

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
Département de Biologie Animale

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة
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*

N° d'ordre :
N° de série :

Intitulé :

Le polymorphisme C677T du gène MTHFR et risque du cancer du sein

Présenté et soutenu par : OUABED Radja
KEROUAZ Sabrina

Le 02/07/2018

Jury d'évaluation :

Présidente : REZGOUNE-CHELLAT Djalila (MCA - Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

Encadreur : HANACHI SABAH (MCA-Faculté de médecine université Salah Boubnider Constantine 3).

Co- encadreur : ZIADA Hadia (MCB - Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur : ZEKRI Salima (MCA-Faculté de médecine université Salah Boubnider Constantine 3).

Année universitaire
2017 - 2018

Au tous puissant ALLAH

*Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer tous nos remerciements à **DIEU** tout puissant, De nous avoir tenu en bonne santé pour la réalisation de ce travail. Que gloire et louanges vous soient consacrées pour l'éternité.*

Remerciements

*En premier lieu, Nos profonds remerciements vont au Madame **HANACHI Sabah**, qui a accepté d'encadrer nos travaux, pour tout le temps qu'elle nous a consacré malgré ces occupations, pour ses directives précieuses, pour avoir été patiente et compréhensive tout au long de notre période d'encadrement.*

*Nos vifs remerciements vont également à notre co-encadreur Madame **ZIADA Hadia**, on vous remercie pour votre précieuse aide lors de la réalisation de la partie théorique et merci infiniment pour votre gentillesse et vos encouragements.*

*Nous tenons à remercier Madame **REZGOUNE-CHELLAT. D**, Maître de conférences A à l'Université des frères Mentouri Constantine, pour avoir accepté de juger ce travail et nous honorer par sa présidence du jury.*

*A Madame **SATTA Dalila** Professeur au département des sciences de la nature et de la vie et responsable de la filière de Génétique pour sa générosité, son aide, son orientation, sa disponibilité et ses conseils.*

*Nous remercions également à Madame Dr **ZEKRI Salima**, pour avoir accepté d'examiner notre travail et avoir fait l'honneur de siéger au jury de notre soutenance.*

*Un merci bien particulier est adressé également à Monsieur le professeur **ABADI N**, chef de service du laboratoire de biochimie et de biologie moléculaire du CHU pour nous avoir accueillie dans son laboratoire.*

*Un grand merci aussi adressé à Monsieur le professeur **BITAM** pour nous avoir accueillie dans sa clinique **EL NAKHIL** et son aide précieuse.*

*Nous remercions aussi le personnel du laboratoire de biologie et génétique moléculaire du CHU, et en particulier **BendJAMAA Maya** pour s'être impliqués dans ce travail et **MADAME YASMINA** pour sa précieuse collaboration et sa patience.*

*Nous remercions chaleureusement Madame **MADOUI. S** pour toute l'aide qu'elle nous a apportée*

*Nous adressons nos sincères remerciements à tous nos professeurs particulièrement Monsieur **REZGOUNE. M**, et toutes les personnes qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé nos réflexions jusqu'à l'obtention du diplôme de master.*

DEDICACE

Du profond de mon cœur, je dédie ce modeste travail à tous ceux qui me sont chers,

A MA CHERE MERE

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.

Je veux remercier pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

Que ce travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices. Puisse dieux, le très haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie.

A MON CHER PERE

À l'homme que j'aime, mon exemple éternel, l'épaule solide, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est sacrifié toute sa vie pour me voir réussir. Sans toi ce jour n'aurait pas existé !

Merci tout simplement d'être mon père, que dieux vous préserve et vous procure santé et longue vie.

A MES FRERE

En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde

A MA CHERE BELLE SŒUR ET MA PETITE NIECE

« RYM »

Je vous exprime à travers ce mémoire mes sentiments d'amour que j'ai pour vous. Puisse Dieu vous garder, éclairer votre route.

A MES AMIES DE TOUJOURS : MAROUA, SELMA, KHOKOUD et MALAK

En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous

avons passés ensemble. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère.

A mon binôme Pour la sœur agréable qu'elle était et qu'elle restera pour moi.

Radja



Dédicace

D'un sentiment plein d'amour, de sincérité et de fidélité, je dédie ce modeste travail particulièrement à mes chère parents, qui ont consacré leur existence à bâtir la mienne, pour leur soutien, patience et soucis de tendresse et d'affection pour tout ce qui ils ont fait pour que je puisse arriver à ce stade. Que Dieu, le tout puissant, vous préserve, vous accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et vous protège de tout mal.

A **ma mère** qui m'a encouragé durant toutes mes études, et qui sans elle, ma réussite n'aura pas eu lieu. Qu'elle trouve ici mon amour et mon affection.

A **mon père**, qui est toujours disponible pour nous, et prêt à nous aider, je lui confirme mon attachement et mon profond respect.

A mon adorables **sœur** : Dalel et **mes chers frères** Hamid, Yousef, Boubakeur et hamza, qui m'ont toujours soutenus et encouragée durant ces années d'études. Merci d'être toujours à mes côtés, par votre présence, par votre amour dévoué et votre tendresse, pour donner du goût et du sens à ma vie. En témoignage de mon amour et de ma grande affection, je vous prie de trouver dans ce travail l'expression de mon estime et mon sincère attachement. Je prie Dieu, le tout puissant, pour qu'il vous donne bonheur et prospérité.

A mon **beau frère** : Fares et **mes belles sœurs** : Nouzha et Selma pour ses soutiens moral et leurs conseils précieux.

A mon **cher neveu** : Sadjed et **mes adorables nièces** : Sara, Inès et Bouchra qui savent toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille.

A tous les membres des familles : **Karouaz** et **Guennoun**, mes oncles ainsi que mes cousins et mes cousines. Puisse ce travail témoigner de ma profonde affection et de ma sincère estime.

A **mes chères amie** : Mouna, Khaoula, Maroua, Nour, Sabrina et Bouchra
Votre amitié est un honneur et une fierté pour moi. Je ne pourrais jamais exprimer le respect et l'amour que j'ai pour vous. Vos encouragements et votre soutien m'ont toujours été d'un grand secours. Puisse Dieu, le tout puissant vous combler de santé, de bonheur et de succès.

A ma chère binôme : Radja

Votre précieuse collaboration et votre soutien amical m'ont été source d'inspiration et d'encouragement. Puisse Dieu te donne le bonheur et la prospérité.

A la formidable promotion 2018 du Master 2 Génétique moléculaire

sabrina

Remerciement et dédicaces

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	1
---------------------------	---

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : cancer du sein

I. Sein

1. Anatomie	3
2. Physiologie	3
3. histologie	4

II. Cancer du sein

1. Epidémiologie	4
2. Types de tumeurs du sein.....	6
3. Aspect clinique.....	8
4. Cancérogénèse mammaire.....	9
4.1 Histoire naturelle du cancer du sein	9
4.2 Anomalie génomique, moléculaire et épigénétique	9
4.3 Forme sporadique, Héritaire et agrégation familiale.....	13
5. Traitement	16
6. Dépistage	16
7. Conseil génétique	17

CHAPITRE II. La MTHFR

I. MTHFR

1. La protéine MTHFR	18
2. Localisation et structure du gène de la MTHFR	21
3. Transcription du MTHF.....	22
4. Signalisation.....	22
5. Polymorphisme du gène MTHFR.....	22
6. Autre polymorphismes du gène MTHFR	26

CHAPITRE III. La MTHFR et cancer du sein

1. Le polymorphisme C677T et malformation congénitales	27
--	----

2. Le polymorphisme C677T et cancers.....	28
3. Le polymorphisme C677T et cancer du sein	29

PARTIE PRATIQUE

I. Patients et méthodes

1. Type d'étude	30
1.1 L'échantillonnage.....	30
1.2 Méthodologie	31
1.3 Etude moléculaire	32
2. Analyse statistique	38

II. Résultats et discussion

1. Répartition de la population d'étude	39
2. Etude transversale des patientes.....	43
3. Etude analytique cas-témoins des profils génotypiques et alléliques du polymorphisme C677T du gène MTHFR	49

Conclusion et perspectives	54
---	----

Références bibliographiques	55
--	----

Annexes

Résumé

LISTE DES ABREVIATIONS

5,10- MTHF : 5, 10-MéthylèneTétraHydroFolate

5-MTHF : 5- MéthylèneTétraHydroFolate

ADN: Acide désoxyribonucléique

APC : Anaphase-promotingcomplex

Arg : Arginine

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ATM : Ataxia telangiectasia mutated

BBP : Bleu de bromophénol

BET : Bromure d'ethidium

BRCA : Breast Cancer

BSA :Bovin Serum Albumine

C-myc :Cellular myelocytomatosis oncogene

CCI : Carcinome Canalaire Infiltrant

CCIS : Carcinome Canalaire In Situ

CDH1 : E-cadhérine

CDH13 : T-cadhérine

CHECK2 : Checkpoint Kinase 2

CHOTHF : 10-formyl tétrahydrofolate

CHUC : Centre Hospitalier Universitaire Ben Badis de Constantine

CLI : Carcinome Lobulaire Infiltrant

CLIS : Carcinome lobulaire In Situ

DHF :Dihydrofolate

dNTP :désoxy-Nucléotides-tri-phosphates

DSS1 : Deletion of SUV3 suppressor 1

EDTA :Ethylène Diamine TetracticAcid

EGFR:Epidermalgrowth factor receptor

FAD :Flavin Adenine Dinucleotide

G1 : phase G1 du cycle cellulaire

Glu : Glutamine

GSTP1 : Glutathione S-transférase A1

Hcy : Homocysteine

HDAC : Histones désacétylases

HER2:HumanEpidermalGrowth Factor Receptor 2

HOXA5 :Homeobox A5

IBI1 :amplified in breast cancer 1

IRM : Imagerie par résonance magnétique

Lys : lysine

Met : Méthionine

mi-ARN : micro-ARN

MRE11 : Meiotic Recombinaison 11 homolog 1

MS : Méthionine synthase

MTHFR : Méthylène TétraHydrofolate Réductase

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OR : Odds Ratio

P16 : Protein 16

p53 :Protein 53

PALB2 : Partner and localizer of BRCA2

PCR :Polymerase Chain Reaction

PDCD4 : Programmed cell death 4

PTEN : Phosphatase and TEN sin homolog

RAD51 : RAD51 recombinase

RASSF1A : Ras association Family 1A

Rb : Rétinoblastome

RPA : Replication protein A

SAM :S-Adénosyl-Méthionine

SBR : Scarff Bloom Richardson

SDS : Sodium Dodécyle Sulfate

TBE : Tris Borate EDTA

TE : Tris EDTA

THF : Tetrahydrofolate

TMA : Tissu-micro-array

TMS1 : Target of methylation-induced silencing

TNM : Tumor Node Metastasis

TPM1 : Tropomyosine 1

TS : Thymidylate Synthase

UV : Ultra-violet

Val : Valine

WNT : Wingless-type MMTV Integration Site Family

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : structure de la glande mammaire.....	3
Figure 2 : estimated Breast Cancer Mortality World wide in 2012.....	5
Figure 3 : HDAC et signalisation estrogénique	12
Figure 4 : la structure de BRCA2	15
Figure 5 : différentes formes de cancer du sein en lien avec les antécédents familiaux.....	16
Figure 6 : structure d'une unité monomérique de la protéine tétramérique <i>MTHFR</i>	19
Figure 7 : répercussion métabolique de l'activité de la <i>MTHFR</i>	19
Figure 8 : réaction catalysées par le <i>MTHFR</i>	20
Figure 9 : fonction de la protéine <i>MTHFR</i>	21
Figure 10 : localisation du gène MTHFR sur le chromosome 1.....	21
Figure 11 : les différents transcrits du gène.....	22
Figure 12 : Gène, protéine et polymorphismes du gène <i>MTHFR</i>	23
Figure 13 : fréquence des homozygotes 677TT pour différentes régions géographiques.....	24
Figure 14 : trois génotypes de la MTHFR affectant la méthylation et la synthèse de l'ADN a différentes mesures	25
Figure 15 : profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments issus par clivage de <i>hinf1</i> Présentant différents génotypes de la <i>MTHFR</i>	37
Figure 16 : répartition de la population d'étude selon la tranche d'âge.....	39
Figure 17 : répartition des cas-témoins selon l'activité professionnelle	41
Figure 18 : répartition de la population d'étude selon le statut matrimonial	42
Figure 19 : Répartition des cas-témoins selon les antécédents familiaux de cancer	43
Figure 20 : répartition des patientes selon la localisation de la tumeur.....	44
Figure 21 : répartition des patientes selon l'âge de la ménarche	46
Figure 22 : répartition selon l'âge de la première grossesse	47
Figure 23 : répartition des patientes selon le type histologique.....	47
Figure 24 : répartition des cas selon le grade histologique	48
Figure 25 : répartition des malades selon le type de traitement.....	49
Figure 26 : fréquence génotypique de C677T du <i>MTFHR</i> chez les malades et les témoins.....	50
Figure 27 : répartition des fréquences alléliques du polymorphisme C677T du <i>MTHFR</i>	51

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : les différents types de tumeurs du sein.....	7
Tableau 2 : Certains mi-RNA surexprimé dans le cancer du sein.....	12
Tableau 3 : principaux gènes de prédisposition au cancer du sein.....	14
Tableau 4 : Tableau de contingence	38
Tableau 5 : la répartition selon les tranches d'âge	39
Tableau 6 : Répartition de la population d'étude selon l'activité professionnelle	41
Tableau 7 : Répartition de la population d'étude selon le statut matrimonial	41
Tableau 8 : répartition des patientes selon la présence d'antécédents familiaux	42
Tableau 9 : répartition des patientes selon la localisation de la tumeur	44
Tableau 10 : répartition des cas selon l'autopalpation	45
Tableau 11 : répartition des patientes selon l'âge de la ménarche	45
Tableau 12 : répartition des fréquences génotypiques du polymorphisme C677T du <i>MTHFR</i>	49
Tableau 13 : les fréquences génotypiques dans différent pays et groupe ethniques	51
Tableau 14 : répartition des fréquences alléliques du polymorphisme C677T du <i>MTHFR</i>	51
Tableau 15 : les fréquences alléliques des différents pays et groupes ethniques.....	52
Tableau 16 : Odds ratios du polymorphisme C677T du la <i>MTHFR</i>	52

**ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE**

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Introduction

Le cancer du sein est la principale cause de décès chez les femmes à travers le monde et il est devenu le cancer le plus fréquent chez les femmes avec une augmentation constante de la fréquence.

Le développement du cancer du sein est un processus en plusieurs étapes, résultant d'altérations génétiques causées par des métabolites endogènes, et conduisant à la transformation des cellules épithéliales mammaires. Il provient de la croissance et la division anarchiques des cellules dans n'importe quelle partie du sein [1].

Les causes exactes du cancer du sein sont inconnues, mais un certain nombre de facteurs de risque peuvent contribuer au développement de la maladie, comme le régime alimentaire, l'âge de la ménarche et de la ménopause et l'exposition à des niveaux élevés d'œstrogènes.

L'oncogenèse mammaire est un processus complexe liée à divers altérations génétiques et épigénétiques, dont la synthèse, la méthylation et la réparation de l'ADN sont les plus incriminés.

Plusieurs études épidémiologiques ont montré que la carence en folate peut causer des dommages à l'ADN conduisant à l'instabilité génétique et à l'augmentation du risque de plusieurs cancers incluant le cancer du sein

Dans la voie métabolique du folate, la méthylène-tétrahydrofolate réductase (*MTHFR*) est l'enzyme clé qui catalyse la réduction irréversible du 5,10-méthylène-tétrahydrofolate en 5-méthyl-tétrahydrofolate, un substrat essentiel de la reméthylation de l'homocystéine en méthionine et ensuite Méthylation de l'ADN [3].

Le variant de la *MTHFR* (Ala222Val, rs1801133) dans l'exon 4 connu couramment par le polymorphisme C677T est associé à une augmentation de la thermolabilité et une réduction de l'activité de *MTHFR* [1-3]. Ce qui aboutit à des aberrations dans la synthèse, la réparation et la méthylation de l'ADN qui sont impliquées dans cancérogenèse [4].

Ce polymorphisme C677T a été étudié de manière approfondie par rapport à son association avec la survenue de cancer du sein. Des recherches récentes à travers le monde suggèrent que l'association avec ce polymorphisme est largement controversée [4].

De notre part nous avons réalisé ce travail afin d'étudier la liaison de ce polymorphisme avec le cancer du sein dans une population de l'est algérien.

Les objectifs de notre travail sont :

1. Evaluer l'influence des différents facteurs de risque sur le cancer du sein

INTRODUCTION

2. Déterminer la prévalence du polymorphisme C667T de la MTHFR chez des patientes présentant un cancer du sein et la comparer à celle d'une population témoin.
3. Rechercher une association possible entre le variant C667T du gène MTHFR et le risque de cancer du sein chez ces patientes.

CHAPITRE 1 :

LE CANCER DU SEIN

I. Le sein

Le sein est un cône de base thoracique, où le sommet est constitué par le mamelon.

1. Anatomie

Le sein possède une structure relativement simple, c'est un organe visible et palpable. Il est plaqué contre le thorax entre la peau au-dessus et le muscle grand pectoral au-dessous [5].

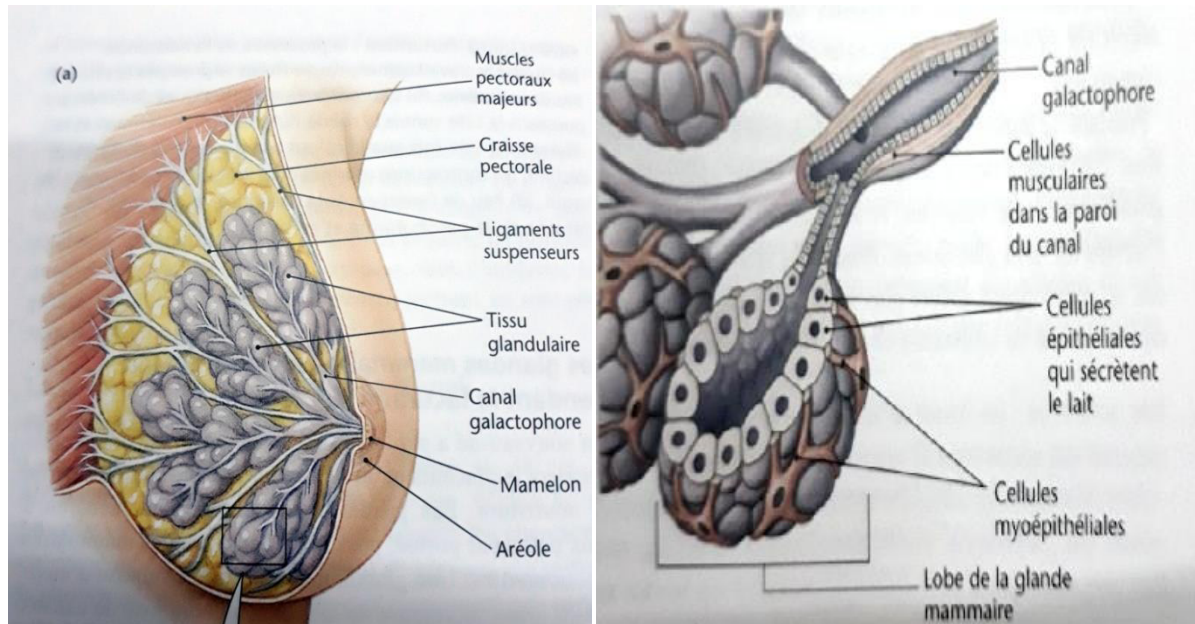


Figure 1: Structure de la glande mammaire [6].

Chaque sein contient une glande mammaire qui se situe sur la paroi antérieure du thorax qui s'étend de la troisième et la septième côte et un tissu de soutien qui contient des vaisseaux, des fibres et de la graisse. La glande mammaire est une glande exocrine tubulo-alvéolaire constituée de 15 à 25 lobes subdivisés en lobules, débouchant chacun sur un canal galactophore. L'ensemble des canaux galactophores acheminant le lait vers le mamelon, qui est lui-même entouré d'une zone pigmentée appelée aréole. La peau de ce dernier est légèrement déformée par les orifices des glandes sébacées (glandes de Morgani), des glandes sudoripares et des follicules pileux.

Le sein est doté d'un réseau de vaisseaux sanguins et lymphatiques et repose sur le muscle pectoral [6] (Figure1).

2. Physiologie

Le rôle biologique du sein est d'assurer la fonction lactée. La glande mammaire atteint son développement complet ainsi que l'élargissement des mamelons au cours de la grossesse sous l'influence de : l'œstrogène, la progestérone et les hormones hypophysaires [7].

Juste après l'accouchement les seins produisent un liquide, le colostrum. Celui-ci fait place au lait maternel, au bout de 3 jours, sous l'influence de la prolactine.

En plus de sa fonction alimentaire, le sein féminin à un rôle esthétique et sexuel [8].

3. Histologie

Le sein est formé d'une accumulation de cellules épithéliales ectodermiques le long de la crête mamelonnaire. La glande mammaire est constituée d'une vingtaine de canaux glandulaires ou galactophoriques qui représentent les voies excrétrices qui se dispersent dans tout le tissu mammaire et convergent vers le mamelon [7].

Les canaux se disséminent en canaux lobulaires, jusqu'à l'unité terminale. Cette unité est établie d'un canalicule extra-lobulaire, qui se perpétue par un canalicule intra-lobulaire, dans lequel se projette plusieurs canalicules terminaux ou acini [9] (Figure1).

La paroi des acini et des canaux est composée d'une double couche cellulaire : une couche interne de cellules épithéliales cylindrique ou cylindro-cubique, et une couche externe discontinue de cellules myoépithéliales à activité contractile. Tous sont entourés d'une membrane basale. Les acini sont entourés d'un tissu conjonctif (tissu de soutien) et d'un réseau capillaire de collagène [6].

II. Cancer du sein

Le cancer du sein est le cancer féminin le plus fréquent dans le monde et la deuxième cause de décès par cancer, caractérisé par une prolifération anormale de certaines cellules et qui nait au niveau de l'épithélium des glandes mammaires. Il n'est contrôlé par aucun mécanisme endogène de régulation.

1. Épidémiologie

• Dans le monde

En 2012, le cancer du sein était diagnostiqué dans 1.7 millions de cas dans le monde, c'était le cancer le plus fréquemment constaté dans 140 des 180 pays couverts par globocan (OMS). Il représente la principale cause de décès par cancer chez les femmes (52200 décès) et 6.3 million de femmes vivent avec le cancer du sein [10].

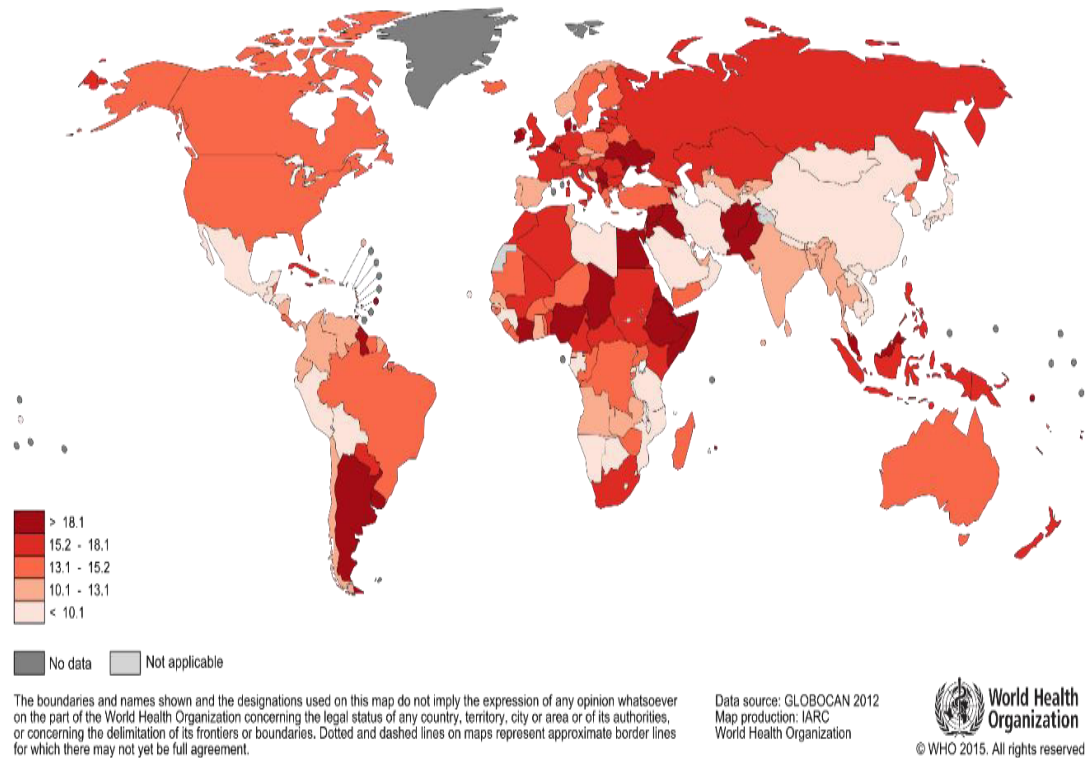


Figure 2 : Estimated Breast Cancer Mortality Worldwide in 2012 [11].

- **En Algérie**

Le cancer du sein en Algérie est en forte progression. Il prend des proportions épidémiques inquiétantes, selon lesquels environ 3500 femmes décèdent par an et 11000 nouveaux cas diagnostiqués entre 1986-2010 [12]. Il représente le 1^{er} cancer de la femme algérienne avec 7500 cas enregistrés chaque année [12].

- **Les facteurs de risque**

La plus part des cas de cancer du sein (environ 70%) surviennent d'une façon sporadique, mais des facteurs de risque prouvés par des études épidémiologiques ont été définis :

- **Le sexe :** le sexe constitue le principal facteur de risque de cancer du sein. Il concerne 99% de femme contre 1% d'homme. Les traitements sont les mêmes pour les deux sexes [13].
- **L'âge :** La relation entre l'âge et le risque est proportionnelle : plus l'âge augmente et plus le risque augmente. Environ 3/4 des cas sont décelés chez les femmes âgées de plus de 50ans [13].
- **La vie reproductive de la femme :** la nulliparité, l'âge tardif du 1^{er} enfant, une puberté précoce (avant 11ans) et une ménopause tardive (après 55ans) sont parmi les facteurs qui provoquent l'augmentation du risque de la survenue de cette maladie. En outre, le cancer du sein est dû à la surexpression de certaines hormones endogènes,

l'œstrogène, régulateur stimulant la prolifération cancéreuse [13-14] et le risque augmente avec l'exposition totale et cumulative du tissu mammaire à ces hormones [13].

- **Les antécédents familiaux ou personnels de cancer :** des antécédents personnels de cancer du sein prédisposent à un cancer dans le sein opposé. Il en est de même pour une histoire personnelle ou familiale du cancer de l'utérus ou de l'ovaire [13]. Le risque d'être atteint est de 5% à 10% dans le cas d'un facteur héréditaire [13].
- **L'obésité :** la prise de poids à l'âge adulte augmente le risque de cancer du sein [13].
- **Consommation d'alcool :** la consommation d'alcool peut accroître le risque de cancer du sein. Une étude révèle que les femmes qui boivent de l'alcool ont 20% plus de risque en cancer du sein que celles qui n'en boivent pas [13].
- **Le tabagisme :** en ce qui concerne le tabac, les données sont fortement controversées dans certaines références. Il serait un facteur de risque, ce risque augmentait pour les femmes exposées entre le début de la puberté et la 1^{ère} grossesse, période de forte sensibilité aux carcinogènes, alors qu'il a un effet protecteur pour d'autre, dû à l'effet anti-oestrogéniques du dioxane qu'il contient [13].
- **L'exposition aux radiations ionisantes :** l'exposition à ces radiations avant l'âge de 40 ans est capable de provoquer un cancer du sein issu de l'endommagement de l'ADN et ces constituants [13].

2. Types de tumeurs du sein

➤ Tumeurs bénignes et malignes

Les tumeurs bénignes du sein sont des affections bien limitées, encapsulées et non inflammatoires de la glande mammaire. Elles ont une croissance lente et locale et ne récidivent pas après ablation [15]. Tandis que Les tumeurs malignes du sein représentent un groupe très hétérogène de prolifération cellulaire.

CHAPITRE 1 : LE CANCER DU SEIN

Tableau 1 : les différents types de tumeurs du sein

Les tumeurs malignes	
Tumeurs épithéliales non infiltrantes	Carcinome canalaire in situ (CCIS) : également nommé intracanaire ou bien carcinome intraductale [16].
	Carcinome lobulaire in situ (CLIS) [16].
Tumeurs épithéliales infiltrantes (98% du cancer du sein)	Carcinome canalaire infiltrant (CCI) : il s'agit de la forme la plus fréquente de cancer du sein, représentant environ 80% des carcinomes mammaires infiltrants [16].
	Carcinome lobulaire infiltrant (CLI) : ils représentent 5 à 15% des carcinomes infiltrants [16].
Les tumeurs bénignes	
Les adénofibromes ou fibroadénomes.	Il s'agit d'une lésion nodulaire d'origine mixte épithéliale glandulaire (adéno) et conjonctive (fibrome)
Les kystes	Se présentent sous formes isolée de taille variable ou multiple, uni ou bilatéraux, remplis de liquide sécrété par les cellules d'un ou plusieurs canaux galactophores
Tumeur phyllode	la tumeur phyllode représente 0.3 à 4% de cancer du sein
Adénome	Ce sont des tumeurs à support conjonctif et discret et dont la prolifération est uniquement épithéliale
Lipome	C'est une masse molle et mobile ne nécessitant aucun traitement.
Papillome intra-canaire	C'est une tumeur qui se développe à partir du canal galactophore et qui croît dans la lumière de ce dernier.

3. Aspect clinique

3.1 Diagnostic

Un cancer du sein est découvert soit par la patiente elle-même par autopalpation du sein, soit à l'occasion d'un examen systématique par un médecin spécialiste: Gynécologue, Sénologue, cancérologue ou encore un radiologue. Le bilan diagnostique confirme que l'anomalie suspectée dans les différentes situations est bien un cancer. Il précise le type de cancer, évalue sa taille et détermine s'il s'est développé dans d'autres parties du corps [17].

3.2 Classifications des tumeurs mammaires

➤ **Classification TNM**

Elle s'applique qu'aux carcinomes. C'est une classification classique basée sur la taille tumorale clinique (**T**), envahissement (**N**) et la propagation métastatique (**M**), elle demeure une classification incontournable pour l'évaluation clinique. La 7^{ème} éditions de la classification TNM correspond à la version la plus récente actuellement utilisée (Annexe 1) [18-19].

➤ **Classification clinique**

Elle est rendue possible grâce au développement des techniques d'analyse génomique à large échelle comme les études sur puce d'ADN (micro-arrays) et confirmées par des études sur le profil protéique par immunohistochimie sur tissu micro-arrays (TMA). C'est à l'équipe de **Sorlie** et **Pérou**, en 2000, que revient le mérite d'avoir identifié 5 sous-types de carcinomes mammaires qui ont par la suite été corrélés à des valeurs pronostiques comme une estimation du risque de rechute ou du bénéfice d'un traitement spécifique (annexe2) [20-21].

➤ **Classification histologique : « SBR »**

Cette classification permet de déterminer indirectement un indice d'activité proliférative grâce à un grade histopronostique appelé SBR ou grade de Scarff-Bloom et Richardson. Ce grade permet, en donnant un score entre 1 et 3 à trois éléments histologiques d'un cancer infiltrant, d'en déterminer le grade qui est établi entre I et III.

- ✓ Le grade I correspond à des cancers bien différenciés
- ✓ Le grade II correspond à des cancers moyennement différenciés
- ✓ Le grade III correspond à des cancers indifférenciés

Les trois grades sont obtenus par l'addition de trois critères : l'architecture du tissu, atypique cytonucléaires, l'index mitotique [21].

4. Cancérogénèse mammaire

La cancérogénèse mammaire est un processus multifactoriel où la succession d'altérations faisant intervenir des mécanismes génétiques, épigénétiques. Ceux-ci conduisent à la transformation progressive de cellules normales en cellules cancéreuses. Ces altérations génétiques peuvent aboutir à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (perte de fonction) et/ou à l'activation d'oncogènes (gain de fonction).

4.1 Histoire naturelle du cancer du sein :

Dans la genèse du cancer du sein, la première étape de la carcinogénèse est l'initiation tumorale, puis les étapes de progression et d'invasion.

- **Initiation tumorale** : phénomène irréversible, correspond à une mutation au niveau de l'ADN non réparé. La première cause du cancer du sein qui conduit à l'initiation tumorale est toujours inconnue [22].
- **La promotion tumorale**: phase relativement longue (pouvant durer plusieurs années chez l'homme) durant laquelle, le clone de cellules initiées acquiert, par des mutations génétiques successives, les caractères des cellules cancéreuses [23].
- **Progression tumorale** : durant cette phase les cellules cancéreuses évoluent en une tumeur maligne. Selon le type de cancer, les cellules cancéreuses vont migrer grâce au sang ou bien la lymphe vers d'autres organes pour y créer de nouvelles tumeurs (métastases) [22].

4.2 Anomalie génomique, moléculaire et épigénétiques :

Dans le développement tumoral mammaire, les anomalies moléculaires les plus fréquentes sont représentées par des amplifications. Les amplifications principales concernent certains gènes :

- **C-erbB2 (HER2)** (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2):
Localisé en 17q21- 22. La protéine HER2 est un récepteur tyrosine kinase de la famille de l'EGFR (Epidermal growth factor receptor). Il est impliqué dans de nombreux processus comme : la prolifération, l'angiogenèse, les métastases, la résistance à l'apoptose. L'amplification du gène HER2 est parfaitement corrélée à la surexpression de sa protéine et est retrouvée dans environ 25% des cancers du sein [24].
- **C-myc** (Cellular myelocytomatosis oncogene): localisé sur le chromosome 8q24 et code une phosphoprotéine nucléaire (Myc) susceptible d'augmenter la transcription et qui intervient aussi dans la régulation de l'apoptose. Il est amplifié dans environ 15 à

CHAPITRE 1 : LE CANCER DU SEIN

25 % des cancers du sein et plusieurs études montrent une corrélation avec des tumeurs de haut grade et un mauvais pronostic [25].

- **Ccdn1 (cycline D1)** : localisé sur le chromosome 11q13, code pour la cycline D1 qui régule la transition G1/S du cycle cellulaire.

La surexpression de cette cycline est retrouvée dans environ 50% des carcinomes mammaires, alors que l'amplification de son gène ne se retrouve que dans 15% des tumeurs [26].

Des inactivations de gènes suppresseurs de tumeurs tels que **p53, Rb, P16, PTEN, BRCA1 et 2** sont également fréquentes :

P53	gène suppresseur de tumeur. Intervient dans la régulation négative du cycle cellulaire et induit le phénomène d'apoptose. Environ 20 à 40% des cancers du sein présentent une mutation du gène p53 [27].
Rb	gène suppresseur de tumeur localisé sur le chromosome 13q14 code pour une protéine qui contrôle la régulation négative du cycle cellulaire. Des délétions du gène Rb ont été découvertes dans presque 10 à 15% des cancers invasifs du sein [28].
Les BRCA	impliquées dans la réparation de l'ADN, l'activation transcriptionnelle d'autres suppresseurs et le contrôle du cycle cellulaire grâce à leur interaction avec d'autres enzymes de réparation [29].
PTEN	il est localisé sur le chromosome 10, intervient dans la régulation de la croissance cellulaire. La mutation du gène PTEN conduit à l'apparition d'un syndrome rare « COWDEN » qui peut être responsable d'une augmentation du risque de développer un cancer du sein [29].
p21RAS	moins de 5% des tumeurs mammaires présentent une mutation de p21ras alors que celle-ci est plus fréquente dans les autres tumeurs solides. En revanche, la surexpression de p21ras sauvage est souvent retrouvée dans les cancers du sein [30].

Depuis quelque année, les modifications épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN, l'activité des micro-ARN et l'acétylation des histones provoquent l'inactivation génique ce qui peut favoriser le développement des cancers du sein de sous-types moléculaires variées [31-32].

- **Hyperméthylation et cancer du sein**

Il est reconnu que l'hyperméthylation du promoteur d'un gène sur des îlots CpG et l'augmentation de l'activité méthyltransférase, réprime la transcription de ce gène. Ceci est également observé dans les cancers pour des gènes suppresseurs de tumeurs. Dans le cas du cancer du sein, l'hyperméthylation du promoteur concerne des gènes qui inhibent le cycle cellulaire (p16, RASSF1A « Ras Association Family 1A), des gènes de réparation d'ADN (BRCA1), des gènes pro-apoptotiques (TMS1 « target of methylation-induced silencing », HOXA5 « Homeobox A5 »), des enzymes métaboliques (GSTP1 « Glutathione S-transferase A1 ») et gènes impliqués dans l'adhérence cellulaire et la formation de métastase (CDH1 « E-cadhérine », CDH13 « T-cadhérine ») ainsi que les facteurs de transcriptions. A cet égard, une hyperméthylation du gène APC « Anaphase-promoting complex » chez les patientes atteintes du cancer du sein et particulièrement intéressante car la voie de la transduction du signal WNT « wingless-type MMTV Integration Site Family » peut représenter une nouvelle cible thérapeutique dans le cancer du sein [33].

De plus, des études récentes ont signalé une hyperméthylation du gène ATM « ataxia telangiectasia mutated » comme nouveau biomarqueur pour la détection du cancer du sein [33].

- **HDAC (histones désacétylases) et cancer du sein**

Dans le cancer du sein, une diminution significative du niveau d'acétylation des histones entre le tissu mammaire normal et les carcinomes mammaire in situ a été mise en évidence, ce qui suggère que les anomalies d'acétylation des protéines constituent un événement précoce de la cancérogénèse mammaire. Des études réalisées au niveau ARNm et/ ou protéines dans des tumeurs des seins invasives ont mis en évidence l'existence de certains HDAC (principalement HDAC1, 2, 3 et 6) dans les cellules tumorales mammaires, associée pour certaines d'entre elles à une valeur pronostique dans les tumeurs du sein [34]. Egalement, l'analyse de données issues de puces à ADN a affirmé une dérégulation d'expression de nombreuses HDAC dans les cancers du sein par rapport au tissu mammaire normal [34]. Enfin, l'HDAC6 a été impliquée dans la mobilité des cellules tumorales mammaire ainsi que dans leur prolifération indépendante du support [34].

Des données récentes montrent que les HDAC et leurs inhibiteurs régulent de façon très complexe la signalisation par les estrogènes dans les cellules du cancer du sein. Deux études développent les différents degrés de contrôle, détailler plus loin et illustrer dans figure 3 [35].

CHAPITRE 1 : LE CANCER DU SEIN

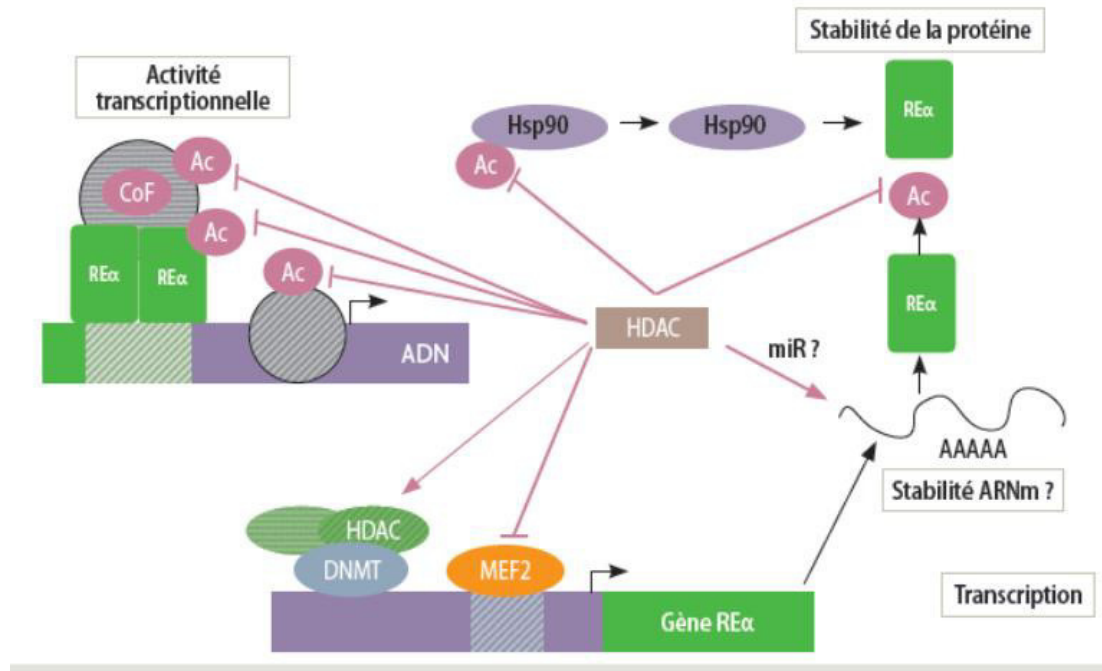


Figure 3:HDAC et signalisation estrogénique [35].

- **L'activité des micro-ARN et cancer du sein**

Les mi-ARN sont de petites molécules d'ARN endogène d'environ 22 nucléotides, fonctionnels et non codants [36].

Tableau 2 : Certains mi-RNA surexprimé dans le cancer du sein

mi-ARN	Activités
miR-155	Surexprimé, suggérant qu'il peut agir comme un oncogène
miR-373 et miR-520c	favorise la survenue de métastases en inhibant l'expression de CD44 qui une fois surexprimé augmente la survie chez les patientes atteinte du cancer du sein
miR-21	surexprimé dans le cancer du sein, entraînant l'inhibition de deux cibles :PDCD4 (programmedcelldeath 4) et la tropomyosine 1 (TPM1)
miR-17-5p (miR-91)	Assure l'inhibition de la transduction du mRNA IBI1 (amplified in breast cancer 1)
miR-126	Gène suppresseur de tumeurs, favorise la prolifération cellulaire par la diminution de son expression.

4.3 Forme sporadique, héréditaire et agrégation familiale

- **Les formes sporadiques**

Environ 85 à 90% des cas de cancer du sein sont sporadiques, apparaissant en l'absence de tout contexte héréditaire. Leur développement est favorisé par des facteurs cancérigènes environnementaux (tabac, alcool, produits chimiques, virus, radiations, microparticules, etc.) agissant sur différents mécanismes moléculaires.

D'autre part, certains polymorphismes génétiques comme celui altérant l'activité d'enzymes impliquées dans l'élimination des cancérogènes sont responsables d'une sensibilité plus au moins grande à ces facteurs environnementaux [29-37].

Environ 20% de la forme sporadique est causé par l'inactivation du gène p53. L'expression du gène suppresseur de tumeur p53 est régulée par une protéine appelée HOXA5. La perte de l'expression de HOXA5 dans les cellules constituerait une étape importante du processus de tumorigénèse. Dans le cas de cancer du sein HOXA5 n'est plus synthétisé, le gène p53 ne peut être transcrit et la cellule devient incapable de déclencher l'apoptose [29-37].

Le gène APC est un gène suppresseur de tumeur, il est associé au cancer familial et sporadique, dont le produit protéique agit comme un antagoniste de la voie de signalisation WNT en liant et régulant la protéine β -caténine. La fonction altérée du gène APC conduit à un manque de dégradation de la β -caténine qui peut provoquer l'activation constitutive aberrante de la voie WNT et conduit à une prolifération cellulaire incontrôlée et à une transformation tumorigène et la perte de la fonction de cette dernière conduit au dysfonctionnement de la dégradation de la protéine β -caténine. L'APC joue plusieurs rôles indépendants comme la dynamique des microtubules, l'organisation du cytosquelette, l'apoptose, la réparation de l'ADN et l'adhésion cellulaire [29-37].

- **La forme héréditaire**

Les cancers du sein d'origine héréditaire sont rares. Ils représentent 10% des cancers du sein en d'autres termes, une femme sur vingt atteintes d'un cancer du sein, a un cancer du sein lié à l'hérédité. La plupart des prédispositions génétiques aux tumeurs mammaires sont liées à des mutations des gènes impliqués dans la surveillance du génome : BRCA1, BRCA2, «Breast CAncer» et également ATM, CHEK2, PTEN et TP53 [38].

CHAPITRE 1 : LE CANCER DU SEIN

Tableau 3 : principaux gènes de prédisposition au cancer du sein [29].

Gènes	Syndromes	risque de cancer du sein associé à des variants tronquants		Risque de cancer du sein lié à des variants faux-sens	Cancer du sein : risque relatif (90% IC)	Cancer du sein : risque absolu (à 80 ans)
		Modéré	Élevé			
BRCA1	Cancer du sein et de l'ovaire héréditaire	Oui	Oui	Oui	11,4	75%
BRCA2	Cancer du sein et de l'ovaire héréditaire	Oui	Oui	Oui	11,7	76%
TP53	Li-Fraumeni	Oui	Oui	Oui	105 (62-165)	Inconnu
PTEN	Cowden	Inconnu	Inconnu	Oui	Non estimable	Inconnu
CDH1	Cancer gastrique diffus héréditaire	Probable	Inconnu	Oui	6,6 (2,2-19,9)	53%
STK11	Peutz-Jeghers	Inconnu	Inconnu	Inconnu	Non estimable	Inconnu
NF1	Neurofibromatose type 1	Probable	Improbable	Inconnu	2,6 (2,1-3,2)	26%
PALB2	Ataxie télangiectasie	Probable	Inconnu	Inconnu	5,3 (3,0-9,4)	45%
ATM		Probable	improbable	Oui	2,8 (2,2-3,7)	27%
CHEK2		Probable	Improbable	Oui	3,0 (2,6-3,5)	29%
NBN		Probable	improbable	Inconnu	2,7 (1,9-3,7)	23%
IC : Intervalle de confiance						

Généralement, on évoque une prédisposition aux cancers du sein lorsqu'il y a sur l'arbre généalogique plusieurs cas de ces cancers dans la même branche parentale et/ou lorsqu'il s'agit de cancers de survenue précoce. Le risque peut venir du côté paternel aussi bien que maternel.

Les mutations génétiques actuellement connues et prédisposant aux cancers du sein se situent essentiellement sur les gènes BRCA1 et BRCA2 Majoritairement responsables des formes familiales où sont également observés des cas de cancer de l'ovaire ou de cancer du sein chez

CHAPITRE 1 : LE CANCER DU SEIN

l'homme. Ces deux gènes ont été respectivement identifiés en 1994 et 1995. Ils sont multifonctionnelles, impliquées entre autre dans la réparation des dommages d'ADN et le maintien de l'intégrité du génome par la recombinaison homologue à travers des cassures d'ADN double brin, en interagissant avec diverse autres protéines, y compris RAD51, DSS1, RPA, MRE11, PALB2, P53. L'inactivation du BRCA2 entraîne une amplification du centrosome qui cause la séparation inégale des chromosomes [38].

Les cellules BRCA2-déficient montre les anomalies du nombre de chromosome. BRCA2 est également impliqué dans la duplication du centrosome spécifiquement dans la métaphase à la transition anaphase [38].

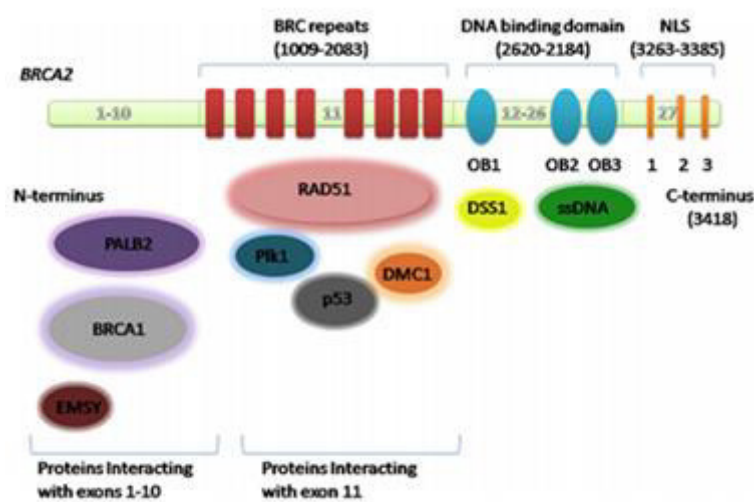


Figure 4 : la structure de BRCA2 [36].

BRCA1 et BRCA2 sont localisés respectivement dans les chromosomes 17 et 13. La probabilité pour une femme porteuse d'une mutation délétère sur BRCA1 ou BRCA2 d'avoir un cancer du sein dans sa vie est d'environ 57 à 65% pour le BRCA1 et 45 à 49% pour BRCA2.

Les mutations constitutionnelles de ces gènes se transmettent sur un mode autosomique dominant [39].

Un troisième gène, nommé BRCA3, est recherché depuis longtemps mais jusqu'à présent son implication n'est pas encore démontrée. Le risque familial résiduel, non lié à BRCA1 ou à BRCA2, pourrait correspondre à un modèle polygénique combinant les effets multiplicatifs de plusieurs gènes qui confèrent des risques plus modérés de cancer [40].

- **Agrégation familiale**

C'est la forme qui représente 15 à 20% de l'ensemble des cancers du sein. Elle peut être évoquée en présence d'antécédents de cancer mammaires dans l'anamnèse familiale en générale, dans ce contexte, les cancers surviennent tardivement et moins de femmes sont

CHAPITRE 1 : LE CANCER DU SEIN

atteintes que dans les situations héréditaires présentant un mode de transmission autosomique dominant.

De nombreux mécanismes peuvent intervenir pour expliquer ces agrégations familiales, dont des facteurs environnementaux communs au différent membre de la famille (alimentation, le statut socioéconomique, exposition hormonale, âge de la première grossesse) et /ou facteurs de risque génétique-familiaux non encore déterminés [29].

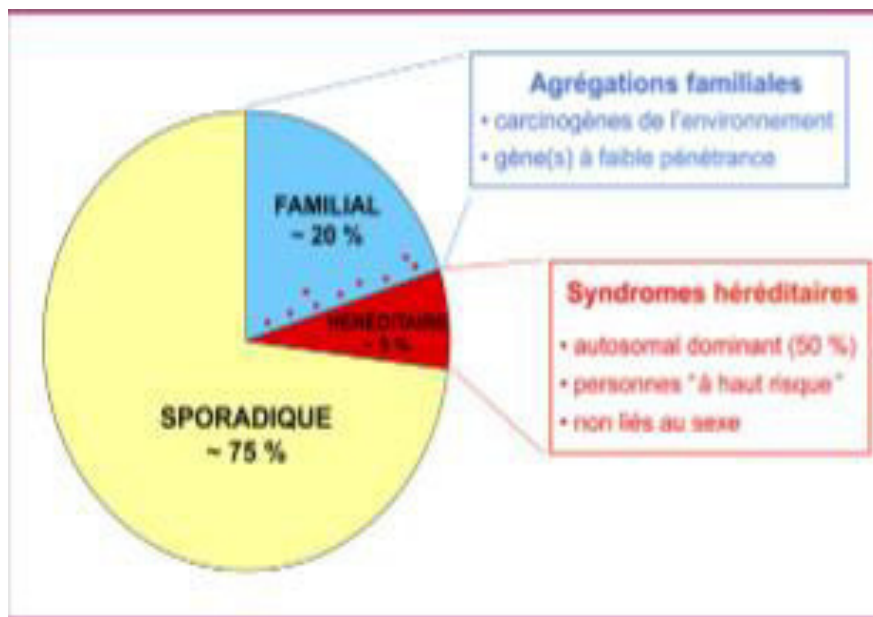


Figure 5: différentes formes de cancer du sein en lien avec les antécédents familiaux [29].

5. Traitement

Différents types de traitement peuvent être utilisés pour traiter le cancer du sein : la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie et les thérapies ciblées. Ces différents traitements peuvent être utilisés seuls ou en association [41].

6. Dépistage

Le dépistage du cancer du sein est utilisé pour identifier les femmes atteintes d'un cancer asymptomatique, donc à un stade précoce, et de le traiter de façon moins agressive et plus efficace [42].

➤ Méthodes de dépistage du cancer du sein :

Les tests de dépistage sont utiles pour détecter précocement des cancers et réduire les risques de mourir par ces cancers. Parmi ces tests : la mammographie, l'examen clinique des seins et l'IRM chez les femmes présentant un risque élevé de cancer du sein [43].

7. Le conseil génétique

Le conseil génétique du cancer du sein est le niveau de prise en charge des femmes dont les histoires personnelles et /ou familiales sont compatibles avec des mutations dans les deux gènes majeurs associés au sein héréditaire BRCA1 et BRCA2 [44].

CHAPITRE 1 : LE CANCER DU SEIN

Chez les femmes avec une mutation BRCA1/2, la possibilité de développer un cancer du sein est de 50% à 85%. Pour chaque parent au premier degré ayant un cancer du sein avant l'âge de 50 ans, le risque de cancer du sein augmente de 1.2 fois chez une femme avec une mutation BRCA1 et de 1.7 fois chez une femme avec une mutation BRCA2 [44].

Le conseil génétique et le dépistage des mutations des gènes BRCA1/2 peuvent renseigner les individus sur le risque de cancer du sein et influence la prise de décision sur la prévention du cancer aux membres de la famille pour définir leur risque afin d'optimiser la gestion du risque, d'augmenter le contrôle personnel et de diminuer la peur [44].

CHAPITRE 2 :

LA MTHFR

I. La *MTHFR*

La 5,10-méthylène tétrahydrofolate réductase, plus communément appelée MTHFR, représente une enzyme clé qui joue un rôle important dans le processus de synthèse des protéines. La MTHFR est importante pour les réactions chimiques comportant les formes des folates (vitamines), nommés communément vitamine B9 cette enzyme convertit le 5,10-méthylentétrahydrofolate en 5-méthyltétrahydrofolate. Cette réaction est indispensable pour les différentes étapes de conversion d'homocystéine en méthionine. L'organisme utilise la méthionine pour la synthèse des protéines et autres composants importants [45].

1. La protéine *MTHFR*

1.1 Structure de la protéine *MTHFR*

Chez l'homme, la protéine MTHFR est présente dans le cytoplasme, elle est composée de 656 AA, il s'agit d'un homodimère de 150 KD. Elle possède deux sous-unités, chaque sous unité est formée de deux domaines :

Le domaine catalytique à l'extrémité N-terminale, de poids moléculaire 40 KDa, il possède un site de liaison pour le coenzyme FAD et le 5,10 méthylène THF, le NADPH est donneur d'électron). Le domaine régulateur à l'extrémité C-terminale, de poids moléculaire 37 KDa contient le site de liaison de SAM, qui est un fort inhibiteur allostérique de la réaction catalysée par la MTHFR.

Entre ces deux domaines se trouve une forte région hydrophobe avec une séquence d'acide aminé Lys-Arg-Arg-Glu-Glu formant un site de clivage par la trypsine.

La digestion de la MTHFR par la trypsine ne conduit pas à la perte de l'activité catalytique réductrice de l'enzyme. Par contre, la protéine devient sensible à la régulation allostérique.

Cette protéine a deux isoformes, l'un de poids moléculaire de 77KD et l'autre de 70KD [4-45 - 46].

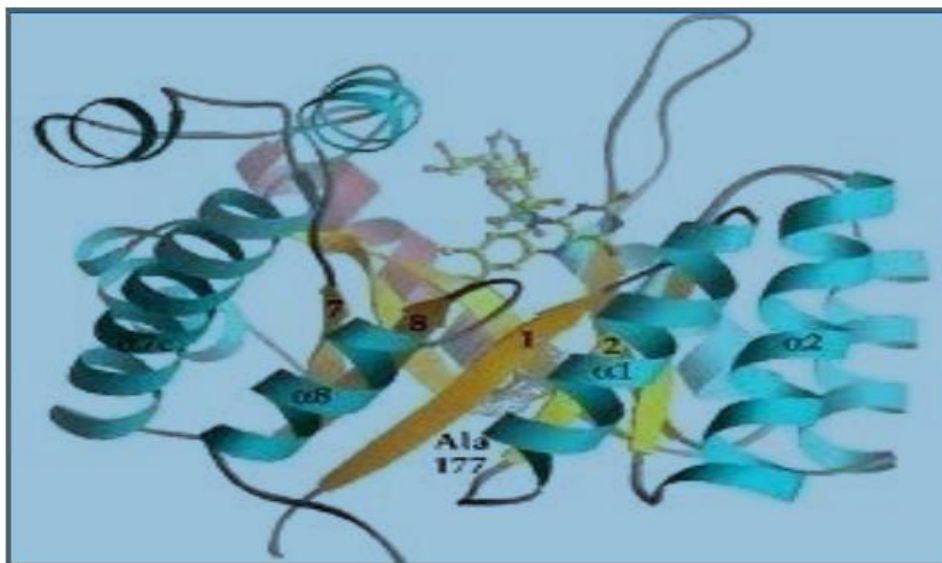


Figure 6 : structure d'une unité monomérique de la protéine tétramérique *MTHFR* [47].

1.2 Fonction de la protéine *MTHFR*

La *MTHFR* est une enzyme critique dans le métabolisme monocarboné, Elle joue un rôle important dans la régulation de la méthylation cellulaire. Elle sert à la conversion irréversible du 5, 10-méthylènetétrahydrofolate (CH_2THF) en 5-méthyltétrahydrofolate ($5\text{-CH}_3\text{-FH}_4$) qui est la forme biologique majeure des folates, indispensable à la reméthylation de l'homocysteine en méthionine (figure 8) qui sera transformé en S-adenosyl méthionine(SAM), principale donneur de groupement méthyle dans l'organisme [9-4].

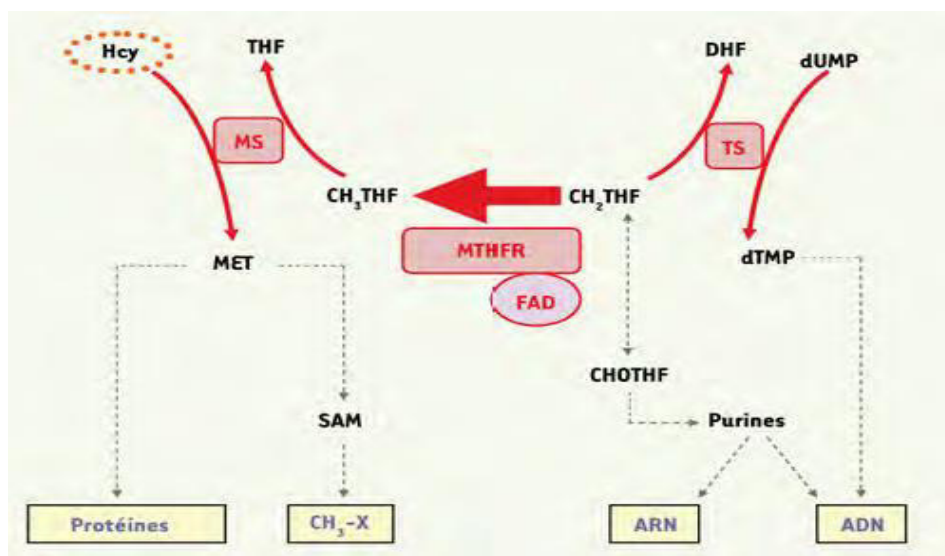


Figure 7 : répercussion métaboliques de l'activité de la *MTHFR* [48].

CHAPITRE 2 : LA MATHFR

L'activité de la MTHFR affecte ainsi la disponibilité du CH₂THF, ce qui influence la synthèse de l'ARN et de l'ADN. Le CH₃THF est requis pour la reméthylation de l'homocystéine (Hcy) en méthionine (MET), qui intervient elle-même dans la synthèse protéique et la méthylation de l'ADN et d'autres composés (CH₃-X). Le FAD est le cofacteur de la MTHFR. MS, méthionine synthase ; TS, thymidylatesynthase ; THF, tétrahydrofolate; DHF, dihydrofolate ; CHOTHF, 10-formyltétrahydrofolate ; SAM, S-adénosyl méthionine [48].

Cette conversion est très importante pour la biosynthèse des nucléosides, la réparation de l'ADN, la méthylation. et ainsi le métabolisme de l'homocystéine.

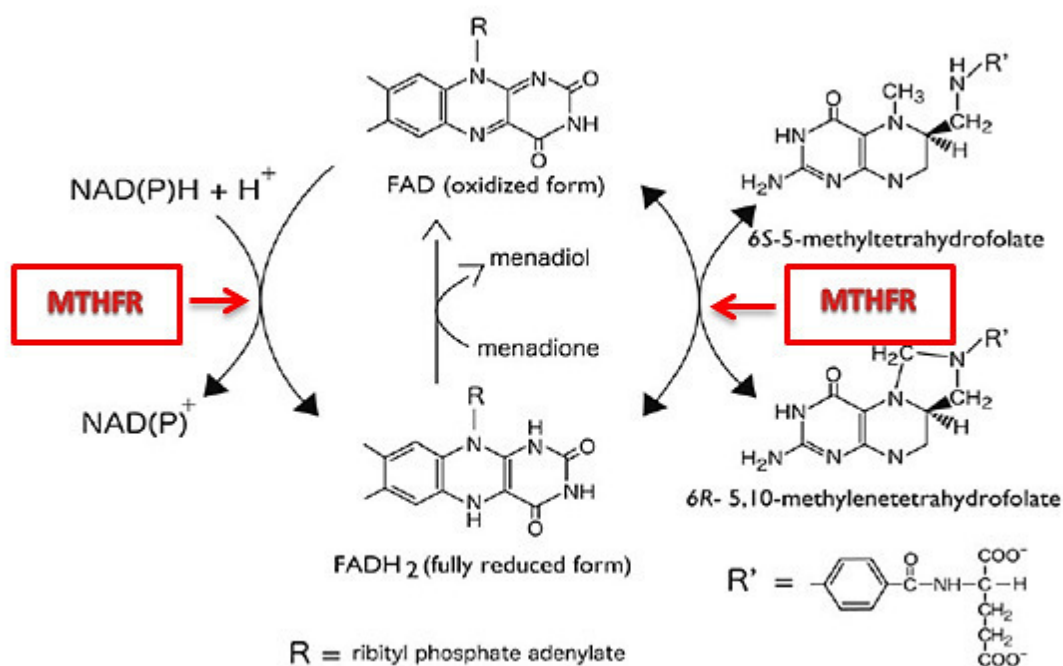


Figure 8 : Réactions catalysées par la MTHFR. La MTHFR lie de manière non covalente le FAD [49].

Comme un cofacteur essentiel. Le NADPH et le 5,10-MTHF sont des substrats physiologiques. NADPH réduit le FAD, le FAD réduit assure la réduction du 5,10-MTHF.

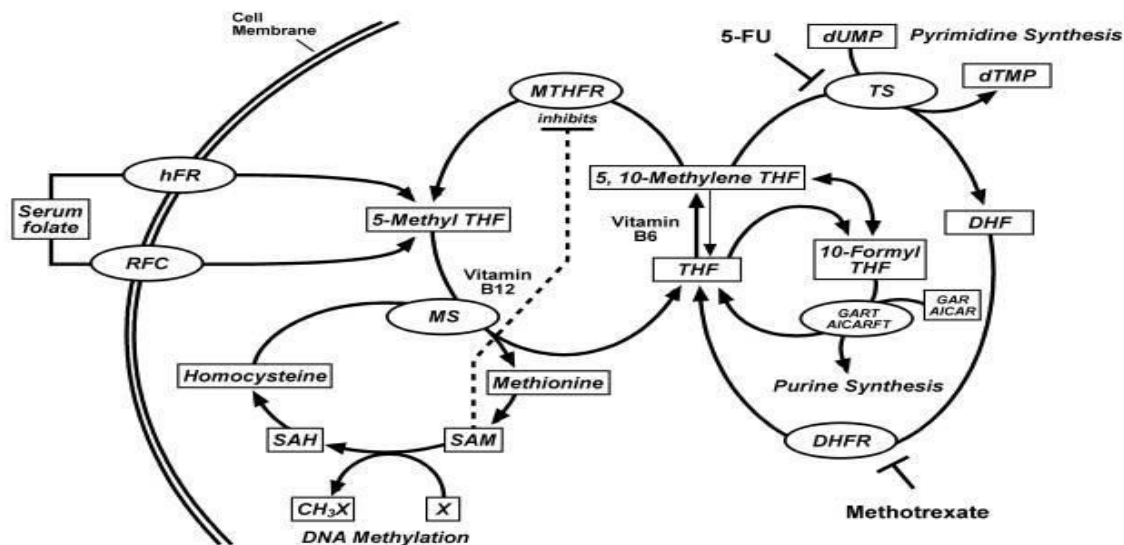


Figure 9 : Fonction de la protéine MTHFR [50].

Une activité normale de la protéine *MTHFR* garde un pool adéquat en folates circulants et prévient l'élévation des concentrations de l'homocystéine. Inversement une activité diminuée de la protéine provoque une diminution des niveaux des folates, une réduction de la biodisponibilité de méthionine ainsi qu'une augmentation des concentrations de l'homocystéine [45-46].

2. Localisation et structure du gène de la *MTHFR*

Le gène du méthylène tétrahydrofolate réductase (*MTHFR*) est l'un des gènes, hautement polymorphes, les plus étudiés dans le cancer du sein pour son rôle crucial dans les modifications épigénétiques. Il est cartographié sur le bras court du chromosome 1 en position 1p36.3 plus précisément dans la région des paires de bases 11769246 Pb jusqu'à 11788568 Pb.

Le gène *MTHFR* consiste en une région codante de 2 kb divisée en onze exons. Il possède plusieurs sites de début de la transcription, d'épissage alternatif et de sites de polyadénylation. Il n'existe aucun élément TATA box de régulation du gène *MTHFR* humain mais il est riche en îlots CpG [2-51].

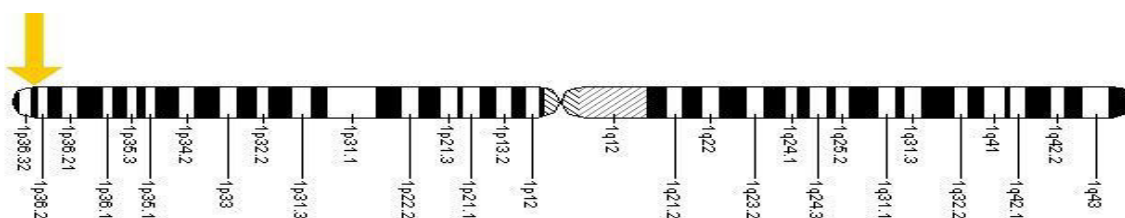


Figure 10: Localisation du gène *MTHFR* sur le chromosome 1: paire de base de 11.769,246 jusqu'à 11,788,568 [50].

3. La transcription du *MTHFR*

La transcription du gène *MTHFR* produit trois transcrits différents (*MTHFR* 1, 2 et 3), respectivement, de 2.8, 7.2 et 9.8 kb (51), qui diffèrent par leurs premiers exons (Figure 11)

En outre, le transcrit *MTHFR* 1 à deux variant.

Chacun des trois transcrits majeur *MTHFR* 1, 2 et 3 a un premier codon ATG individuel codant éventuellement pour des polypeptides de 657, 698 et 680 résidus d'acides aminés, respectivement [52].

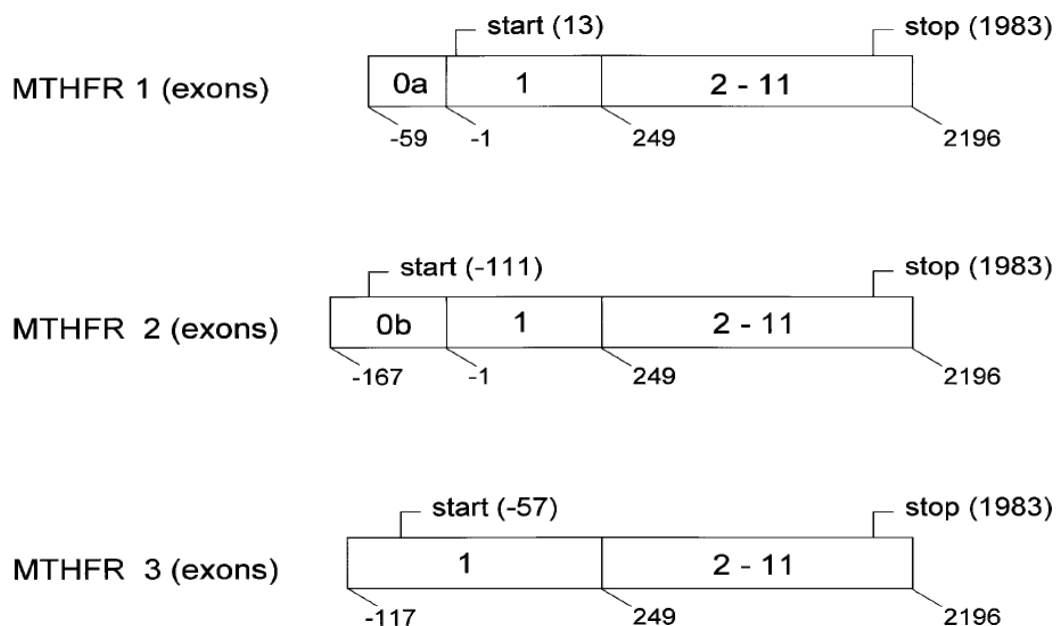


Figure 11: Les différents transcrits du gène *MTHFR* [52].

4. Régulation de la signalisation de la *MTHFR*

La *MTHFR* peut être régulée de plusieurs façons. Des quantités extrêmes de DHF et SAM sont responsables de l'inhibition de son activité [52].

En outre, la modification post-traductionnelle de la *MTHFR* par phosphorylation résulte en une activité diminuée et une susceptibilité développée à l'inhibition par SAM [53].

II. Polymorphismes du gène *MTHFR*

Plusieurs polymorphismes ont été rapportés dans le gène *MTHFR* jusqu'à présent. Ces polymorphismes se traduisent essentiellement par substitution de nucléotides, toutes associées à une diminution plus ou moins prononcée de l'activité de l'enzyme (figure 13) [56-57].

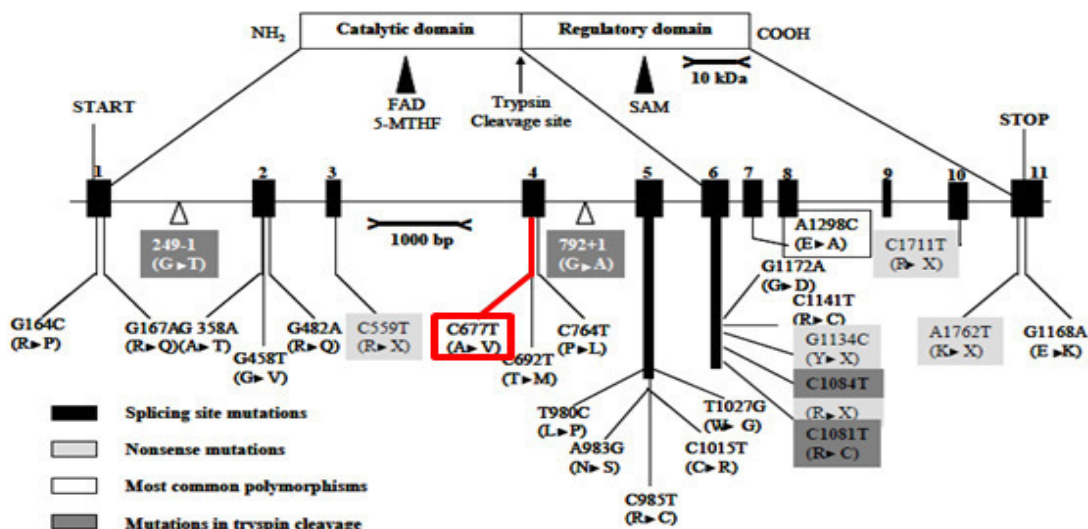


Figure 12 : Gène, protéine et polymorphismes du gène *MTHFR* [57].

1. Le polymorphisme C677T

La mutation la plus fréquente C677T du gène du *MTHFR*, est située sur le chromosome 1, il s'agit d'une conversion d'une cytosine en thymine (C-T) au niveau du nucléotide 677 sur la partie N-terminal de l'exon 4. Elle est transmise de façon autosomique récessive [58].

Le polymorphisme C677T se traduit dans la séquence protéique *MTHFR* par une substitution d'une alanine par une valine en position 222 qui se situe dans le domaine catalytique de l'enzyme au niveau du site de liaison avec le cofacteur Flavine Adénine Dinucléotide (FAD) [59].

La protéine résultante de ce polymorphisme présente une activité enzymatique réduite à 37°C et plus, pour cela la protéine est appelée thermolabile [60-61].

L'enzyme modifiée perd son cofacteur FAD rapidement, ce qui diminue sa stabilité et par conséquent son activité enzymatique jusqu'à 70% chez les individus homozygotes (TT) et 40% chez les individus hétérozygotes (CT) [62].

1.1 Incidence de la mutation C677T de la *MTHFR*

L'allèle 677T, du polymorphisme du gène *MTHFR*, montre une hétérogénéité de distribution géographique remarquable.

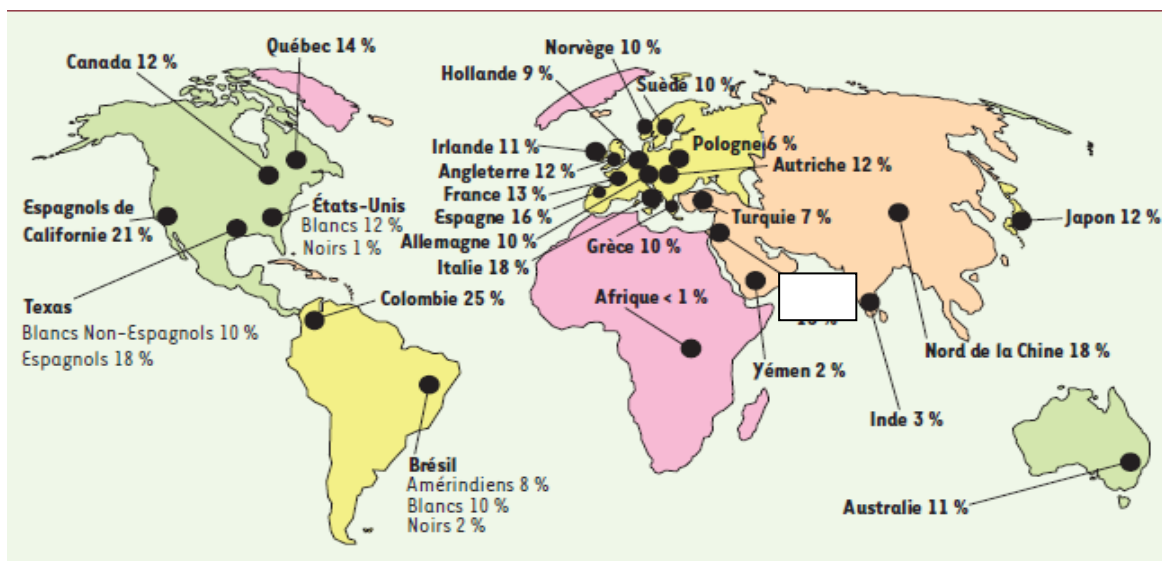


Figure 13: Fréquence des homozygotes 677TT pour différentes régions géographiques [63].

1.2 La mutation C677T et l'hyperhomocystéinémie

le polymorphisme C677T du gène de la *MTHFR* est corrélé à des concentrations élevées d'Homocystéine dans la voie de la reméthylation de l'Hcy, le groupement méthyl est apporté par le 5, méthylène tétrahydrofolate qui est sous la dépendance de la 5,10MTHFR [64].

La mutation C677T du gène *MTHFR* génère une réduction de l'activité enzymatique et une élévation de la thermolabilité de la protéine *MTHFR* et ainsi perturbe l'apport du groupement méthyl ; nécessaire pour la reméthylation de l'Hcy en méthionine et donc sera responsable d'une augmentation des taux d'Hcy [65].

1.3 Effet de la mutation C677T sur les folates

Le génotype homozygote (T/T) de la *MTHFR* produisant l'enzyme thermolabile, réduit l'efficacité et la quantité de méthyl-THF entraînant une perturbation du métabolisme de folates et un changement de la composition cellulaire des dérivés foliques [66].

Les taux plasmatiques des folates sont bas chez les individus de génotype T/T [67-68].

En effet, une différence des variations du taux de folate et d'homocystéine, suite à une suppléments de 0,5mg/j d'acide folique entre les individus T/T et CC a été constatée [69].

La plupart des études visent le génotype TT, bien que le génotype CT puisse aussi causer une diminution des folates [70].

En effet, il est admis que la production de méthyles disponible est réduite de 70% chez les porteurs homozygotes de la mutation et de 35% chez les hétérozygotes [71].

La présence de la mutation entraîne un ralentissement de l'activité du cycle folique, augmente le besoin en ce nutriment et une diminution du potentiel méthylant de l'organisme, y compris sa capacité à reméthiler l'homocystéine (figure14).

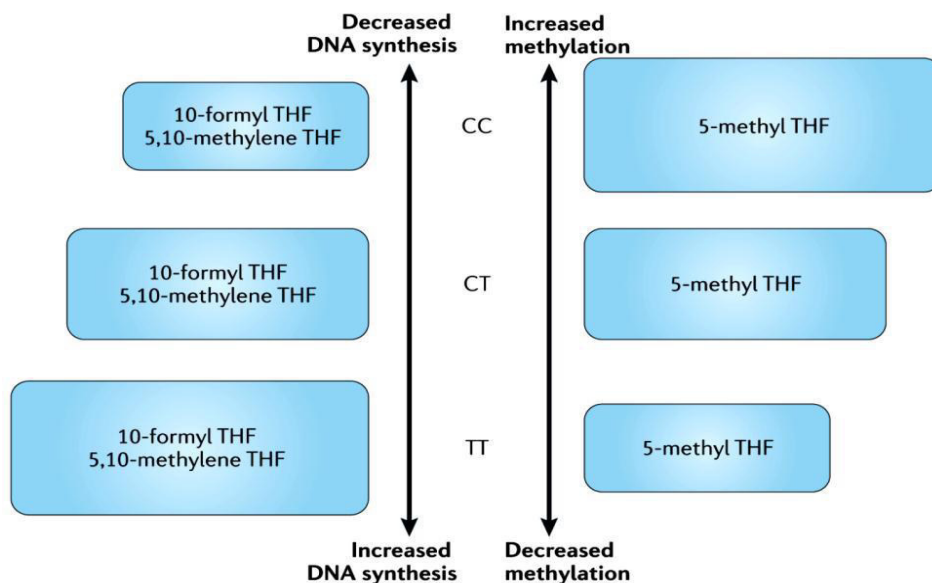


Figure 14: Trois génotypes de la *MTHFR* affectant la méthylation et la synthèse de l'ADN à différentes mesures [72].

2. Le polymorphisme A1298C

Une seconde mutation moins fréquente a été mise en évidence : le remplacement d'une adénine par une cytosine en position 1298 sur la partie C terminal de l'exon 7 entraîne le remplacement d'un glutamate par une alanine au niveau du codon 429 de la protéine *MTHFR*.

Cette variation se produit dans le domaine régulateur de l'enzyme pour la S-adenosylméthionine. La protéine résultante est caractérisée par une réduction de son activité enzymatique.

Les homozygotes et les hétérozygotes pour A1298C ne présentent pas de concentrations élevées en homocystéine, ni des concentrations basses en folates.

L'association des deux variantes génétiques C677T et A1298C chez les mêmes sujets présente un profil semblable à celui présent chez les homozygotes C677T avec augmentation des concentrations d'homocystéine et une diminution des concentrations en folates [45-62].

L'existence simultanée des deux variantes génétiques, le C677T et C1298A, est associée à des maladies cardiovasculaires, des anomalies de la coagulation et des malformations congénitales [73-74].

3. Autres polymorphismes du gène *MTHFR*

D'autres polymorphismes rares ont été identifiés dans le gène codant l'enzyme *MTHFR*.

Un défaut d'activité de la protéine 5,10-MTHFR avec une activité résiduelle est du à ces polymorphismes. Ainsi l'allèle T1317C, qui n'entraîne pas le changement de l'acide aminé dans la protéine, donne un déficit en 5-méthyl-THF, ce déficit est évalué de manière indirecte par le dosage de l'homocystéinémie qui montre une hyperhomocystéinémie de 25% en moyenne chez les patients homozygotes pour la mutation comme cela a été démontré dans les cardiopathies [68-75].

L'allèle G1793A résultant de la substitution d'une arginine en glutamine au niveau du codon 594. Plusieurs autres polymorphismes ont été découverts chez une ou deux familles seulement, il s'agit des polymorphismes T1081C, G1027T, T1084C et T1711C. La transmission de ces mutations est autosomique récessive [77].

Certains de ces polymorphismes ont été décrits en association avec le polymorphisme C677T et ceci réduit l'activité enzymatique de la protéine *MTHFR* de façon remarquable, alors que d'autres n'altèrent pas la séquence des acides aminés et leur rôle reste à déterminer [63-77-78-79]

CHAPITRE2 : LA MATHFR

CHAPITRE 3 : LA *MTHFR* ET CANCER DU SEIN

Parmi les polymorphismes de la *MTHFR*, les associations du variant génétique C677T à des maladies cardiovasculaires, des anomalies de la coagulation, des malformations congénitales et aux divers types des cancers ont fait l'objet de nombreuses recherches.

1. Le polymorphisme C677T et malformation congénitales

• Problèmes vasculaires

Vu que l'hyperhomocystéinémie constitue un facteur qui se combine aux autres facteurs en cause dans les maladies cardiovasculaires, le polymorphisme C677T peut modifier la susceptibilité des sujets à l'égard de ces maladies qui ont pour caractéristique d'être multifactorielles.

Des méta-analyses suggèrent que le génotype 677TT peut être un facteur de risque modeste en ce qui concerne les accidents vasculaires cérébraux, la thrombose veineuse et les maladies coronariennes, spécialement s'il y a une carence en acide folique [50].

• Défauts de fermeture du tube neural et autres anomalies congénitales

Quelques rapports ont fait état de taux élevés d'homocystéine plasmatique totale dans des familles présentant des affections du tube neural [80-81]. Un supplément en folates réduit l'incidence des défauts du tube neural. L'allèle 677T est le premier facteur de risque génétique qui a été proposé comme source de cette anomalie [82]

Le risque est presque 2 fois plus grand si l'enfant ou la mère possède le génotype 677TT

Des analyses préliminaires suggèrent qu'il existe une association entre le génotype 677TT et la survenue des fentes palatines ou d'anomalies congénitales cardiaques, mais un plus grand nombre d'études serait nécessaire afin de confirmer ces observations [50].

• Complications de la grossesse

Une méta-analyse a déterminé que le génotype 677TT augmente le taux d'avortement spontané de 30 %-40 %, l'effet étant plus affirmé en début de grossesse. Le génotype 677TT augmente de 40 % le risque de problèmes vasculaires placentaires et de 20 % la probabilité de pré-éclampsie [50].

• Troubles neuropsychiatriques

Une association a été notée entre la schizophrénie et l'allèle 677T. D'autres études ont abouti à des résultats modérés, probablement à cause de l'hétérogénéité des cas de schizophrénie [50].

Une analyse, qui considérait 6 000 individus, a indiqué que le génotype 677TT cause une augmentation de 70 % du risque de dépression [83].

Des travaux sur la démence et le déclin cognitif léger ont permis de distinguer qu'il existe une augmentation des taux d'homocystéine plasmatique chez un nombre significatif de patients [83]. Puisque la démence est caractérisée par un affaiblissement des vaisseaux sanguins qui irriguent le cerveau, l'allèle 677T représente donc un facteur de risque potentiel. Le lien entre ce polymorphisme et la démence d'origine vasculaire ou encore la maladie d'Alzheimer n'a toutefois pas été clairement établi [50].

2. Le polymorphisme C677T et cancers

Plusieurs études épidémiologiques suggèrent l'implication du métabolisme des folates et ses enzymes dans la modulation du risque de cancer, et le polymorphisme de la *MTHFR* reste le mieux étudiée.

L'allèle C677T du gène *MTHFR* présente un intérêt tout particulier dans ces recherches. L'association entre polymorphisme de la *MTHFR* et cancers a été donc examinée dans nombreuses études pour plusieurs types de cancers en fonction de la géographie et de l'ethnicité [84-85]. En effet, un apport insuffisant en folate prédispose au cancer colorectal. Cependant, si l'apport en acide folique est suffisant, le génotype 677TT est paradoxalement associé à une diminution du risque de cancer colorectal. Il exerce aussi un effet protecteur dans le cas des leucémies lymphocytaires aiguës [84].

Ce polymorphisme influence la progression de plusieurs cancers par des mécanismes différents :

- la perturbation de la synthèse de la méthionine et de la S-adénosyl méthionine, avec des répercussions sur la synthèse des protéines ou les réactions de méthylation. De plus, l'homocystéine peut être convertie en S-adénosyl homocystéine, un inhibiteur de plusieurs méthyl transférase. Puisque des modifications de méthylation de l'ADN affectent l'expression des gènes, une déficience de *MTHFR* peut influencer la promotion puis le développement de processus oncogéniques.
- une redistribution des métabolites du folate peut affecter la synthèse des purines et des pyrimidines, avec des conséquences sur la synthèse ou la réparation de l'ADN.

Le mécanisme proposé pour expliquer ce phénomène tient à une redistribution des folates, facilitant la synthèse de la thymidine et réduisant les risques de dommage à l'ADN.

Un effet délétère du génotype TT a été retrouvé dans d'autres types de cancers : cancer du sein, cancer du pancréas et les lymphomes malins.

Ce phénomène est expliqué par une hypométhylation globale de l'ADN avec une hyperméthylation inactivatrice de gènes suppresseurs de tumeurs.

Lorsque l'apport en folates est insuffisant, l'augmentation du risque de développer certains cancers est associée au génotype TT [85].

3. Le polymorphisme C677T et le cancer du sein

L'association du polymorphisme C677T du gène *MTHFR* avec le cancer du sein a été largement étudiée et a donné de nombreux résultats contradictoires. Le lien entre l'apport alimentaire des folates et le risque de cancer du sein pourrait être modifié par le polymorphisme C677T du gène de la *MTHFR*.

Dans la plupart des études, les génotypes CT et CC ont été regroupés et comparés au génotype TT. Même si le génotype CT est associé à une diminution de l'activité enzymatique de la *MTHFR*, cette diminution est beaucoup moins importante qu'en cas de mutation homozygote TT et ne semble donc pas influencer le risque de cancer du sein.

Dans une étude sur la population thaïlandaise, il a été démontré que le risque de cancer du sein pourrait augmenter en rapport avec le polymorphisme génétique qui est impliqué dans le mécanisme de formation des folates et la voie métabolique de l'alcool [64]. Dans la population chinoise, Le polymorphisme C677T était associé au risque du cancer du sein [84]. L'allèle 677T a été retrouvé significativement plus fréquent dans les cas du cancer du sein bilatéral ou chez ceux qui ont le cancer du sein associé à celui de l'ovaire dans un échantillon des juifs [64].

Le polymorphisme C677T de la *MTHFR* a été signalé pour être un facteur de risque pour les femmes pré-ménopausées atteintes d'un cancer du sein sporadique [84]. Cette étude sur la ménopause a montré que les femmes ont présenté une association entre le génotype *MTHFR* 677TT et une augmentation modérée du risque de cancer du sein dans ce groupe de population. Cette association devient forte en particulier avec une consommation élevée de certains nutriments riches au carbone. Contrairement à ces résultats, d'autres chercheurs ont rapporté qu'il n'existe pas d'association entre ce polymorphisme et le risque du cancer du sein dans la population syrienne [64-85]. Les mêmes résultats ont été observés pour la région de Sibérie occidentale de la Russie [64-84].

PARTIE PRATIQUE

PATIENTS ET METHODES

PATIENTS ET METHODES

1. Type d'étude

Il s'agit d'une étude descriptive transversale de type cas-témoins basée sur l'analyse des données recueillies, portant sur un échantillon du cancer de la glande mammaire chez la femme jeune.

Notre étude s'est déroulée à partir du mois de Mars jusqu'à la fin du mois de juin. Elle a inclus une population de 26 sujets. Le recrutement de nos patientes a été réalisé, au sein du service sénologie du Centre Hospitalier Universitaire Ben Badis de Constantine (CHUC) ainsi que la clinique EL NAKHIL, et la réalisation pratique du travail s'est effectuée au niveau du laboratoire de biologie et génétique moléculaire, de la faculté de médecine, de l'université Salah Boubnider de Constantine.

✚ Les caractéristiques épidémiologiques cliniques et histologiques ont été recueillies à partir des dossiers médicaux des patientes et du questionnaire que nous avons établi.

1.1 L'échantillonnage

1.1.1 Recrutement des patientes

Le recrutement des sujets a été réalisé au niveau du service de sénologie médicale du CHUC. Des critères d'exclusion et d'inclusion ont été établis pour cette population.

- **Critères d'inclusion :**
 - ✓ Femmes algériennes résidant à l'est algérien
 - ✓ Consentement de la patiente
 - ✓ Femmes ayant répondu au questionnaire
 - ✓ Femmes atteintes d'un cancer du sein prouvé histologiquement
 - ✓ Femmes de tout âge
- **Critères d'exclusion :**
 - ✓ Les femmes n'ayant pas répondu au questionnaire
 - ✓ Les femmes refusant de faire le prélèvement
 - ✓ Patientes traitées auparavant pour un autre cancer

1.1.2 Recrutement des témoins

Les 26 témoins utilisés dans l'étude du polymorphisme de la MTHFR ont été pris à partir de la banque d'ADN du laboratoire de biologie et génétique moléculaire

- **Critères d'inclusion :**
 - ✓ Sujets sains de sexe féminin
 - ✓ Femmes âgés de plus de 25ans
 - ✓ Ne présentant aucun signe clinique « cancer ».
- **Critères d'exclusion :**
 - ✓ sujets présentant des antécédents personnels d'une maladie néoplasique quel que soit sa localisation.

1.2 Méthodologie :

A. Questionnaire :

Un questionnaire clinique comprenant toutes les données nécessaires est établi pour la population d'étude (Annexe 3). Tous les renseignements nécessaires sont enregistrés dans ce questionnaire après une consultation du dossier médicale et l'interrogation de la patiente réalisé par nous même. Toutes les patientes participant à notre recherche ont fourni un consentement éclairé et signé (annexe 4), explicitant les implications et les limites de leur participation à l'étude. Chaque patiente était suivie au service de sénologie du CHUC et à la clinique EL NAKHIL.

B. Prélèvement sanguin :

Le prélèvement sanguin destiné à l'extraction de l'ADN est recueilli à partir du sang total périphérique (5 à 10 ml), par ponction veineuse, dans un tube vacutainer contenant de l'EDTA (Ethylene Diamine Tetracetic Acid) comme anticoagulant

Le prélèvement sanguin doit respecter les critères suivants :

- ✓ Le prélèvement s'est effectué sur les patientes répondant aux critères d'inclusions de notre étude.
- ✓ L'accord de la patiente et l'obtention de son consentement sont obligatoires.
- ✓ Le prélèvement est réalisé dans un tube EDTA (Ethylene Diamintetracetic Acid) sous vide.

1.3 Etude moléculaire :

Différentes techniques relatives à l'étude moléculaire ont été mise en place: une extraction de l'ADN, une technique de polymérisation en chaîne PCR (Polymerase Chain Reaction), et une digestion enzymatique par l'enzyme de restriction *HinfI*.

A. L'extraction d'ADN

Principe :

L'ADN de chaque patient est extrait à partir de leucocytes du sang périphérique recueillis sur tube EDTA, suivant la technique au NaCl. Ainsi les leucocytes sont séparés du sang total par lyse hypotonique et traités ensuite par un détergent (SDS) et une protéinase K. L'ADN nucléaire est libéré dans le milieu et les protéines qui lui sont associés sont digérées et éliminées par précipitation au NaCl. La pelote est formée dans le surnageant par précipitation avec l'éthanol. L'ADN est solubilisé en phase aqueuse par Tris EDTA 10 :1

Préparation des leucocytes :

Les leucocytes ont été séparés du sang total par lyse hypotonique des globules rouge selon les étapes suivantes :

- Dans un tube Falcon de 50 ml, mettre le sang et compléter à 30 ml avec du TE (Tris-EDTA) 20:5, laisser 10 mn dans la glace (la composition du tampon d'extraction TE 20:5 est mentionnée dans l'annexe5).
- Centrifuger 10 mn à 3900 tpm (tours par minute),
- aspirer le surnageant avec la trompe à vide
- Ajouter quelques ml de TE 20:5 au culot et le remettre en suspension avec une passette stérile
- Compléter à 25 ml avec du TE 20:5 et laisser 10 mn dans la glace,
- Centrifuger dans les mêmes conditions que la première fois.
- aspirer le surnageant avec une trompe à vide pour l'obtention d'un culot des leucocytes (si on veut s'arrêter à ce niveau les mettre dans un tube nunc de 1.5 ml avec du TE 10 :1 et les conserver à -20° dans le frigo).

Extraction d'ADN

- Transvaser le culot des leucocytes dans un tube Falcon de 15 ml,

Patients et méthodes

- Ajouter 3 ml de tampon de lyse en dilacérant le culot avec une passette stéril (la composition du tampon de lyse est mentionnée dans l'annexe)
- Ajouter 200 µl de SDS (Sodium Dodécyle Sulfate) à 10 %. C'est un détergent qui possède une action lytique sur les membranes cellulaires, dénature les protéines par destruction de leur structure tertiaire et inhibe l'action des nucléases,
- Ajouter 100 µl de protéinase K à 10 mg/ml. Cette enzyme dénature et dégrade les protéines,
- Agiter le tube sur une roue à 37° C pendant une nuit
- Le lendemain, refroidir dans la glace 5 mn
- Ajouter 1 ml de Na Cl 4M et agiter vigoureusement à la main. L'ADN nucléaire est libérées dans le lysat et les protéines qui lui sont associées sont digérées et éliminées par précipitation au NaCl. La pelote d'ADN est formée dans le surnageant par précipitation avec l'éthanol pur,
- Remettre 5 mn dans la glace (précipitation des protéines)
- centrifuger 15 min à 2500 rpm
- transverse le surnageant dans un tube Falcon de 15 ml. Ajouter 2 fois son volume d'éthanol absolu préalablement refroidi (environ 8 ml) et agiter en retournant le tube plusieurs fois : la pelote d'ADN se forme
- laisser éventuellement 30 min à -20°C si la pelote ne se forme pas
- récupérer la pelote d'ADN avec une pipette pasteur et la rincer 2 fois dans l'éthanol à 70%
- mettre la pelote dans un tube nunc.

Solubilisation :

Ajouter entre 300 et 1000µl de l'eau distillée stérile 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 (1 à 2 jours).

Conservation :

-à +4°C pendant 4 mois.

-à -20°C jusqu'à 3 ans

Puis à -80°C jusqu'à utilisation.

B. Amplification par PCR (Polymérase Chaîne Réaction) :

La PCR est une méthode de biologie moléculaire permettant d'amplifier des séquences d'ADN cibles et définies (l'Amplicon) en plusieurs millions d'exemplaires. La PCR est une réaction en chaîne qui consiste à effectuer n cycles successifs d'amplification, au cours desquels deux amorces dirigent l'amplification du fragment d'ADN double brin qu'elles encadrent. Un cycle d'amplification est composé de trois étapes : dénaturation, hybridation et élongation.

Après la préparation du mix de la PCR (annexe 6), nous avons pris 49 µl de ce mélange avec 1 µl d'ADN pour chaque tube. Ensuite le déroulement des cycles de la PCR a été assuré par le thermocycleur selon les conditions d'amplification suivantes:

- Dénaturation à 94 °C pendant 30 secondes
- Hybridation à 65 °C pendant 30 secondes
- Élongation à 72 °C pendant 30 secondes

✚ **Préparation du milieu réactionnel de la PCR :** le milieu réactionnel de PCR comprend tous les constituants nécessaires à la réalisation d'une PCR. Pour préparer le milieu réactionnel ou le mix, il faut multiplier la quantité de chaque composant par le nombre de tubes voulu plus un, ce dernier représente le tube témoin «blanc» dans lequel on avait mis uniquement le mix sans ADN.

- L'enzyme : La Taq DNA Polymérase (KitBioline) est utilisée à une concentration de 5 U/µl. La Taq polymérase est extraite de la bactérie *Thermophilusaquaticus*, elle est thermorésistante, sa température optimale d'action est de 72° C. C'est une enzyme capable d'associer des nucléotides en polymère d'ADN de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'.
- La solution tampon : on utilise 1 µl de tampon pour un volume final de 10 µl par tube de PCR. Le tampon de la Taq (Kit Bioline) nommé 10X NH4 Reaction Buffer est composé de : 160 mM (NH4)2SO4, 670 mM Tris- HCL (pH 8,8 à 25° C), 0,1 % stabiliser
- Les oligonucléotides ou dNTP (désoxy-Nucléotides-Tri-Phosphates) : les dNTP sont composés de dATP, dTTP, dGTP et dCTP. Ce sont les éléments de bases utilisés par la Taq polymérase pour synthétiser les brins d'ADN complémentaires lors de

Patients et méthodes

l'élongation. La concentration de la solution stock est de 25 mM pour chaque base. La concentration finale de chaque base dans la réaction de PCR est de 0,2 mM.

- Le MgCl₂ : il s'agit d'un cofacteur pour la Taq polymérase. Il est utilisé à une concentration stock de 50 mM.
- Les Amorces :
Sens : 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3' Anti sens : 5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'

✚ **Le contrôle des produits PCR** : les fragments cibles sont amplifiés par PCR. La conformité de la PCR, c'est-à-dire l'amplification spécifique du fragment et l'absence de contamination, est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5% (1.5 g d'agarose dans 100 ml de TBE 1X (Tris Borate EDTA) (Tris base 45 mM, Acide Borique 25 mM, EDTA 12,5 mM, pH 8) additionné de 10 µl du Bromure d'Ethidium (BET). Le gel est déposé sur une plaque d'une cuve horizontale.

Dans chaque puits du gel, nous déposons 10 µl de produits PCR en présence de 2 µl du Bleu de Bromophénol (BBP) qui permet de suivre le front de migration. Les fragments d'ADN chargés négativement migrent dans un champ électrique et la migration de la cathode et vers l'anode dépend de leurs tailles. Le système est soumis sous un courant de 60 à 100 volts pendant 30 à 45 mn.

Après la migration, le gel est soumis au rayon UV et photographié. Les molécules de BET s'intercalent entre les bases nucléotidiques de l'ADN et émettent une coloration rouge. Les fragments amplifiés sont visibles sous forme de bandes fluorescentes de même taille pour chaque gène. Ce contrôle permet de confirmer la bonne réussite de l'amplification aussi de vérifier si une éventuelle contamination de l'ADN est survenue grâce au contrôle négatif (apparition de bande dans le puits du blanc).

✚ **Digestion des produits de PCR** : Les produits de la PCR sont soumis à une digestion enzymatique par l'enzyme de restriction *HinfI*. Pour cela nous préparons une quantité d'un mix pour digestion selon le nombre des amplifications à être digérés + 1. Ce mix contient un tampon, H₂O, l'enzyme de restriction *HinfI* et la BSA (Bovine serum albumine) (Annexe7). Nous prenons 10 µl du mix pour digestion et 30 µl du produit de PCR. Le tout est incubé pendant une nuit dans une étuve à 37°C. Après incubation nous concentrons les ADN digérés au speed-vac (System ISS 40-SAranta) pendant quelques minutes.

✚ **Electrophorèse des produits de la digestion**

Patients et méthodes

Les fragments d'ADN digérés par l'enzyme de restriction *HinfI* sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 3% (3g d'agarose + 100ml du TBE1X) (annexe 8). Le gel est visualisé grâce à l'addition du Bromure d'Ethidium BET (10µl), réactif intercalant qui se fixe entre les bases nucléiques à l'intérieur de la double hélice et qui rendra les ADN fluorescents par exposition aux UV, en plus du colorant bleu (3µl) qui sert à marquer le front de migration. Nous déposons dans chaque puit du gel qui est déposé sur une cuve horizontale, le produit digéré après speed vac (12-14 µl) et 3 µl du bleu de Bromophénol. La migration se fait en parallèle avec des fragments d'ADN appelés marqueurs de taille (leurs tailles est connues).

La migration des fragments d'ADN dépend de leurs tailles : plus le fragment a une grande taille, moins la migration électrophorétique par rapport au puits d'inclusion est importante. A l'inverse des fragments de petite taille ont une distance de migration plus élevée. Lorsqu'on obtient une nette séparation des différents fragments du marqueur de taille, le gel est photographié après transillumination aux UV.

Les fragments d'ADN obtenu seront de :

- 198 pb en cas d'absence de la mutation et les fragments d'ADN amplifiés et digérés apparaissent sur le profil électrophorétique sous forme d'une seule bande qui correspond au type homozygote sauvage (CC).
- 175 pb s'il y a mutation et les fragments d'ADN apparaissent sur le profil électrophorétique sous forme d'une seule bande qui correspond au type homozygote muté (TT).
- les deux bandes ensemble de 175 pb et 198 pb, correspondent au type hétérozygote (CT).

Patients et méthodes

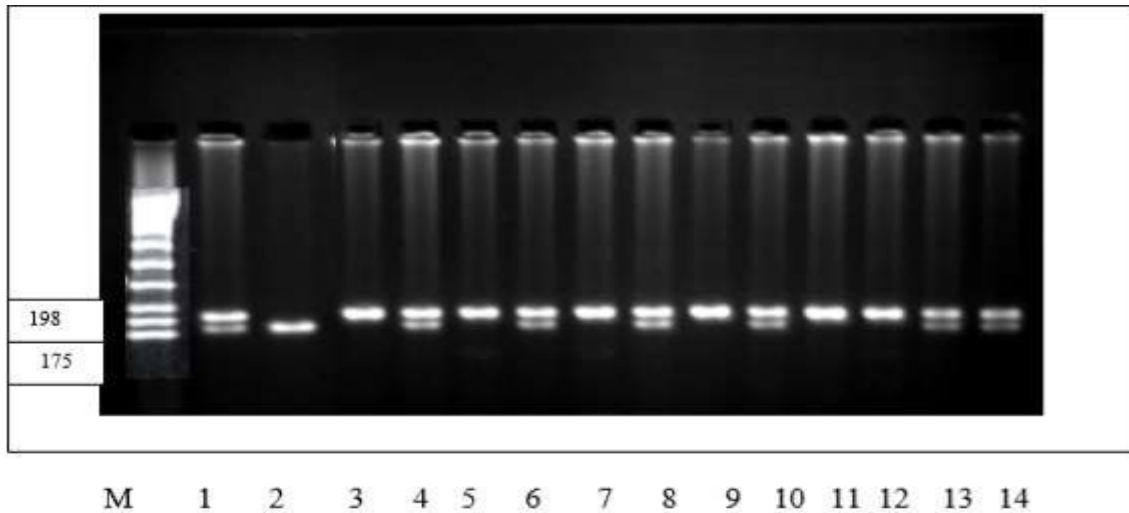


Figure 15 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments issus par clivage de *HinfI* présentant différents génotypes de l'*MTHFR*

2. Analyse statistique :

Dans notre travail, nous avons effectué une étude statistique d'association entre le polymorphisme C677T de la *MTHFR* et le cancer du sein. L'étude statistique est basée sur l'OR (Odds Ratio) et la *P* value; 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 témoins. Elle a été réalisée par le logiciel Epi info 7.1

• Calcul de l'or :

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

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

Tableau 1 : Tableau de contingence

	Patients	Témoins	Total
Exposé	A	B	a+b
Non exposé	C	D	c+d
Total	a+c	b+d	a+b+c+d

L'OR est calculé comme suit: $OR = a*d / b*c$

Patients et méthodes

- ***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.

RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Résultats et discussion

1. Répartition de la population d'étude

Nous avons recruté 52 sujets répartis comme suit :

- 26 malades atteintes du cancer du sein
- 26 témoins présumés saines

1.1 Répartition selon les tranches d'âge :

Notre échantillon, est subdivisé selon des tranches d'âge de 10 ans (tableau 5).

Tableau 5 : la répartition selon les tranches d'âge.

Age	Cas		Témoins	
	n	%	n	%
[25-34]	3	11,54	3	11,54
[35-44]	8	30,77	10	38,46
[45-54]	9	34,61	5	19,23
[55-64]	6	23,08	8	30,77

n : nombre , **%** : fréquence

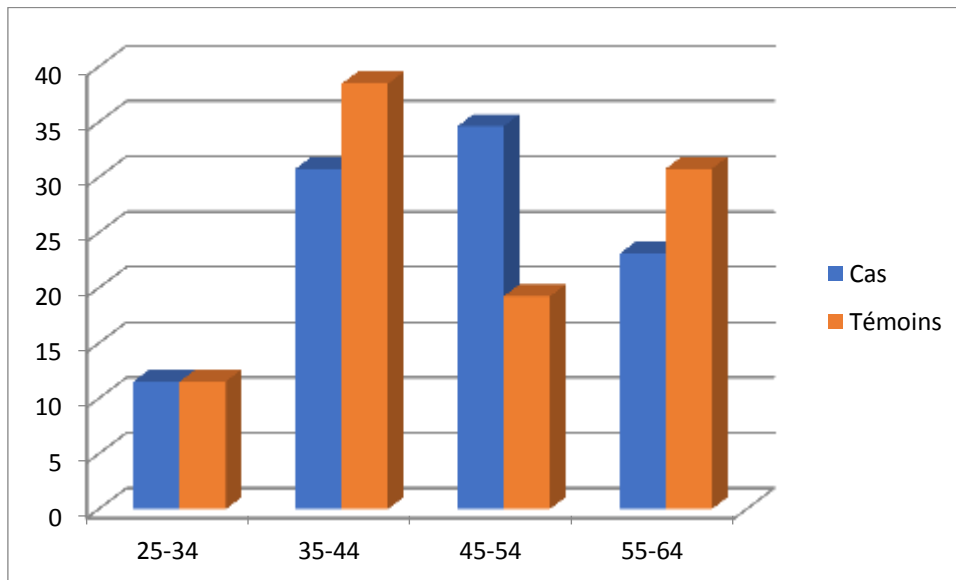


Figure 16 : répartition de la population d'étude selon la tranche d'âge

RESULTATS ET DISCUSSIONS

L'âge moyen de la population témoin est de $45,56\% \pm 9,76$ ans avec des extrêmes de 25 à 60 ans. 11,54% (3 témoins) ont un âge entre 25 et 34ans, 38,46% (10 témoins) ont un âge entre 35 et 44 ans, 19,23% (5 témoins) ont un âge entre 45 et 54ans et 30,77% (8 témoins) entre 55 et 64 ans.

L'âge moyen de la population malade est de $46,61 \pm 9,35$ ans avec des extrêmes de 25 à 60 ans. La tranche d'âge la plus touchée par le cancer du sein est celle allant de 45 à 54 ans soit 34,61% (9 cas), suivie d'une fréquence 30,77% (8cas) entre 35 et 44 ans, de 23,08% (6 cas) ont l'âge entre 55 et 64 et enfin 11,054% (3cas) entre 25 et 34ans.

Cette répartition en tranche d'âge révèle que la fréquence de cette lésion cancéreuse augmente considérablement avec l'âge et devient représentative à partir de l'âge de 45ans.

Des conclusions similaires en été retenu à travers des études menées chez les populations jeunes atteintes de cancer du sein [85-86-87]. Ces études considèrent l'âge comme un facteur de risque majeur de survenu de cette tumeur maligne [88]. Contrairement au pays développés, le cancer du sein en Algérie survient chez des femmes jeunes en âge de procréer [89].

Une étude menée par **El saghir Ns, Khalil MK, Eid T et al** [90], réalisé entre **1990** et **2000** concernant l'âge médian des patientes atteintes d'un cancer du sein dans les pays arabes a révélé que cette affection survient chez les femmes de moins de 50 ans. En **2010 Najjar H, Easson et al** [91] dans une publication de 28 articles consacrés au cancer du sein dans le monde arabe ont remarqué que cette maladie affecte les femmes dont la médiane d'âge est de 45,5 ans. Les deux tiers (65,5%) des patientes avaient moins de 50 ans.

1.2 Activité professionnelle :

La répartition des patientes en fonction de l'activité professionnelle révèle que la plupart des cas touchés par cette lésion cancéreuse étaient des femmes au foyer 76.47% des cas (13 sur 17 patientes), 23.53% sont des femmes qui travail. Dans la population saine, la fréquence de la catégorie qui travaille est de 55.56% (15 sur 26), contre de 44.44% des femmes au foyer.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Tableau 6 : répartition de la population d'étude selon l'activité professionnelle.

FONCTION	MALADES	TEMOINS
Oui	23,53 %	44,44%
Non	76,47%	55,56%

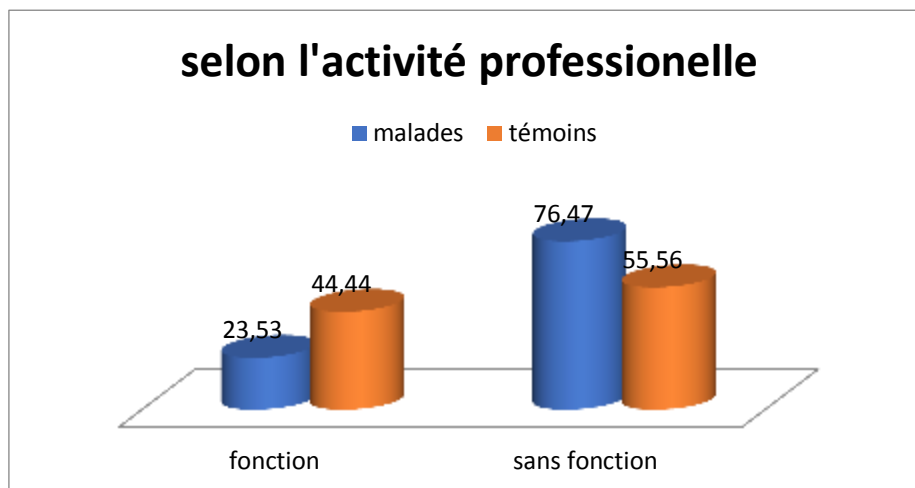


Figure 17 : répartition des cas-témoins selon l'activité professionnelle.

La sélection des cas-témoins dans notre étude était aléatoire, le pourcentage de la catégorie non active est supérieur à 50% dans les deux populations, alors que le pourcentage de la catégorie active ne représente que 44,44% dans la population malade et 23.53% pour les témoins. L'étude d'incrimination de ce facteur sur cette population restreinte nous a apporté un résultat discordant avec l'étude de **Villeneuve et al** en 2011 [92] qui montre que dans la population française où les femmes qui exerce une activité professionnelle ont un risque plus élevé d'avoir le cancer du sein.

1.3 Statut matrimonial

L'analyse des données des 17 patientes sur 26 montre que le groupe des patientes mariées est dominant 88.24 % et 11.76% de nos patientes étaient célibataires.

L'analyse de la population témoins indique que le groupe des mariées est dominant sur le groupe des témoins célibataire respectivement 69% et 31%.

Tableau 7 : répartition de la population d'étude selon le statut matrimonial.

MARIEE	MALADES	TEMOINS
Oui	88.24%	69%
Non	11.76%	31%

RESULTATS ET DISCUSSIONS

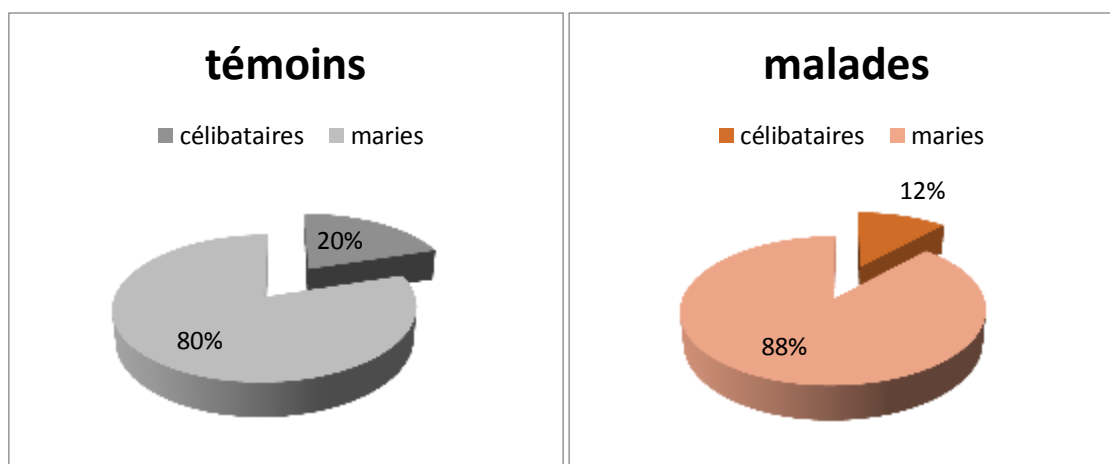


Figure 18 : répartition de la population d'étude selon le statut matrimonial

On conclut d'après ces données que le cancer du sein affecte plus les femmes mariées que les célibataires, nous n'avons pas trouvé une étude qui confirme cette hypothèse.

1.4 Antécédents familiaux :

La compilation des données à partir du questionnaire. Nous a permis de classer nos patientes selon la présence d'antécédents familiaux (Tableau 8), et les résultats rapportés par le graphe (figure 19) montrent que les antécédents familiaux de cancer ont été retrouvés dans 38,46% chez les témoins et 46,15% des cas.

Tableau 8 : la répartition des patients selon la présence d'antécédents familiaux.

Antécédents familiaux	PATIENTES		TEMOINS	
	n	%	n	%
Aucun	14	53.85	16	61.53
Oui	12	46.15	10	38.46

RESULTATS ET DISCUSSIONS

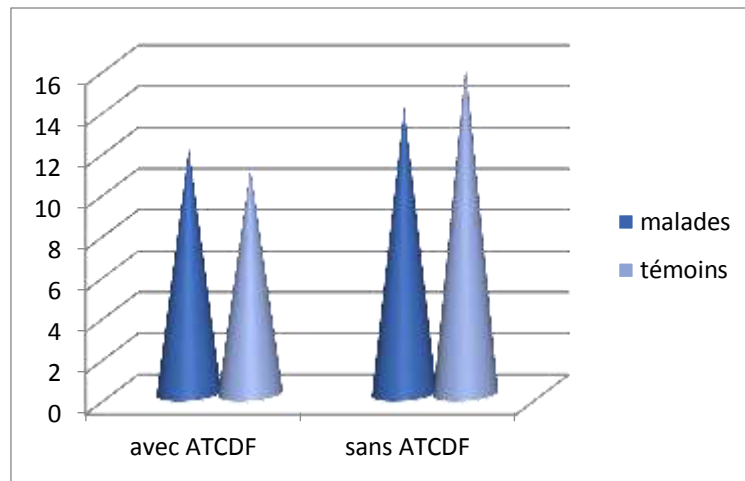


Figure 19 : répartition des cas-témoins selon les antécédents familiaux de cancer.

D'après nos résultats et le questionnaire effectués, on conclut que la plus part de nos patientes déclarent avoir des antécédents familiaux de 1^{er} degré (mère, sœur). Donc dans notre échantillonnage, l'antécédent familial de 1^{er} degré est le plus répandu. Ces résultats sont largement confirmés par **McPherson et al** ; En **2000**. Qui montre que les données relatives au ATCDF du cancer du sein dénotent que 34% des patientes avait au moins un ATCD du cancer mammaire au 1^{er}, 2^{ème} ou 3^{ème} degré se qui représentent un facteur de risque majeur de cette maladie [88]. Ce constat n'est pas similaire à celui rapporté par **Slaoui et al** en **2016** [93].

D'autre part, une autre analyse menée par **M.S. Diallo et al** en **1996**, indique que des antécédents familiaux de cancer au premier degré ont été retrouvés dans 46,15% des cas, 50% de ces derniers sont représentés par le cancer mammaire. Ces résultats ne sont pas compatibles avec ceux de la littérature où la fréquence du cancer du sein familial est de 5-10%.

Selon **Mc Pherson et al 2000**, les ATCD d'une maladie mammaire bénigne, les données révèlent que 23% des patientes avaient les lésions mammaires non cancéreuses, elles sont considérées comme contributeur potentiel de l'augmentation ultérieure du risque d'apparitions des lésions mammaires cancéreuses [87].

1.5 Antécédents personnels :

L'enquête sur les ATCD personnels dévoile que 100% de nos patientes n'avaient pas des ATCD personnels, par ailleurs, 18,52% des témoins avaient des atteintes comme : HTA, diabète et la migraine.

2. Etude transversal des patientes

2.1 Répartition des patientes selon la Localisation de la tumeur :

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Chez 13 patientes, il s'agit d'une lésion cancéreuse du sein droit, et 12 patientes d'une lésion cancéreuse au niveau du sein gauche, sans compter qu'un cancer du sein bilatéral a été diagnostiqué chez une seule patiente (figure 20).

Tableau 9 : Répartition des patientes selon la localisation de la tumeur.

Localisation de la tumeur	Effectifs	Fréquence
Sein gauche	12	46%
Sein droit	13	50%
Sein bilatéral	1	4%

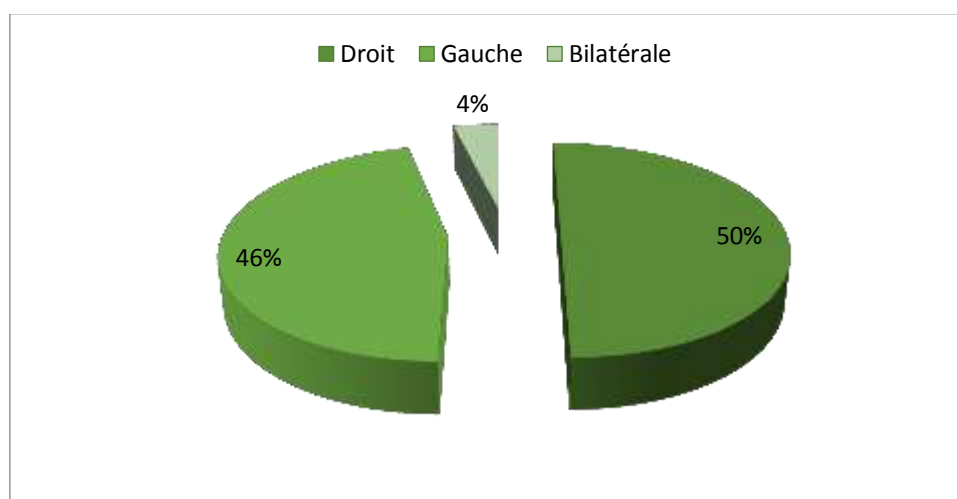


Figure 20 : Répartition des patientes selon la localisation de la tumeur.

Les résultats de notre analyse montrent que la répartition des sujets malades selon la localisation de la tumeur a montré que le sein gauche est touché avec une fréquence de 46% et le sein droit de 50%, alors que le cancer du sein bilatéral est d'une fréquence de 4%.

Selon **Perkins CL et al** en **2004**, après une étude de 935. 419 incidents du cancer du sein unilatéral de 26 registres de cancer (1994-1998). Basés sur la population qui couvre 40% de la population des Etats-Unis, ils ont observé que le cancer du sein a d'environ 5% plus de chance d'être diagnostiqué dans le sein gauche que le sein droit [95]. C'est ce qui a été réfuté par une étude Islandaise effectuée sur 2139 cas de femmes atteintes d'un cancer du sein sur une période de 40 ans allant de 1948 à 1987. Une prédominance au niveau du sein droit de 49% et 44,04% pour le sein gauche [96]. Ces dernières sont compatibles avec nos résultats.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

2.2 Autopalpation :

17 patientes de notre échantillonnage, ont confirmé cette information. 70,59% (12 cas) n'ont jamais fait une autopalpation tandis que 29.41% l'ont faite (tableau 10)

Tableau 10 : répartition des cas selon l'autopalpation

Autopalpation	Fréquence	Pourcentage
Oui	5	29.41
Non	12	70.59
Total	17	100

Selon notre enquête la découverte précoce du cancer du sein a été faite grâce à l'autopalpation. Mais nous n'avons pas trouvés une analyse qui confirme cette conclusion.

2.3 Dépistage :

D'après la population qui englobe 26 patientes, seulement 17 entre elles ont précisées cette information. 35.26% parmi elles ont effectué une mammographie, alors que la plupart (64.71%) ne l'ont pas fait.

D'après ces résultats et les informations que nous avons eues à la clinique el Nakhil, on estime que les femmes qui ont fait un dépistage, ont un bénéfice sur la réduction de la mortalité par cancer du sein. Ce résultat est cohérent avec celui de **Hill et al en 2014**, qui ont réalisé une analyse par lequel ils ont conclu qu'il peut y'avoir une diminution jusqu'à 30% du risque du cancer du sein. Egalement, ils dévoilent que le dépistage du cancer du sein est plus utile que dommageable, mais le bénéfice n'est pas énorme et ce n'est pas une folie que de le refuser [97].

2.4 L'âge de la puberté :

Cette information a été précisée chez 17 patientes sur 26, l'âge des premières règles est en moyenne de 12,05 ans, avec une étendue allant de 10 à 16 ans. La majorité des femmes, soit une fréquence de 35.29% ont eu leur premier cycle à l'âge de 13 ans (tableau 11).

Tableau 11 : Répartition des patientes selon l'âge de la ménarche

Age	10	11	12	13	14	15	16
fréquence	23,52%	17,65	11,76%	35,29%	5,88%	0%	5,88%

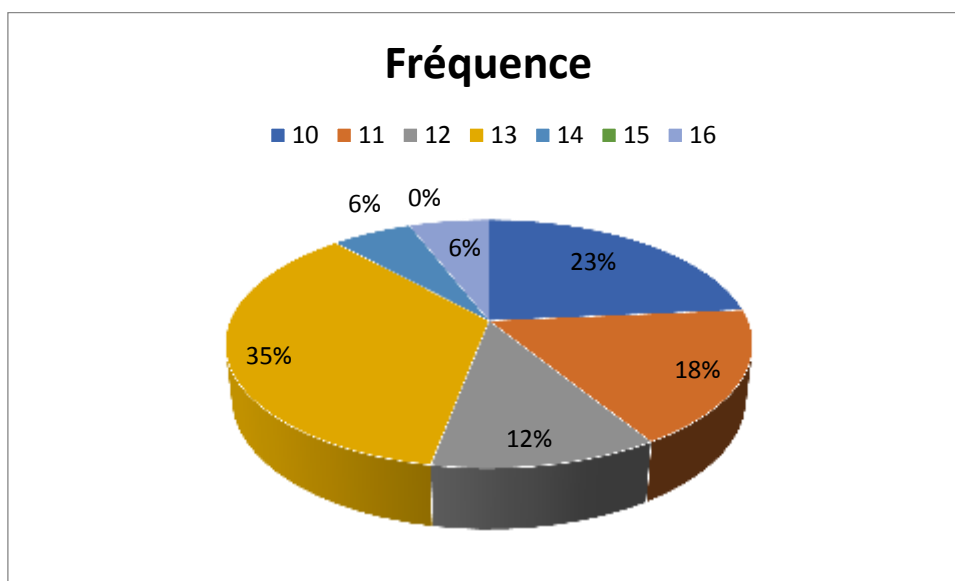


Figure 21 : répartition des patientes selon l'âge de la ménarche

23,52% de nos patientes avaient eu leur première menstruation à l'âge de 10 ans. Alors que la majorité (35,29%) à 13 ans et 5,88% avaient une ménarche tardif à l'âge de 16ans.

On conclu d'après notre population d'étude que les femmes qui ont leur première menstruation à l'âge de 13ans sont les plus sujettes au cancer. Mais cela n'est pas compatible avec la plus part des études qui ont montrées qu'une ménarche précoce ou tardive est parmi les facteurs bien établi liée au risque de survenu du cancer mammaire [98]. Une autre étude indique que le fondement biologique de cette association correspond à l'exposition précoce et prolongée de l'imprégnation hormonale qui existe durant la période d'activité ovarienne. Cette exposition est considérable lorsque les cycles menstruels sont réguliers [99].

2.5 l'âge de la première grossesse

Dans notre série 14 patientes ont eu une grossesse. L'âge moyen de la première grossesse est de 24 ,41ans . La plus part d'entre elles avaient eu leur grossesse entre 26 à 30ans (57,14%), et entre 21 à 25% (21,42%), suivie de 7,14% pour les tranches d'âges suivante 15 à 20ans, 36 à 40 ans, 41 à 45 ans (figure22). Dans 46,15% des cas nos patientes étaient nullipares.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

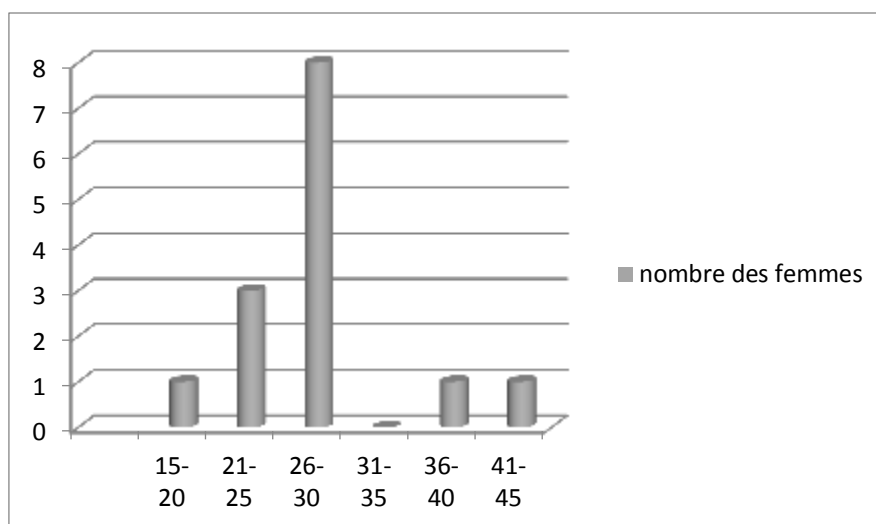


Figure 22 : répartition selon l'âge de la première grossesse.

Les résultats indiquent que les femmes qui ont eues leur première grossesse entre 26 à 30 ans sont plus prédisposées au risque du cancer, ce résultat n'est pas compatible avec l'étude de **Layde PM et al**, qui montrent que les femmes qui ont menée au moins une grossesse à terme avant l'âge de 30ans présentent en moyenne un risque de cancer du sein diminué de 25% par rapport aux femmes nullipares. L'effet protecteur est proportionnel au nombre d'accouchement. Les femmes qui ont eu de huit à neuf accouchements présentent des risques d'environ 30%, en comparaison avec celles qui ont eu cinq accouchements [100]. Selon d'autre étude une première grossesse tardive et la nulliparité sont parmi les facteurs bien établis liés au risque de survenue du cancer du sein [101-102].

2.6 Type histologique :

Dans la population d'étude le carcinome canalaire infiltrant (CCI) représente le type histologique le plus fréquent avec un pourcentage de 92% suivie par le carcinome lobulaire infiltrant (CLI) de 4% et carcinome canalaire infiltrant in situ de 4% (figure 23).

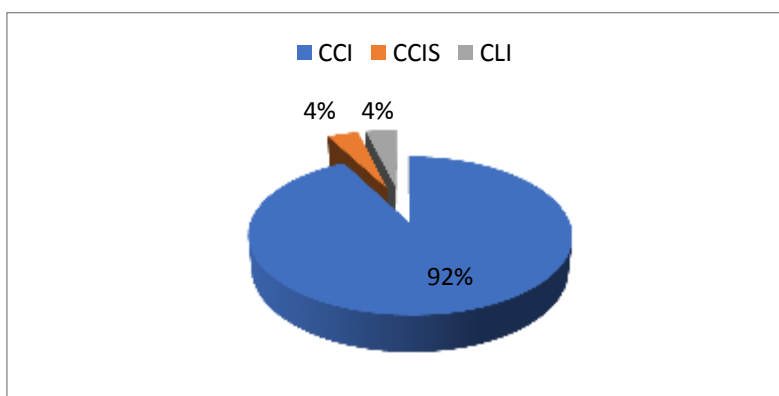


Figure 23 : Répartition des patientes selon le type histologique.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Les résultats de notre étude sont compatibles avec ceux de l'étude Britannique réalisée par **Gillian KREEVERS** et al en **2006**. Incluant 11869 femmes atteintes d'un cancer du sein, recrutées entre 1999-2001, le CCI représentait 64.46% [103]. Ces résultats sont concordants avec l'étude de l'institut de cancer de Dakar, où la fréquence de CCI était de 48,45% sur un échantillon englobant 161 femmes atteintes du cancer du sein [104].

2.7 le grade histologique :

Selon les données analysées, la quasi-totalité des tumeurs étaient de mauvais pronostics avec une dominance du grade III de SBR représentant 53,84%.

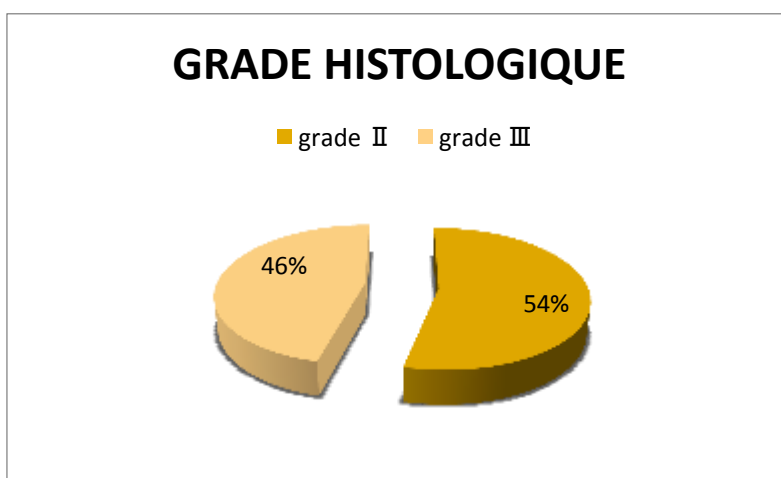


Figure 24 : répartition des cas selon le grade histologique.

D'après les données analysées, les caractéristiques tumorale de cette lésion cancéreuse, montrent que le cancer du sein est un cancer agressif et de mauvais pronostic, où la majorité des tumeurs sont le plus souvent de présentation localement avancé (stade II : 46,16% de cas), de stade histopronostic défavorable (stade III: 53,84% de cas), avec une dissémination métastatique au diagnostic. Ce qui en est accord avec la littérature [93-105-106].

2.8 Le type de traitement :

La figure ci-dessus représente la répartition des cas selon le type de traitement. La plus part d'entre elles (70.59%) ont subi une ablation totale du sein (mastectomie), 23.53% ont reçu une chimiothérapie.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

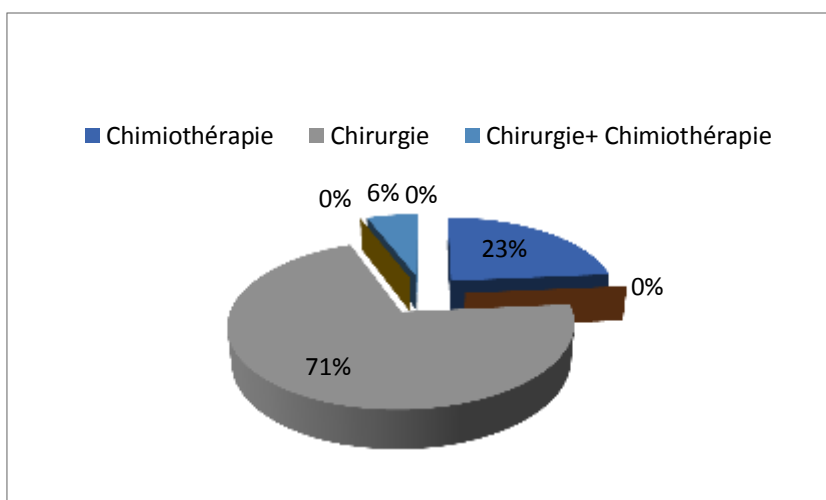


Figure 25 : répartition des malades selon le type de traitement.

Presque la totalité de nos patientes ont subi une chirurgie radicale qui est considérée comme le traitement le plus recommandé et efficace pour éliminer un très grand nombre des cellules cancéreuses.

3. Etude analytique des profils génotypiques et alléliques du polymorphisme C677T du gène *MTHFR* :

Notre analyse moléculaire vise à rechercher une éventuelle association entre le polymorphisme C677T du gène *MTHFR* et le cancer du sein.

- **Répartition des fréquences génotypiques du polymorphisme C677T de la *MTHFR* :**

Les fréquences génotypiques ont été calculées pour les malades et les témoins (Tableau 12) (Figure 26).

Tableau 12: répartition des fréquences génotypiques du polymorphisme C677T du *MTHFR*

		Patientes		Témoins	
		N°	%	N°	%
Fréquences génotypiques	677CC	17	73,92	21	80,77
	677CT	3	13,04	3	11,54
	677TT	3	13,04	2	7,69

RESULTATS ET DISCUSSIONS

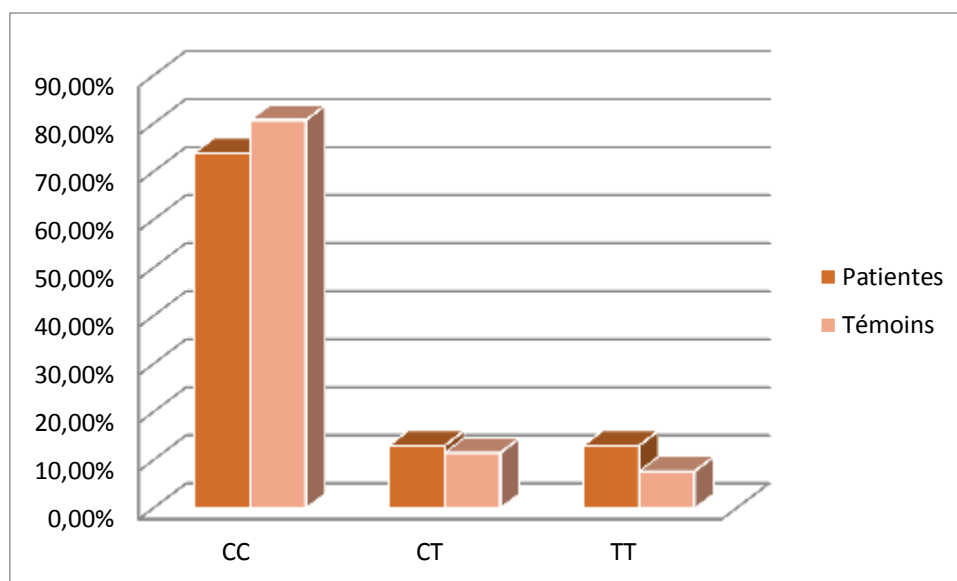


Figure 26 : fréquence génotypique de C677T du *MTHFR* chez les malades et les témoins

La distribution des fréquences génotypiques du polymorphisme C677T du *MTHFR* montre que le génotype (CC) est plus fréquent dans les deux populations (patients et témoins), avec une fréquence génotypique de 74% dans la population malade et 80% dans la population saine. Pour le génotype (CT), il est de 13,04% chez les malades et 11,54% chez les témoins, et TT de 13,04% chez les patientes et 7,69% chez les témoins. En effet les fréquences génotypiques du polymorphisme C677T de la *MTHFR* des témoins sont très variables selon les différents groupes ethniques [107].

En Europe, la fréquence du génotype TT est faible au Nord de 4 à 7%. En Finlande et en Russie, intermédiaire de 8% à 10% en France et 12 à 15% en Espagne ce qui compatible avec notre résultat et au nord d'Italie et élevé au sud 20 à 26% en Sicile. Un gradient similaire a été trouvé en Amérique du nord, où la fréquence du génotype T/T augmente de l'ouest de Canada (Alberta) au sud-est des Etats-Unis, pour atteindre un pic au Mexique (tableau 13) [107]. Ce rapport est similaire à celui retrouvé en Turquie, Tunisie, en France et est très différent de celui retrouvé en Mexique et en Italie [107]. Alors qu'un très faible pourcentage chez les Afro-Américains est retrouvé [108]. Parmi les 102 malades Afro-Américains, **MC Andrew et al** [109], n'ont retrouvé aucun cas d'homozygotie TT. **Adjalla et al** ont rapporté une fréquence de 0.8% du variant génotypique TT dans la population noire issue de l'Afrique de l'ouest [110].

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Tableau 13 : Les fréquences génotypiques dans différent pays et groupes ethniques

pays	Fréquence génotypique		
	T/T	C/T	C/C
Bretagne	12.1	47.2	40.7
London	13.7	39.1	37.2
Rotterdam	7.0	48.0	45.0
France	9.77	52.6	37.6
Nord de l'Italie	21.00	47.0	32.0
Centre de l'Italie	30.2	45.3	24.5
Sud de l'Italie	18.7	51.3	30.0
Yémen	2.2	30.4	67.4

- Répartition des fréquences alléliques du polymorphisme C677T du *MTHFR*

Tableau 14 : Répartition des fréquences alléliques du polymorphisme C677T du *MTHFR*

		Patientes		Témoins	
		N°	%	N°	%
Fréquences alléliques	C	37	80.83	45	85.19
	T	9	19.57	7	14.81

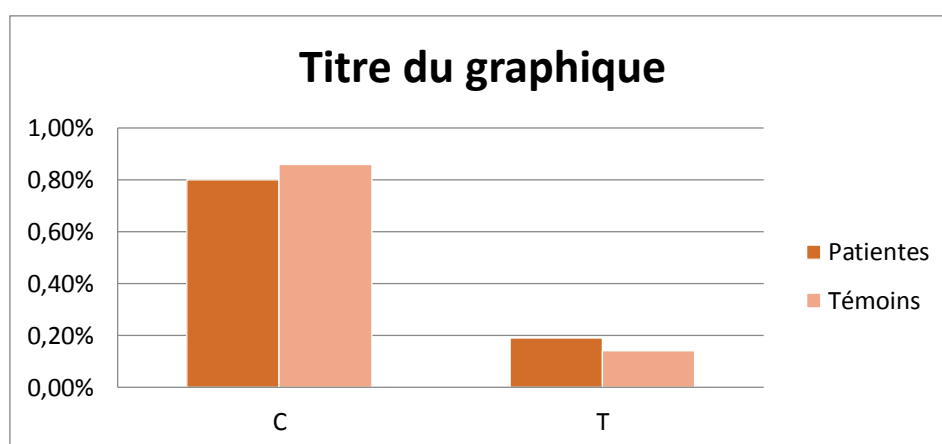


Figure 27 : répartition des fréquences alléliques du polymorphisme C677T du *MTHFR*

RESULTATS ET DISCUSSIONS

On distingue que les fréquences alléliques sont presque similaires chez les deux populations, et la fréquence de l'allèle C est plus importante que celle de l'allèle T.

La fréquence de l'allèle C est de 86% chez les témoins et est de 80.5 % chez les cancéreux, Cependant l'allèle T présente une proportion de 14% chez les témoins et de 19.5 % chez les cancéreux.

Les fréquences alléliques chez nos malades sont presque similaires à ceux trouvés dans la population asiatique (tableau 15) [107].

Tableau 15 : les fréquences alléliques dans différents pays et groupes ethniques.

Pays	Fréquences alléliques	
	Allèle T	Allèle C
Inde du nord	18.7%	81.2%
Nord de la chine	44.2%	55.8%
Marroco	33%	63.7%
Italiés	36.3%	63.7%
Moyen-Orient	25.7%	74.3%
Brésil et Etats-Unis	1%	99%
Tunisie	18%	82%
Population asiatique	82%	18%
Population indienne	56%	44%

- **Odds ratios des différents paramètres étudiés en analyse uni-variée**

Des Odds ratios ont été calculés à la recherche d'une relation épidémiologique entre le polymorphisme C677T de la *MTHFR* et la survenue du cancer du sein (tableau 16)

Tableau 16 : Odds ratios du polymorphisme C677T de la *MTHFR*

Paramètres	Odds ratios	Intervalle de confiance IC 95%	p
Polymorphisme 677C/T de la MTHFR			
-TT vs CC	1.85	0.21-18.33	NS (0.52)
-TT+CT vs CC	1.24	0.28-5.44	NS (0.75)

NS : non significative

Le calcul de l'odds ratio et de la p-value ne montre aucune corrélation entre le polymorphisme C677T du *MTHFR* et le cancer du sein (Tableau 16).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Nos résultats sont en accord avec celle de **Christina Justenhoven** et al **2004** qui ont mené une étude sur une population de 1412 sujets, 688 patientes atteintes d'un cancer de sein et 724 témoins et ont montré qu'il n'y avait pas une différence pour les hétérozygote CT et les homozygote TT. Cette étude n'a pas retrouvé de relation entre le polymorphisme C677T de la *MTHFR* et risque de survenue du cancer du sein [111]

Néanmoins, de nombreuses études divergent avec nos résultats : **L. He et Y. Shen, 2017** ont réalisés une méta-analyse de 19260 patientes et 26364 contrôles en Asie. Cette méta-analyse a montré que la mutation *MTHFR* 677CT, pourrait augmenter le risque du cancer du sein en particulier chez les asiatiques [112]. également d'après les résultats d'une méta-analyse effectué par **Kaya et al ; 2016**, une association modérément significative à été montrée entre le polymorphisme C677T et cancer du sein (T contre C : OR= 1.08, IC à 95% =1.03-1.13, $p= 0.001$, TT+CT par rapport à CC : OR = 1.06, IC à 95% =1.02-1.09, $p=0.001$, TT vs CC : OR= 1.17, IC à 95% = 1.06- 1.28, $p= 0.001$, CT vs CC : OR= 1.05, IC à 95% =1.01-1.08, $p= 0.005$, TT vs CT+CC : OR= 1.12, IC à 95% = 1.03-1.22, $p=0.002$) [113].

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion :

L'identification des gènes de prédispositions dans les maladies complexes comme le cancer est un défi pour la génétique,

Depuis la découverte en 1995 de la mutation C677T du gène *MTHFR*, de nombreuses études ont permis de mieux comprendre les relations complexes existant entre les polymorphismes de la *MTHFR* et la cancérogenèse mammaire.

Notre travail de recherche a pour objectif de prospecter d'éventuelles corrélations entre le polymorphisme C667T du gène de la *MTHFR* et le cancer du sein. L'exploration génotypique du polymorphisme 677C>T de la *MTHFR* de 26 patientes et 26 témoins, ainsi que les fréquences alléliques, indiquent que ce dernier ne semble pas être impliqué dans l'apparition du cancer du sein. Néanmoins, l'effectif de notre population est faible, ceci ne nous permet pas d'apporter des résultats formellement concluants. Seul une étude de cohorte avec un suivi prospectif permettrait d'établir une relation entre ce polymorphisme et le cancer du sein.

Perspectives :

Les résultats obtenus, laissent entrevoir de nombreuses perspectives, il serait donc intéressant de continuer ce travail introductif par :

- Une analyse moléculaire sur une population plus large afin de pouvoir tirer des conclusions cohérentes sur l'association du polymorphisme 677C>T de la *MTHFR* et le cancer du sein,
- L'intégration de l'étude d'autres gènes de susceptibilité
- L'analyse d'autres variants du gène *MTHFR* et leurs implications dans le cancer du sein, tels que le variant A1298C, ainsi que l'implication des facteurs de risques environnementaux de susceptibilité au cancer mammaire.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Référence bibliographique

- [1] **M. Waseem et al.**, « Association of *MTHFR* (C677T) Gene Polymorphism with Breast Cancer in North India », *Biomark. Cancer*, vol. 8, p. BIC.S40446, janv. 2016.
- [2] **S. Pooja et al.**, « MTHFR 677C>T Polymorphism and the Risk of Breast Cancer: Evidence from an Original Study and Pooled Data for 28031 Cases and 31880 Controls », *PLoS ONE*, vol. 10, n° 3, mars 2015.
- [3] **E. F. Kaya, N. Karakus, A. N. Ulusoy, C. Özaslan, et N. Kara**, « Association of the MTHFR Gene C677T Polymorphism with Breast Cancer in a Turkish Population », *Oncol. Res. Treat.*, vol. 39, n° 9, p. 534-538, 2016.
- [4] **S. S. Maruti, C. M. Ulrich, E. R. Jupe, et E. White**, « MTHFR C677T and postmenopausal breast cancer risk by intakes of one-carbon metabolism nutrients: a nested case-control study », *Breast Cancer Res. BCR*, vol. 11, n° 6, p. R91, 2009.
- [5] **MEDJDOUB, Asmahane.** « Etude des lésions histologiques et du profil d'expression De la protéine HER2 dans 47 cas de cancer mammaires. », thèse, Université d'ORAN ES-SENIA, 2007.
- [6] **N. Elaine. Marieb**, *Biologie humaine : principes d'anatomie et de physiologie*, 8e éd. PARIS: Pearson Education, 2008.
- [7] **M. Grousin-Weyland**, « 14-physiologie de la lactation, in sortie de maternité et Retour à domicile du nouveau-né », J.-M. Hascoët et P. vert, Ed. Paris : Elsevier Masson, 2010, p.91-95.
- [8] **Wainsten Jean-Pierre**, le Larousse Médical, 5^{ème} Edition, Larousse, Paris, PP.865-867, ISBN 978-2-03-5 (2009).
- [9] **Whaeter, P.R, Burkitt, H.J, Daniels, V.G.** (1979). *Histologie fonctionnelle Manuel et Atlas* 2^{ème} édition Medsi/Mc Graw-hill.
- [10] **ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F.** GLOBOCAN 2012, version 1.0. Cancer incidence and mortality worldwide : IARC Cancer Base No. 11. Lyon, France : International Agency for Research on Cancer, 2013.
- [11] « GLOBOCAN Cancer Fact Sheets: Breast cancer ». [En ligne]. Disponible sur: <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/breast-new.asp>. [Consulté le: 11-mars-2018].
- [12] **M. Hamdi-Cherif et al.**, « Le cancer à Sétif, Algérie, 1986–2010 », *J. Afr. Cancer Afr. J. Cancer*, vol. 6, n° 3, p. 166-173, août 2014.
- [13] **Puddu et Tafforeau**, (2005) *Anatomie et physiologie humaine*, Adaptation de la 8^{ème}

Référence bibliographique

- Edition américaine, Nouveaux horizons, paris, pp.1215-1217, ISBN :978-2-35745-080-6.
- [14] **TARDIVON A., MALHAIRE C.** Cancer du sein (I). Epidémiologie, facteurs de risque, imagerie, Encycl Med Chir (Elsevier SAS, Paris), 2009, vol. 34-8000-A-40.
- [15] **L. C. Hartmann et al.**, « Benign breast disease and the risk of breast cancer », *N. Engl. J. Med.*, vol. 353, no 3, p. 229- 237, juill. 2005.
- [16] **Mombellis S.** « Cancers du sein et Immunologie anti-tumorale ». Université De Reims Champagne-Ardenne. Thèse de doctorat. 2014 :26.
- [17] **IPERRY N M, 2004**, Breast cancer screening :The European experience, *international journal of fertility and women 's medicin*, 49, n° 5, 45.
- [18] **Ferge D, Georges C, Ducros A, Deranlot J.** Sémiologie médicale. Université Paris Diderot-Parsi 7.2012
- [19] **John P. A. Ioannidis**, « Is Molecular Profiling Ready for Use in Clinical Decision Making? », *The Oncologist*, Vol. 12, n° 3, p.301-311, Janv.2007.
- [20] **Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Aklen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D.** « Molecular portraits of human Breast tumours » .2000 ; 406 :747-752.
- [21] **P.-J. Lamy, G. Romieu, P. Rouanet, et W. Jacot**, « Classification moléculaire des cancers du sein : utilité en clinique », *Médecine Nucl.*, vol.34, n°1, p.32-43, Janv.2010.
- [22] **Cabarrot E.**2000. Histoire naturelle des cancers du sein. Encyclopédie MédicoChirurgicale. Editions scientifiques et médicales Elsevier SAS, Paris. Gynécologie, 865A-104
- [23] **Peter T Simpson ; Jorge S Reis-Filho ; Theodora Gale ; R Lakhani**, 2005, « Molecular evolution of breast cancer, the Journal of pathology », 205, n°2, 248-254.
- [24] **A. Gonçalves**, « Chimiothérapie néo-adjuvante des cancers du sein HER2-positifs et triple-négatifs », *Bull. Cancer (Paris)*, vol. 103, n° 6, Supplement 1, p. S76- S89, juin 2016.
- [25] **M. Laé et al.**, « Can c-myc amplification reliably discriminate postradiation from primary angiosarcoma of the breast? », *Cancer/Radiothérapie*, vol. 19, n° 3, p. 168- 174, mai 2015.
- [26] **S. Kar**, « Unraveling Cell-Cycle Dynamics in Cancer », *Cell Syst.*, vol. 2, n° 1, p. 8- 10, janv. 2016.

- [27] **BUYRU Nur, TIGLI Nur, DALAY Nejat**, 2003. « p53 codon 72 polymorphism in breast cancer », *oncology report*, 10, n°3:711-714.
- [28] **Y. Liu, C. Deisenroth, et Y. Zhang**, « RP-MDM2-p53 Pathway: Linking Ribosomal Biogenesis and Tumor Surveillance », *Trends Cancer*, vol. 2, n° 4, p. 191-204, avr. 2016.
- [29] **V. Viassolo, A. Ayme, et P. O. Chappuis**, « Cancer du sein : risque génétique », *Imag. Femme*, vol. 26, n° 2, p. 95- 104, juin 2016.
- [30] **Fritz G, Brachetti C, Bahlmann F, Schmidt M, Kaina B**: « Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters ». *Br J Cancer* 2002, 87(6):635-644.
- [31] **Feinberg AP, Tycko B**: « The history of cancer epigenetics ». *Nat Rev Cancer* 2004, 4(2):143-153.
- [32] **Widschwendter M, Jones PA**: « DNA methylation and breast carcinogenesis ». *Oncogene* 2002, 21(35):5462-5482.
- [33] **M. Szyf, P. Pakneshan, et S. A. Rabbani**, « DNA methylation and breast cancer », *Biochem. Pharmacol.*, vol. 68, n° 6, p. 1187- 1197, sept. 2004.
- [34] **N. Aztopal, M. Erkisa, E. Erturk, E. Ulukaya, A. H. Tokullugil, et F. Ari**, « Valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, induces apoptosis in breast cancer stem cells », *Chem. Biol. Interact.*, vol. 280, p. 51-58, janv. 2018.
- [35] **N. Boule, L. Aurélien, M. Lapierre, et V. Cavallès**, « Histone désacétylases et signalisation estrogénique dans le cancer du sein », *Diabetes Nutr. Metab.*, vol. 15, janv. 2011.
- [36] **A.-L. Finoux et P. Chartrand**, « Micro-ARN : oncogènes et suppresseurs de tumeurs », *médecine/sciences*, vol. 24, p. 1049- 1054, déc. 2008
- [37] **N. Begam, K. Jamil, et G. S. Raju**, « Promoter epigenetics of APC gene and its implication in sporadic breast cancer patients from South Indian population », *Gene Rep.*, vol. 11, p. 255- 260, juin 2018.
- [38] **A. Shailani, R. P. Kaur, et A. Munshi**, « A comprehensive analysis of BRCA2 gene: focus on mechanistic aspects of its functions, spectrum of deleterious mutations, and therapeutic strategies targeting BRCA2-deficient tumors », *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.*, vol. 35, n° 3, p. 18, janv. 2018.
- [39] **I. Coupier et P. Pujol**, « Prédispositions héréditaires aux cancers gynécologiques », *Gynécologie Obstétrique Fertil.*, vol. 33, n° 11, p. 851-856, nov. 2005.

- [40] **A. Brédart et al.**, « Short-term psychological impact of the BRCA1/2 test result in women with breast cancer according to their perceived probability of genetic predisposition to cancer », *Br. J. Cancer*, vol. 108, n° 5, p. 1012-1020, mars 2013.
- [41] **H. Berment et al.**, « Prise en charge du cancer du sein : quel prélèvement pour quel traitement ? », *Imag. Femme*, vol. 25, n° 3, p. 182-188, sept. 2015.
- [42] **C.Hill**, « Dépistage du cancer du sein », *Presse Médicale*, vol.43,n°5, p.501-509, mai 2014.
- [43] **PDQ Screening and Prevention Editorial Board**, « Breast Cancer Screening (PDQ®): Patient Version », in *PDQ Cancer Information Summaries*, Bethesda (MD): National Cancer Institute (US), 2002.
- [44] **A.S.Jacobs et al.**, « Patient and Genetic Counselor Perceptions of In-person versus Telephone Genetic Counseling for hereditary Breast/Ovarien Cancer », *Fam. Cancer*, vol.15,n°4,p.529-539,Oct. 2016.
- [45] **LORENZO D., BOTTO D. , YANG Q.** 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) Gene Variants and Congenital Anomalies. *Epidemiol* (2000) May; 1;151(9):862-877
- [46] **B. Diakite, A. Tazzite, K. Hamzi, H. Juhadi, et S. Nadifi**,
« Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T polymorphism and breast cancer risk in Moroccan women », *Afr. Health Sci.*, vol. 12, n° 2, p. 204- 209, juin 2012.
- [47] **Guenther GD, sheppard CA, tranP, et al.** « the stucture and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from Escherichia coli suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteimia ». *Nature structural biology* 1999 ;6 :359-365
- [48] **Ueland PM, Rozen R (eds)**. « MTHFR polymorphisms and disease ». *Georgetown: Landes Bioscience/Eurekah.com*. 2005: 210 p.
- [49] **Igari S., Ohtaki A., Yamanaka Y., Sato Y., Yohda M et al.** « Properties and Crystal Structure of Methylenetetrahydrofolate Reductase from *Thermus thermophilus* HB8 ». *PLoS ONE*. 2011: 6(8), 1-13
- [50] **SAFFROY R., LEMOINE A., DEBUIRE B.** MTHFR (5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* (2005).
- [51] **L. He et Y. Shen**, « MTHFR C677T polymorphism and breast, ovarian cancer risk: a meta-analysis of 19,260 patients and 26,364 controls », *Oncotargets Ther.*, vol. 10, p. 227- 238, janv. 2017.

Référence bibliographique

- [52] **HOMBERGER A., LINNEBANK M., WINTER C., WILLENBRING H. et al.**
« Genomic structure and transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene ». *European Journal of Human Genetics*. 2000 ; **8**:725–729.
- [53] **Matthews R.G., Daubner S.C.** « Modulation of methylenetetrahydrofolate reductase activity by S-adenosylmethionine and by dihydrofolate and its polyglutamate analogues ». *Adv Enzyme Regul.* 1982 : 20, 123-131.
- [54] **Yamada K., Strahler J.R., Andrews P.C., Matthews R.G.** « Regulation of human methylenetetrahydrofolate reductase by phosphorylation ». *PNAS*. 2005 : 102(30), 10454–10459.
- [55] **Vahid P., Farnaz R., Zaker F., Farzaneh A., Parisa R.** « Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Polymorphisms and Risk of Myeloid Leukemia ». *LabMedicine*. 2010 : 41(8), 490-494
- [56] **Robien K., Ulrich C.M.** « 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and leukemia risk : a HuGE minireview ». *Am J Epidemiol*. 2003 : 157, 571-582.
- [57] **Gos M., Szpecht-Potocka A.** « Genetic basis of neural tube defects II ». *Genes correlated with folate and methionine metabolism. J. Appl. Genet.* 2002 : 43(4), 511-524.
- [58] **Yamanda K, Chen Z, Rozen R, and Matthews RG.** Effects of common Polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. *Proc Natl Acad Sci*. 2001; **98**: 14853-14858.
- [59] **Shahzad K., Hai A., Ahmed A., Kizilbash N., Alruwaili J.** « A Structured-based Model for the Decreased Activity of Ala222Val and Glu429Ala Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Mutants ». *Bioinformation*. 2013 : 9(18), 929-936.
- [60] **LAGROST L., MASSON D., CHAPMAN J.** : L'athérosclérose- physiopathologie : lipoprotéines et métabolisme lipidique. La Société française d'athérosclérose. Masson. Paris (2005).
- [61] **HERTUALA Y.S., PALINSKI W. ROSENFELD M.E, PARTHASARAT Y.**
Evidence for the presence of oxidatively modified LDL in human atherosclerosis lesions arteriosclerosis. (1989) **5,5** : 698.
- [62] **ROBIEN K. , CORNELIA M. , ULRICH C.** 5, 10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms and Leukemia Risk. *Epidemiol* (2003) 157 (7) :571-82.
- [63] **D. Leclerc et R. Rozen,** « Génétique moléculaire de MTHFR - Les polymorphismes ne sont pas tous bénins », *médecine/sciences*, vol. 23, n° 3, p. 297- 302, mars 2007.
- [64] **BLACHER J.** homocystéine, vitamines du groupe B et pathologies cardiovasculaires.

Référence bibliographique

- AIM N° 48(1998) 41-45
- [65] **FROSST P., ZHANG Z.X., PAI A., ROZEN R.** « The methylenetetrahydrofolate reductase (Mthfr) gene maps to distal mouse chromosome 4 ». *Mammalian Genome* (1996) **7**: 864-869.
- [66] **Selhub J, Miller JH.** « The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine ». *Am J Clin Nutr.* 1992; **55**: 131–138.
- [67] **Brattstrom L, Wilcken DE, Ohrvik J, Brudin L.** « Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis ». *Circulation.* 1998; **98**: 2520-6
- [68] **Jacques PF, Bostom A G, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, Selhub J, Rozen R.** « Relation Between Folate Status, a Common Mutation in Methylenetetrahydrofolate Reductase, and Plasma Homocysteine Concentrations ». *Circulation.* 1996; **93**: 7-9.
- [69] **Nelen WLD, Blom HJ, Thomas CMG, Steegers EAP, Boers GHJ, Eskes TKAB.** « Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism affects the change in homocysteine and folate concentrations resulting from low dose folic acid supplementation in women with unexplained recurrent miscarriages ». *J Nutr.* 1998; **128**: 1336–1341.
- [70] **O’Leary, Daly L, Murray S, Conley M, Mayne P, Kirke OPN, Mills JL, Molloy AM, Brody LC, Smith VB and Scott JM.** Impact of the MTHFR C677T polymorphism on risk of neural tube defects: case control study. *BMJ.* 2004; **328**: 1535-1536.
- [71] **Eskes TK .** « Abnormal folate metabolism in mothers with Down syndrome offspring: Review of the literature ». *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005; **124**: 130 – 133.
- [72] **Blom H.J., Shaw G.M., Den Heijer M., Finnell R.H.** « Neural tube defects and folate: case far from closed ». *Nat Rev Neurosci.* 2006 : 7(9), 724-731.
- [73] **CASSANDRA L. , KNIFFIN A.** 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase; mthfr. omin (2002).
- [74] **GOYETTE P., PAI A., MILOS R., FROSST P., TRAN P., CHEN Z., CHAN M., ROZEN R.** « Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) ». Springer New York (2004).
- [75] **Klerk M, Verhoef P, Clarke R, Blom HJ, Kok FJ, Schouten EG;** « MTHFR Studies Collaboration Group. MTHFR 677C-->T polymorphism and risk of coronary heart disease: ameta-analysis ». *JAMA.* 2002;288(16):2023-3 1.

Référence bibliographique

- [76] **WEISBERG I., TRAN P., CHRISTENSEN B., SIBANI S., ROZEN R.** A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* (1998) **64**:169-72.
- [77] **GOYETTE P., SUMNER J., MILOS R., DUNCAN A., ROSENBLATT D., MATTHEWS R., ROZEN R.** Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nature Genet* (1994) **7**: 195-200.
- [78] **KLUIJTMANS L., WENDEL U., STEVENS E., VAN DEN HEUVEL L., TRIJBELS F., BLOMH.** Identification of four novel mutations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Europ. J. Hum. Genet* (1998) **6**: 257-265.
- [79] **TONETTI C., BURTSCHER A., BORIES D., TULLIEZ M., ZITTOUN J.** Methylenetetrahydrofolate reductase deficiency in four siblings: a clinical, biochemical, and molecular study of the family. *Am. J. Med. Genet* (2000) **91**: 363-367.7
- [80] **Mills JL, McPartlin JM, Kirke PN, et al.** Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. *Lancet* 1995 ; 345 : 149-51.
- [81] **Stegers-Theunissen RP, Boers GH, Blom HJ, et al.** Neural tube defects and elevated homocysteine levels in amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol* 1995 ; 172 : 1436-41
- [82] **Van der Put NMJ, Steegers-Theunissen RPM, Frosst P, et al.** Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 1995 ; 346 : 1070-1.
- [83] **Rozen R.** Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism - clinical implications. In : Fuchs J, Podda M, eds. *Encyclopedia of medical genomics and proteomics*. New York:Taylor and Francis Group, 2005.
- [84] **S.-C. Liew et E. D. Gupta,** « Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: Epidemiology, metabolism and the associated diseases », *Eur. J. Med. Genet.*, vol. 58, n° 1, p. 1- 10, janv. 2015.
- [85] **Mehdi, Itrat, Essam Abdul Monem, Bassim Jaffar Al Bahrani, Suad Al Kharusi, Ayman Mohammad Nada, Jawad Al Lawati, and Najla Al Lawati.** « Age at Diagnosis of Female Breast Cancer in Oman : Issues and Implications. » *South Asian Journal of Cancer* 3, n°.2 (2014) :101-6.
- [86] **Ntekim A, FT Nufu, And OB Campbell.** « Breast Cancer in Young Women in Ibadan, Nigeria. » *African Health Sciences* 9, n°.4 (December 2009) : 242-46.
- [87] **Ben Abdallah M, Zehani S, Maalej M, Hsairi M, Hechiche M, Ben Romdhane K, Boussen H, Saadi A , Achour N, Ben Ayed F.** « BREAST CANCER IN TUNISIA :

Référence bibliographique

- EPIDEMIOLOGIC CHARACTERISTICS AND TRENDS IN INCIDENCE ». La tunisie Medicale-2009 ; Vol 87, n°07 : 417-425
- [88] **McPherson, K., C. M. Steel, and J. M. Dixon.** « ABC of Breast Diseases. Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factor, and Genetics. » *BMJ (Clinical Research Ed.)* 321, n°. 7261 (September 9, 2000) : 624-28.
- [89] **Uhrhammer, Nancy. Abdelouahab A, Lafarge L , Feillel V, Dib AB, Bignon YJ.** « BRCA1 Mutations in Algerian Breast Cancer Patients : High Frequency in Young, Sporadic Cases. » *International Journal of Medical Sciences*, 2008, 197.
- [90] **El Saghir NS, Khalil MK, Eid T et al.** « Trends in epidemiology and management of breast cancer in developing arab countries : a literature and registry analysis ». *Int J Surg* ; 5 :225-33 (2007).
- [91] **Najjar H, Easson A.** « Age at diagnosis of breast cancer in arab nations » .*Int Jn Surg*
[Epubahead of print]
- [92] **Villeneuve, Sara, Joelle Févotte, Antoinette Anger, Thérèse Truong, Farida Lamkarkach, Oumar Gaye, Pierre Kerbrat, et al.** « Breast Cancer Risk by Occupation and Industry : Analysis of the CECILE Study, a Population-Based Case-Control Study in France. » *American Journal of Industrial Medicine* 54, no.7 (july 2011) : 499-509.
- [93] **Slaoui, Meriem, Fatima Zahra Mouh, Imane Ghanname, Rachid Razine, Mohammed El Mzibri, and Mariam Amrani.** « Outcome of Breast Cancer in Moroccan Young Women Correlated to Clinic-Pathological Features, Risk Factors and Treatment : A Comparative Study of 716 Cases in a Single Institution » *PLOS ONE* 11, no. 10 (October 19, 2016) .
- [94] **M.S. Diallo ; T.S. Diallo , S.B. Diallo , N.D. Camara, G.B. Diallo ,A. Dieng, Y. Dialoo , S.T. Diaw.** « Les tumeurs de sein : épidémiologie ,clinique, anatomie pathologique et pronostic ». 43(5) (1996).
- [95] **perkins CL, Hotes J, Kohler BA, Howe HL,** « Association between breast cancer laterality and tumor location », United States, 100P, (1994-1998).
- [96] **Tulinus H, Sigvaldason H, Olafsdottir G,** « Left and right sided breast cancer ». *Pathol*

Référence bibliographique

- Ros pact ;186(1) :92-4, Feb(1990)
- [97] **L. He et Y. Shen**, « MTHFR C677T polymorphism and breast, ovarian cancer risk: a meta-analysis of 19,260 patients and 26,364 controls », *OncoTargets Ther.*, vol. 10, p. 227- 238, janv. 2017.
- [98] « WHO Collaborative Study of Neoplasia and Steroid Contraceptives. Breast Cancer Combined Oral Contraceptives : Results from a Multinational Study. » *British Journal of Cancer* 61, no. 1 (January 1990) : 110-19.
- [99] **Key ,T,J ,Vercasalo,P.k,BanKs,E.**(2001). Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol* ;2 :133-40.
- [100] **Wooster R, Weber BL.** « Breast and ovarian cancer » . *N Engl JMed* ; 348 :2339-47
cours de cancérologie générale du Pr J.F . HERON (2003).
- [101] **Lecarpentier, Julie, Catherine Nogués, Emmanuelle Mouret-Fourme, Bruo Buecher, Marion Gauthier-Villars, Dominique Stoppa-Lyonnet, Valérie Bonadona, et al.** « Breast Cancer Risk Associated with Estrogen Exposure and Truncating Mutation Location in BRCA1/2 Carriers. » *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 24, no. 4 (April 1, 2015) : 698-707.
- [102] **Lesieur, B., M. Vercambre, G. Dubernard, K. Khosrotehrani, S. Uzan, S. Aractingi, and R. Rouzier.** « Risque de cancer du sein lié à la grossesse. » *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction* 37, no. 1(February 2008) : 77-81.
- [103] **Gillian K Reeves, Valerie Beral,Jane Green ,Toral Gathani, Diana Bulla,**
« Hormonal therapy for menopause and breast-cancer risk by histological type : a cohort study and méta-analysis,the lance oncology »,7(11) :910-918,(2006).
- [104] **Ahmadou Dem, Traoré, MM Dieng, PS Diop, T Ouajdi, MT Lalami, M Diop, JM Dangou, P Touré, Institut du cancer, Université Cheik Anta Diop (Ucad) , Dakar Sénégal,** aboratoire d'anatomie pathologique, Université Cheik anta Diop, Dakar Sénégal Gynaecological and breast cancers at the dakar cancer Institute,Cahiers d'études et de recherches francophones-Santé,18(1) :25-9,(2008).
- [105] **Mrabent, M, N., Noria Harir, Ferial Sellam, Soumia Zeggai, Abdencar Tou,**

Référence bibliographique

- Rachida Salah, Soraya Moulessoul.** « Evaluation of clinical features and HER-2 overexpression in young and old algerian female adults with breast cancer : a comparative study of 628 cases ». *Oncoscience*, advance publication 2016.
- [106] **Anders, Carey K., Rebecca Johnson, Jennifer Litton, Marianne Philips, and Archie Bleeyer.** « Breast Cancer before Age 40 years. » *Seminars in Oncology* 36, no. 3 (june 2009) : 237-49.
- [107] **Astin H, Hooper WC, Dilly A, Drews C , Renshaw M, Elligshen D, et al.** «The prévalence of two genetic traits related to venous thrombosis, in whites and African-Americans. » *Thromb Res*, (2007), 86, 409-415.
- [108] **Franco RF, Aroufo AG, Guerreiro JF, Elinon J, Zago MA.** « Analyses of th 677 C-T mutation of the MTHFR gene in different ethic groups. » *ThrombHaemost*, 2008, 79-119.
- [109] **MC andrew PE, Brand J T, Oearl D K, Prion TW.** « The incidence of MTHFR gene in African-American. » *ThdombRes*, (2006). 195-8.
- [110] **Adjala CE, Amouzo EK, Samni A, Abdelmoutaleb I, Chabi N, Namour F, et al.** « Low frequency of mutated MTHFR 677C-T and 1298 A-C genetic single nucleotide polymorphisms (SNPs) in sub-saharan population. » *Clinchem Lab Med*, (2013), 41 , 1028-1032.
- [111] **Christina Justenhoven, Ute Hamann, ChristinaB .Pierl, SylviaRabstein, BeatePesch,VolkerHarthe,ChristinanBaisch,Caren Vollme t Thoma Illig Thoma B u'nin YonKo andhiltu dBrauch.** « One-Carbon Metaboulism and Breast Cancer Risk : No Association of MTHFR,MTR, and TYMS polymorphismsinthe ». *GENICA Study from Germany*.14(12)(2005).
- [112] **L. He et Y. Shen,** « MTHFR C677T polymorphism and breast, ovarian cancer risk: a meta-analysis of 19,260 patients and 26,364 controls », *OncoTargets Ther.*, vol. 10, p. 227-238, janv. 2017.
- [113] **E. F. Kaya, N. Karakus, A. N. Ulusoy, C. Özaskan, et N. Kara,** « Association of the MTHFR Gene C677T Polymorphism with Breast Cancer in a Turkish Population », *Oncol. Res. Treat.*, vol. 39, n° 9, p. 534-538, 2016.

Référence bibliographique

ANNEXES

ANNEXE

Annexe 1 : Classification TNM des cancers du sein

T_x	Tumeur non évaluée
T_{is}	Tumeur <i>in situ</i>
T 0	Tumeur cliniquement imperceptible
T 1	Inférieure à 20 mm
T 1a	<5 mm
T 1b	5-10 mm
T 1c	11-20 mm
T 2	>20 et <50 mm
T 3	>50mm
T 4	Toute taille avec extension pariétale
T 4a	Extension paroi thoracique
T 4b	Extension à la peau
T 4c	Extension peau et paroi
T 4d	Tumeur inflammatoire
N 0	Pas d'adénopathie palpable
N 1	Adénopathie(s) axillaire(s) homolatérale(s) mobile(s)
N 1a	Présumée non atteinte
N 1b	Présumée atteinte
N 2	Adénopathie(s) axillaire(s) homolatérale(s) fixée(s)
N 3	Adénopathie mammaire interne homolatérale
M 0	Absence de métastases
M 1	Présence de métastases (adénopathie sus-calviculaire comprise)

Annexe 2 : Classification moléculaire des cancers du sein

ANNEXE

Sous-type	Description
Luminal A	Cancers de bas grade, représentant une réceptivité hormonale importante (ER α ++) et une faible prolifération. Expression des cytokératines luminales 8, 18 et du gène GATA3 impliqué dans le contrôle de la croissance et le maintien de la différenciation des tumeurs ER+. Généralement traités par hormonothérapie et de bon pronostic. P53 muté dans moins de 15% des cas.
Luminal B/C	Expression du ER α moins importante et prolifération plus forte que les cancers de type « luminal A ». de pronostics moins bons et donc généralement traités par hormonothérapie + chimiothérapie. P53 muté dans 40 à 80% des cas.
HER2	Surexpression de HER2 mais également d'autres gènes situés dans l'amplicon Erbb2 comme GRB7. Tumeurs négatives pour les récepteurs hormonaux et généralement de grade III. Associé à une surexpression de c-myc et à une forte prolifération. Pronostic défavorable mais bonne réponse aux traitements de type anthracycline, taxane. P53 muté dans environ 70% des cas.
Basal-like	Tumeurs dites « triples négatives » c'est-à-dire n'exprimant pas les récepteurs hormonaux (ER et PgR) et ne surexprimant pas le récepteur HER2. Expression des cytokératines basales 5/6,14 et 17, l'EGFR et de c-kit. P53 muté dans 80% des cas et tumeurs souvent associées à une mutation de BRCA1. Pronostic le plus défavorable.
Normal-like	Sous-type assez mal défini. Exprime des gènes connus pour être exprimé dans les cellules non-épithéliales et le tissu adipeux. Pronostic intermédiaire.

Annexe 3 : Questionnaire

Questionnaire

Date :

Service :

N° de dossier :

1) Données relatives aux patientes

Nom & prénom :

Date et lieu de naissance :

Age :

Adresse :

N° de téléphone :

Fonction :

Poids : Taille : IMC :

Activité physique: oui..... Non..... Nbre d'heures /semaine.....

Etat civil :

Nbre d'enfants :

L'âge de la 1^{ère} grossesse :

Nombre de grossesse :

Allaitement au sein: Oui Non : Durée.....

Prise oestroprogestatifs : Oui Non Durée totale

Age de la puberté :

Age de la ménopause :

Autopalpation des seins : Oui..... Non.....

Dépistage du cancer du sein (mammographie) : Oui..... Non.....

Antécédents Personnels :

Antécédents familiaux :

Exposition aux radiations ionisantes : Oui..... Non.....

2) Renseignements cliniques

L'âge au diagnostic:

Motif de découverte :

Délai entre le début de la maladie et la première consultation médicale :

Type histologique de la Tm :

Localisation de la Tm.....

Stade :

Récidive : Oui Non

ANNEXE

Type de traitement :

Chirurgie type de chirurgie :

Chirurgie plus chimiothérapie

Chirurgie plus chimiothérapies plus radiothérapie

La durée du traitement :

Suivi : Oui..... Non.....

Si oui trimestriel semestriel Annuel

3) Résultats du bilan biologique et génétique

ACE :

CA15-3 :

Polymorphisme C677T du gène de la MTHFR :

Annexe 4 : consentement

ANNEXE

Centre hospitalier Universitaire BenBadis de Constantine
Laboratoire de biologie et génétique moléculaire
Laboratoire de biochimie

Identification du patient	N du prelevement:
NOM : Prénom :	Adresse :
Date de naissance :	Tel:

CONSENTEMENT

Je soussigné(e), sus nommé, reconnais avoir été informé(e) par le sur les examens des caractéristiques génétiques qui seront réalisées, dans un but diagnostique et/ou de recherche, à partir :

- Du prélèvement qui m'a été effectué
- A visée diagnostique
 A visée de recherche

Pour:

.....

Je donne mon consentement pour ce prélèvement et je reconnais avoir reçu l'ensemble des informations, permettant la compréhension de cet acte biologique et sa finalité.

Fait à, le Signature

ATTESTATION

Je certifie avoir informé le (ou la) patient(e) sus nommé(e) sur les caractéristiques de la maladie recherchée, les moyens de la détecter, les possibilités de prévention et de traitement, et avoir recueilli le consentement du (ou de la) patient(e)	Signature et cachet
---	---------------------

Un document de ce type doit accompagner la prescription - et les documents cliniques indispensables - pour chacune des analyses demandées.

Le médecin prescripteur doit conserver le consentement écrit, les doubles de la prescription et de l'attestation, et les comptes rendus d'analyses de biologie médicale commentés et signés

Annexe 5 : préparation des solutions

-TE 20:5 :(Tris 20mM, EDTA 5Mm, pH 7.5)

- Tris : 2.422g /l

ANNEXE

- EDTA : 1.86g/l
- Ajuster le pH avec HCL 1N

-TE 10:1 :(Tris 10mM, EDTA 1Mm, pH 7.4)

- Tris : 0.606 g
- EDTA : 0.1869 g pour 500 ml.
- Ajuster le pH avec de l' HCL 1N

-Tampon de lyse : NaCl 400 mM.

- Tris : 10mM
- EDTA : 2mM.
- pH8.2

-TBE 10X:

- Tris 108 g.
- Acide borique 55 g.
- EDTA 9.3 g.
- Qsp H2O 1L.

Annexe 6 : préparation du milieu réactionnel de la PCR

Constituants	volume
Tamopn (10X)	5 μ L
DNTP (2Mm)	5 μ L
MgCl ₂ (25mM)	3 μ L
Amorce F (100 μ M)	0.2 μ L
Amorce R (100 μ M)	0.2 μ L
Taq polymérase (5U/ μ L)	0.4 μ L
Eau distillé stérile	5.2 μ L

Annexe 7 : préparation du milieu de digestion par l'enzyme HinfI

ANNEXE

Milieu de digestion	Quantité en μ l
Tampn	5
Hinf1	1
H ₂ O	5
BSA	0.2
Volume total	10
Produit de PCR	30

Annexe 8 : préparation du gel d'agarose 3%

Les composants	quantité
Agarose	3 g
TBE (10X)	100 ml
BET	10 μ L

Résumé :

Le cancer du sein est actuellement le cancer le plus fréquent chez les femmes et l'une des principales causes de décès par cancer dans le monde. Les mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu lors de la cancérogenèse ne sont pas encore entièrement compris.

L'objectif de notre étude menée sur 52 sujets, 26 patientes atteintes du cancer du sein et 26 témoins, est centré sur l'évaluation de l'influence des différents facteurs de risque environnementaux et génétiques sur le cancer du sein, l'identification du polymorphisme C677T de la *MTHFR* chez les témoins et chez les patientes présentant un cancer du sein et enfin l'établissement d'une éventuelle relation entre ce polymorphisme et le cancer du sein chez les patientes admises à la clinique EL NAKHIL et à la consultation de sénologie (CHU Constantine), après une analyse moléculaire en utilisant la technique de PCR /digestion par l'enzyme de restriction *HinfI*.

Nos résultats montrent d'une part, une fréquence élevée du cancer du sein entre l'âge de 45-54 ans avec un âge moyen de 49,61 ± 9,35 ans, la majorité des cancers du sein sont des carcinomes canaux infiltrants CCI (92%) avec une prédominance du grade III (54.91%). 94.12% des malades ont subi une mastectomie.

D'autre part, 11.54% de nos témoins sont hétérozygotes C/T, 7.69% sont homozygotes mutés et 80.77 % sont des homozygotes normaux. Les fréquences des allèles C et T sont respectivement de 85.19% et 14.81%, 73.91% de nos patientes ont présenté le génotype C/C, 13.4% le génotype C/T et 13.4% le génotype T/T. La fréquence de leurs allèles C et T est 80.83 % et 19.57 % respectivement.

Le calcul des Odds ratios, indique l'absence d'association entre le polymorphisme C677T du *MTHFR* et le cancer du sein et ceci que ce soit pour le modèle CC vs TT (OR = 1.85 et *p*-value = 0.52) ou le modèle TT+CT vs CC (OR = 1.24 et *p*-value = 0.75). Ce cadre d'analyse nous a permis de déceler certains facteurs de risque du cancer du sein.

En conclusion, notre étude ne retrouve aucune preuve d'une association significative entre le polymorphisme C677T du *MTHFR* et la cancérogenèse mammaire.

Mots clés : cancer du sein, polymorphisme, C677T, *MTHFR*, PCR/RFLP, facteurs de risque.

Abstract :

Breast cancer is currently the most common cancer in women and one of the leading causes of cancer deaths worldwide. Molecular and cellular mechanisms involved in carcinogenesis are not yet fully understood.

The objective of our study of 52 subjects, 26 breast cancer patients and 26 controls, focuses on the assessment of the influence of various environmental and genetic risk factors on breast cancer, the identification of C677T polymorphism of *MTHFR* in controls and in patients with breast cancer and finally the establishment of a possible relationship between this polymorphism and breast cancer in patients admitted to the El NAKHIL clinic and the consultation of senology (Constantine Hospital), after molecular analysis using the *HinfI* restriction enzyme / PCR technique.

Our results show, on the one hand, a high frequency of breast cancer between the age of 45-54 years with a mean age of 49.61 ± 9.35 years, the majority of breast cancers are invasive ductal carcinomas CCI (92%) with a predominance of grade III (54.91%). 94.12% of patients had a mastectomy.

On the other hand, 11.54% of our controls are heterozygous C / T, 7.69% are homozygous mutated and 80.77% are normal homozygotes. The frequencies of the C and T alleles are respectively 85.19% and 14.81%, 73.91% of our patients presented the C / C genotype, 13.4% the C / T genotype and 13.4% the T / T genotype. The frequency of their C and T alleles is 80.83% and 19.57% respectively.

The calculation of the Odds ratios, indicates the absence of association between the *MTHFR* C677T polymorphism and the breast cancer and this it is for the model CC vs TT (OR = 1.85 and p-value = 0.52) or model TT + CT vs CC (OR = 1.24 and p-value = 0.75). This framework has allowed us to identify certain risk factors for breast cancer.

In conclusion, our study found no evidence of a significant association between the *MTHFR* C677T polymorphism and mammary carcinogenesis.

Key words: breast cancer, polymorphism, C677T, *MTHFR*, PCR / RFLP, risk factors.

ملخص

سرطان الثدي هو السرطان الأكثر شيوعا عند النساء وأحد الأسباب الرئيسية للوفيات بالسرطان في جميع أنحاء العالم. الآليات الجزيئية والخلوية المشاركة في التسرطن ليست بعد مفهومة بالكامل.

تهدف دراستنا التي تضم 52 فردا، 26 منهم مريضى بسرطان الثدي و 26 شاهد ، على تقييم تأثير عوامل الخطر البيئية والجينية المختلفة على سرطان الثدي ، وتحديد تعدد الأشكال C677T من MTHFR عند الشهود و المرضى الذين يعانون من سرطان الثدي وتحديد في نهاية المطاف وجود علاقة محتملة بين هذا التعدد وسرطان الثدي عند المرضى الذين أدخلوا إلى عيادة النخيل، و فحوصات أمراض الثدي(المستشفى الجامعي قسنطينة) بعد التحليل الجزيئي باستخدام تقنية إنزيم PCR / لتقنية HinfI. من جهة، تظهر نتائجنا ارتفاع وتيرة سرطان الثدي عند النساء اللاتي تتراوح أعمارهن بين 45-54 عاما بمتوسط عمر 49.61 ± 9.35 سنوات، والغالبية العظمى من سرطانات الثدي ينتسبون الى القسم CC مع غلبة الدرجة الثالثة (54.91%). (94.12%) من المرضى قاموا بعملية جراحية لاستئصال الثدي من ناحية أخرى ، 11.54 % من الشهود هي C / T ، 7.69% هي TT و 80.77 % من CC الترددات الأليلية C و T هي 85.19% و 14.81% على التوالي، 73.91% من المرضى ذوي النمط الجيني C / C تمثلوا في 13.4% من النمط الجيني C / T و 13.4% من النمط الجيني T / T . الترددات الأليلية C و T هي 80.83% و 19.57% على التوالي. حساب نسب الأرجحية ، يشير إلى عدم وجود ارتباط بين تعدد الأشكال MTHFR C677T وسرطان الثدي، ولهذا يكون النموذج CC مقابل النموذج TT (OR=1.85 والقيمة الاحتمالية = 0.52) أو النموذج CT + TT مقابل CC (OR= 1.24 والقيمة الاحتمالية = 0.75) وقد سمح لنا هذا الإطار بتحديد بعض عوامل الخطر لسرطان الثدي. في الختام ،لم تجد دراستنا أي دليل على وجود ارتباط كبير بين تعدد الأشكال MTHFR C677T و التسرطن الثديية. الكلمات الرئيسية: سرطان الثدي ، تعدد الأشكال ، C677T ، MTHFR ، PCR / RFLP ، عوامل الخطر.

Année universitaire : 2017-2018

Présenté par : OUBED Radja
KEROUAZ Sabrina

Polymorphisme C677T du gène de la MTHFR et risque de cancer du sein

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Génétique

Le cancer du sein est actuellement le cancer le plus fréquent chez les femmes et l'une des principales causes de décès par cancer dans le monde. Les mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu lors de la cancérogenèse ne sont pas encore entièrement compris.

L'objectif de notre étude menée sur 52 sujets, 26 patientes atteintes du cancer du sein et 26 témoins, est centré sur l'évaluation de l'influence des différents facteurs de risque environnementaux et génétiques sur le cancer du sein, l'identification du polymorphisme C677T de la *MTHFR* chez les témoins et chez les patientes présentant un cancer du sein et enfin l'établissement d'une éventuelle relation entre ce polymorphisme et le cancer du sein chez les patientes admises à la clinique EL NAKHIL et à la consultation de sénologie (CHU Constantine), après une analyse moléculaire en utilisant la technique de PCR /digestion par l'enzyme de restriction *HinfI*.

Nos résultats montrent d'une part, une fréquence élevée du cancer du sein entre l'âge de 45-54 ans avec un âge moyen de $49,61 \pm 9,35$ ans, la majorité des cancers du sein sont des carcinomes canaux infiltrants CCI (92%) avec une prédominance du grade III (54.91%). 94.12% des malades ont subi une mastectomie.

D'autre part, 11.54% de nos témoins sont hétérozygotes C/T, 7.69% sont homozygotes mutés et 80.77 % sont des homozygotes normaux. Les fréquences des allèles C et T sont respectivement de 85.19% et 14.81%, 73.91% de nos patientes ont présenté le génotype C/C, 13.4% le génotype C/T et 13.4% le génotype T/T. La fréquence de leurs allèles C et T est 80.83 % et 19.57 % respectivement.

Le calcul des Odds ratios, indique l'absence d'association entre le polymorphisme C677T du *MTHFR* et le cancer du sein et ceci que ce soit pour le modèle CC vs TT (OR = 1.85 et p-value = 0.52) ou le modèle TT+CT vs CC (OR = 1.24 et p-value = 0.75). Ce cadre d'analyse nous a permis de déceler certains facteurs de risque du cancer du sein.

En conclusion, notre étude ne retrouve aucune preuve d'une association significative entre le polymorphisme C677T du *MTHFR* et la cancérogenèse mammaire.

Mots-clefs : Cancer du sein, polymorphisme, C677T, *MTHFR*, PCR/RFLP, facteurs de risque

Laboratoire de biologie et génétique moléculaire, faculté de médecine, université Salah Bounnider Constantine 3
Laboratoire de biochimie CHU Constantine

Présidente du jury : REZGOUNE-CHELLAT Djalila (MCA - UFM Constantine).

Encadreur : HANACHI Sabah (MCA-Faculté de médecine université, Salah Bounnider Constantine 3).

Co-encadreur : ZIADA Hadia (MAA - UFM Constantine).

Examineur : ZEKRI Salima (MA- Faculté de médecine université, Salah Bounnider Constantine 3).