiveness of the renal cancer. Even though our sample was not representative of the entire Algerian population, no proof of an association between the polymorphism and the cancérogénèse of the kidney has been found.

Key words:

Renal cancer, polymorphisme, PCR / RFLP, MTHFR A1298C, risk factors.

ملخص

إن سرطان الكلي هو مرض متشعب وغير متجانس من وجهة النظر النسيجي. وحالات الإصابة به في تزايد خلال السنوات الأخيرة.

وقد كشف دراسات عديدة عن عوامل الخطر ونقدم في هذه المذكرة أهمها.

الهدف من هذه الدراسة هو البحث عن الرابطة الممكنة لتعدد المورثة A1298C في الإصابة بسرطان الكلي استناداً إلى تحقيق تنميط لـ MTHFR ,

الأساليب: تم معاينة 9 مرضى مصابين بسرطان الكلي من كلى الجنسين ، واعتمدنا في تنميط MTHFR على تقنية PCR-RFLP .

النتائج: تعددت الأنواع النسيجية ما بين المرضى بين ccRCC يليه chRCC ثم cpRCC TYPE 1 .

التحليل الإحصائي لنتائج التنميط للتعدد الجيني MTHFR A1298C كانت غير معبرة.

الاستنتاج: لقد استنبطنا من خلال دراستنا درجة خطورة سرطان الكلي لكن لم نجد أي دليل عن وجود رابطة بين التعدد الجيني والإصابة بسرطان الكلي، ومع ذلك العينة المدروسة ليست ممثلة لسكان الجزائر

Année Universitaire : 2014 /2015

Présenté par : Bouchemal Amina

Etude moléculaire du cancer du rein

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master 2 en génétique moléculaire

Le cancer du rein n'est pas une maladie univoque, c'est une pathologie hétérogène du point de vue histologique. Son incidence est en augmentation croissante ces dernières années. De nombreux facteurs de risques ont été révélés. Nous présentons dans ce mémoire les plus étudiés.

L'objectif de notre étude est la recherche d'éventuelle association du polymorphisme A1298C dans la survenue du cancer rénal en s'appuyant sur la réalisation d'un génotypage de la MTHFR.

Méthodes : 9 patients des deux sexes atteints d'un cancer du rein ont été recrutés. Nous avons réalisé le génotypage de la MTHFR en procédant par une PCR-RFLP.

Résultats : les patients étaient représentés par 3 types histologiques différents : ccRCC, suivi par le chRCC et le cpRCC de type I. L'analyse statistique des résultats du génotypage du polymorphisme A1298C de la MTHFR était non significative.

Conclusion : nous avons pu déceler à travers notre étude le degré d'agressivité du cancer rénal cependant, nous n'avons trouvé aucune preuve d'une association entre le polymorphisme et la cancérogénèse du rein. Cependant, notre échantillon n'était pas représentatif de la population algérienne.

Mots clés : Cancer du rein, polymorphisme, PCR/RFLP, MTHFR A1298C, facteurs de risque.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de biologie et génétique moléculaire

Jury d'évaluation :

Président du jury : Pr. Satta D

Rapporteur : Dr. Rezgoune-Chellat.D

Examineurs : Mme Ziada.H