

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 :

Etude de l'effet du polymorphisme NQO1*2 sur la survenue du cancer du sein.

Présenté et soutenu par : Khelifa Nesrine.
Loucif Racha.

Le 14/07/2021

Jury d'évaluation :

Président : Dr BENHIZIA Hayet (MCA - Université des Frères Mentouri, Constantine 1).
Encadreur : Dr SEDRATI khadidja (MCB - Université des Frères Mentouri, Constantine 1).
Examineur : Dr SEMMAME Ouarda (MCB - Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

Année universitaire
2020 - 2021

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, nous remercions DIEU pour nous avoir donné la santé, la volonté et le courage pour affronter la pression, continuer et réussir nos études comme nous l'avons toujours souhaité.

Nos premiers remerciements iront à notre rapporteur Dr SEDRATI. K maitre de conférences a université de Constantine 1. Qui a su nous conseiller efficacement tout en nous laissant travailler librement. Pour son humanité et sa confiance sa patience et ses remarques avisées toute notre reconnaissance lui est acquise.

A Dr BENHIZIA HAYET maitre de conférences a université de canstanine1, pour nous avoir fait le grand honneur d'accepter la présidence du jury de ce mémoire.

A Dr SEMMAME OURDA d'avoir accepté d'examiner ce travail, nous la remercions également

Enfinement nous remercions tous les professeurs et les enseignants de la filière génétique qui nous ont dispensé les cours durant notre passage dans ce département avec dévouement et Patience.

Dédicace

Je dédie ce mémoire à :

Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi, que dieu vous procure bonne santé et longue vie.

A la joie de mes jours et la source de mes efforts, mon soutien moral mes sœurs, CHAIMA, MERIEM, et HIBAT ALLAH.

À mon petit prince, mon frère ABDE ALRAHMAN, et A mon frère MOHAMMED SALIH, que Dieu les protège.

À ma chère enseignante Dr SEDRATI KHADIDJA, mon exemple éternel symbole d'amour de fidélité, d'amitié, de joie, de confiance et d'espoir.

À mes grandes péres qu'est toujours gravé dans ma mémoire, Qu' Allah leur accorde son paradis.

À mes sœurs de cœur et collègues d'étude, mes meilleurs YOUSRA, AFAF et RAYAN et mon binome RACHA.

Aux personnes dont j'ai bien aimé la présence dans ce jour mes aimables tantes et oncles.

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce travail soit possible, je vous dis merci.

Nesrine

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A mes chers et respectueux parents, vraiment aucune dédicace ne saurait exprimer mon attachement, mon amour et mon affection. Je vous offre ce modeste travail en témoignage de tous les sacrifices et l'immense tendresse dont vous m'avez toujours su me combler.

A ma sœur khawla et mes frères Islam et Anis, je vous aime beaucoup. Et A mes cousines Rabab, Roumaissa. Veuillez trouver dans ce travail mon profond hommage.

A mes sœurs de cœur Latifa, Ikram

A tous mes chers amis que je l'aime est spécialement Marwa, Nesrine, Chaima, Abir, Hadjer merci pour leurs soutien et encouragement

A toi NESRINE KHELIFA mon binôme, Je vous souhaite, du succès et des grades supérieurs.

A tous mes amis et mes collègues de la promotion génétique moléculaire 2021.

Mes dédicaces s'adressent aussi à :

Tous ceux qui m'ont enseigné à l'Université MENTOURI-CONSTANTINE

« Spécialité : GENETIQUE MOLECULAIRE » A toutes les femmes qui souffrent du cancer du sein.

Racha

Table des matières

REMERCIEMENTS ET DÉDICACE

LISTE DES ABRÉVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

Introduction1

Partie 1 : Bibliographie

I. Cancer du sein

1. Sein2	2
1.1. Anatomie.....2	2
1.2. Glande mammaire3	3
1.3. Physiologie3	3
2. Épidémiologie.....4	4
2.1. Dans le monde4	4
2.2. En France5	5
2.3. En Algérie5	5
3. Classification des tumeurs mammaires.....7	7
3.1. Classification selon le type7	7
3.1.1. Tumeurs bénignes du sein.....7	7
3.1.2. Tumeurs malignes du sein.....7	7
3.1.2.1. Cancer <i>in situ</i>8	8
3.1.2.2. Carcinome invasif ou infiltrant.....8	8
3.2. Classifications selon le stade.....9	9
3.3. Classifications selon le score9	9
3.4. Classification moléculaire.....10	10
4. Facteurs de risques11	11
4.1. Facteur génétique11	11

4.1.1. Gènes rares à forte pénétrance.....	11
4.1.2. Gènes rares à pénétrance modérée.....	11
4.1.3. Allèles communs à faible pénétrance.....	12
4.1.4. Antécédents familiaux.....	12
4.2.. Facteurs non génétiques.....	12
4.2.1. Facteurs hormonaux et reproductifs.....	12
4.2.2. Facteurs anthropométriques.....	14
4.2.3. Facteurs liés au mode de vie.....	14
4.2.4. Facteur environnementaux.....	16
5. Diagnostic.....	16
5.1. Examen clinique.....	16
5.2.Examen Mammographie et géographique	17
5.3.Autres techniques d'imagerie.....	17
6. Traitement	18
6.1.Traitement chirurgicale	18
6.2.Chimiothérapie.....	19
6.3. Radiothérapie	19
6.4.Iminothérapie.....	20
6.5. Thérapie ciblé.....	20

II. NAD (P) H : quinone oxydoréductase 1

1. NAD (P) H : quinone oxydoréductase 1.....	22
2. Gène NQO1	23
3. Régulation de gène NQO1.....	23
4. Protéine NQO1	24
4.1. Structure de la protéine NQO1.....	24
4.2. Mécanisme « Ping-pong» de la NQO1.....	25
4.3. Fonction de la NQO1.....	26
4.3.1. Système de détoxification	26
4.3.2. Enzyme antioxydante.....	27
4.3.3. Gardien du protéasome 20S.....	27
4.3.4. Activateur de pro médicaments anticancéreux.....	27

4.3.5. Autres fonctions.....	28
4.3.6. Localisation cellulaire	28
5. NQO1 et le cancer	29
6. Polymorphismes de la NQO1.....	30
7. Effet de NQO1*2 sur le CS.....	31

Partie 2 : Partie pratique

I. Matériels et méthodes

1. Échantillonnage	32
1.1. Population témoin.....	32
1.2. Population Patient	32
2. Méthodes.....	32
2.1. Recueil des données.....	32
2.2. Prélèvement sanguine.....	33
2.3. Étude moléculaire.....	33
2.3.1. Extraction de l'ADN.....	33
2.3.2. Estimation de la qualité et la quantité d'ADN.....	33
2.3.3. Génotypage des différents polymorphismes.....	34
2.3.4. Amplification par PCR	35
2.3.5. Contrôle des produits PCR :.....	36
2.3.6. Digestion enzymatique des produits PCR	38
2.3.7. Électrophorèse des produits de la digestion	38
3. Étude statistique analytique	39
3.1. Calcul de l'Odds Ratio.....	39
3.2. Choix de la « p value ».....	40

II. Résultat

1. Dans la Populations témoins	41
2. Dans la Populations patients.....	41

III. Discussion

1. Discussion	45
---------------------	----

Conclusion et perspective.....	47
--------------------------------	----

Références Bibliographiques.....48

Annexes

Résumé

Liste des abréviations

AJCC : American joint comité sur le cancer.

BBP : Bleu de Bromophénol.

BET : Bromure d’Ethidium.

BCS: *Breast-conserving surgery*.

BRCA1/2: *Breast cancer*.

CCIS : Carcinome canalaire *in situ*.

CLIS : Carcinome lobulaire *in situ*.

CCI : Carcinome canalaire infiltrant.

CLI : Carcinome lobulaire infiltrant.

CDK4/6 : *Cycline dépendent kinase 4 /6*.

CS : Cancer du sein.

DFS : *Disease-free survival*.

EDTA : Ethylène diamine tétra-acétique.

EE : Elston et Ellis.

ER : *Estrogen receptor*.

FA: Fibroadénome.

GWAS: *Genome-wide association study*.

HER2: *Human Epidermal Growth Factor Receptor-2*.

HR+ : *Hormone receptors positive*.

MPC : Mastectomie prophylactique controlatérale.

MMC : *Mitomycin C*.

NAD : *Nicotinamide adénine dinucléotide.*

NADP : *Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.*

NQO1: *NAD(P) H Quinone oxidoreductase 1.*

OS: *overall survival.*

ODC: *Ornithine décarboxylase.*

PCR : *Polymérase Chain réaction.*

PR : *Progesterone receptors.*

PARP: *Poly (ADP-ribose) polymerase.*

PI3K: *Phosphoinositide 3-kinases.*

PETN: *Phosphatase and Tensin Homolog.*

PALB2: *Partner and localizer of BRCA2.*

RFLP: *Restriction fragment length polymorphism.*

SDS: *Sodium dodecyl sulfate.*

SBR: *scarff-bloom et richadson.*

STK11: *Serine threonine kinase 1.*

SNP: *Single nucleotide polymorphism.*

SIRT2: *Silencing information regulator two 2.*

UICC: *Union for International Cancer Control*

Liste des figures

Figure 1 : Vue schématique du complexe aréolo – mamelonnaire	3
Figure2 : Nombre de nouveaux cas en 2020 les deux sexes, tous âgés.....	6
Figure 3 : Carcinome lobulaire (A) et carcinome canalaire (B)	8
Figure 4 : L'action de l'atezolizumab sur le cancer du sein	20
Figure 5 : localisation de gène NQO1 sur le génome humain	22
Figure 6 : structure du gène NAD(P) H-quinone-Oxidoreductase 1(NQO1)	22
Figure7 : Structure du gène NQO1 et éléments promoteurs	23
Figure 8 : Structure cristalline de la NQO1 humaine	24
Figure 9 : Mécanisme de Ping Pang de la NQO1	25
Figure10 : Les fonctions de la NQO1	27
Figure 11 : Structure du gène NQO1et de deux variantes d'épissage répertoriées	30
Figure 12 : Résultat observé d'un contrôle des produits PCR (taille 271), B : le contrôle négatif, E: Échantillon, M: marqueur de taille 100 pb.	36
Figure 13 : photographie d'un profil de digestion du polymorphisme NQO1*2 du gène NQO1.....	37
Figure 14 : comparaison des fréquences génotypiques du polymorphisme NQO1 *2 du gène NQO1 entre les témoins et les patients.....	41
Figure 15 : comparaison des fréquences alléliques entre les patients et témoins.....	42

Liste des tableaux

Tableaux 1 : incidence du cancer de sein dans les deux sexes, Réseaux Est et Sud-est.....	6
Tableaux 2 : classification moléculaire de cancer du sein.....	10
Tableaux 3 : préparation du milieu réactionnelle de la PCR.....	34
Tableaux 4 : Représentation d’amorces spécifique de NQO1 et leur programme PCR.....	35
Tableaux 5 : Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme C609T du gène de la NQO1 dans la population témoin.....	40
Tableau 6 : Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme C609T du gène de la NQO1 dans la population malade.....	41
Tableaux 7 : comparaison des fréquences génotypique et alléliques du polymorphisme C609T du gène NQO1.....	42

INTRODUCTION

Introduction

Le cancer du sein (CS) constitue une pathologie hétérogène et multifactorielle qui naît de l'échappement de cellules mammaires aux mécanismes de contrôle de la prolifération. C'est la première cause de mortalité chez la femme en monde (**Sancho-Garnier et Colonna, 2019**).

De nos jours, plusieurs facteurs de risque contribuent à l'apparition du CS, mais aucun facteur n'a pu être impliqué directement dans l'étiopathogénie de ce cancer, à l'exception de la transmission héréditaire de certains gènes de prédisposition. Cependant, les travaux réalisés ces vingt dernières années en biologie moléculaire du CS ont permis d'identifier un grand nombre d'acteurs moléculaires participant aux grandes fonctions qui définissent le phénotype cancéreux, parmi de ces gènes le NQO1 (**Kim et al., 2021**).

La NAD(P)H : quinone oxydoréductase du type 1 (NQO1) est une enzyme cytosolique qui catalyse la réduction des quinones de deux électrons prévenant ainsi leur participation au cycle redox et donc au stress oxydant. À ce titre, il est probable que les individus ayant une faible activité ou une absence d'activité NQO1 sont plus exposés aux effets toxiques et carcinogènes de certaines quinones (métabolites du benzène) et des composés nitroaromatiques. Les niveaux d'activité de NQO1 peuvent être reliés à au moins deux polymorphismes génétiques, une transition C vers T en position – 465 et une autre transition C vers T en position – 609 responsables, pour l'une, d'une diminution et pour l'autre, d'une perte de fonction (**David Ross et David Siegel, 2021**).

Dans le présent travail nous nous sommes intéressés à l'étude de l'un des paramètres moléculaires (le polymorphisme C609T du gène NQO1) en relation avec la survenue du CS.

Ce fut notre thème d'étude, dont les objectifs sont :

- Maîtriser les outils et les techniques de bases de biologie moléculaire
- Étudier la distribution du polymorphisme C609T du gène NQO1 dans un échantillon de la population Algérienne.
- Déterminer une possible contribution du polymorphisme C609T du gène NQO1 dans la survenue du CS.

PARTIE 01
BIBLIOGRAPHIE

I. CANCER DU SEIN

1. Le sein

C'est une structure complexe située entre la deuxième et la sixième côte, au niveau du sternum et au-dessus du thorax. En position debout, sous l'influence de son propre poids, le sein tombe légèrement, ce qui créait le sillon infra-mammaire entre la moitié inférieure du sein et le thorax. Chaque sein repose sur un muscle du thorax appelé muscle pectoral. Le sein de la femme couvre une région assez grande : en hauteur jusqu'à la clavicule et, en largeur, de l'aisselle jusqu'au milieu du sternum environ (**Habour, 2007**).

1.1. Anatomie

Le sein est une glande exocrine qui se développe au cours de la vie de la femme. Il ne contient pas de muscles et est constitué de graisse, de tissu conjonctif, de glandes et de canaux. Chaque sein repose sur un large muscle du thorax appelé "muscle grand pectoral". Le sein couvre une région assez grande : en hauteur jusqu'à la clavicule et en largeur, de l'aisselle (creux axillaire) jusqu'au milieu du sternum environ. Il est composé de différentes parties (**Habour, 2007**).

- **Ligaments** qui sont des bandes serrées de tissu conjonctif soutenant les seins. Ils traversent le sein de la peau jusqu'aux muscles où ils se fixent au thorax.
- **Lobules** qui sont des groupes de glandes qui produisent le lait. Chaque sein comporte de 15 à 25 lobules. Les glandes produisent du lait quand elles sont stimulées par les hormones de la femme durant la grossesse.
- **Canaux lactifères** qui sont des tubes qui transportent le lait des lobules au mamelon.
- **Aréole** est un disque cutané (de 15 à 30 mm de diamètre), rosée ou brunâtre qui entoure une protubérance centrale : le mamelon. Sa surface est bosselée à cause de la présence de grosse glande sébacée (le tubercule de Morgani) qui sécrète de sébum pour prévenir l'apparition de gerçures sur l'aréole et le mamelon à la cour de l'allaitement, pendant la grossesse. Ces glandes deviennent plus volumineuses et plus nombreuses : les tubercules de Montgomery.
- **Mamelon** est une région cylindrique pigmentée située au centre de l'aréole d'où le lait est expulsé (**Zucca-Matthes et al., 2016**).

1.2. Glande mammaire

Les glandes mammaires sont des masses de densité variable, discoïdes aplaties d'avant en arrière, de contour irrégulier. Ce sont des glandes exocrines constituées de 2 compartiments cellulaires : le compartiment mésenchymateux (vaisseaux sanguins et nerfs) et le compartiment épithélial qui s'articule autour d'un réseau de canaux galactophores et de lobules renfermant les alvéoles. Ces deux compartiments sont séparés par une membrane basale de collagène, de laminine et de glycosaminoglycannes. Chaque glande est organisée en une vingtaine de lobes (**Figure1**) renfermant 20 à 40 lobules qui contiennent à leur tour 10 à 100 alvéoles. Le rôle des lobules est de produire le lait en période d'allaitement. Les canaux transportent le lait vers le mamelon (**Drake, 2010**).

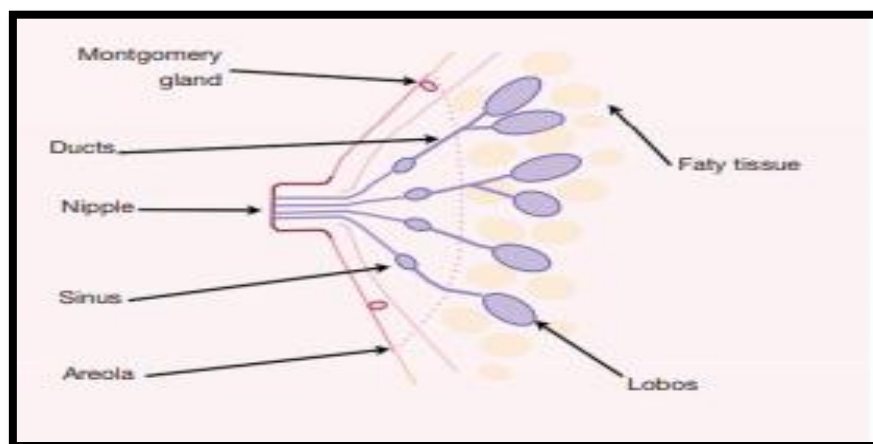


Figure 1 : Vue schématique du complexe aréolo-mamelonnaire (**Zucca-Matthes et al.,2016**).

1.3. Physiologie

À la puberté, la jeune fille observe des changements dans la forme et le volume de ses seins sous l'influence des hormones sexuelles. Ces hormones, fabriquées par les ovaires, ont une influence sur les seins tout au long de la vie. Ce sont:

- **Œstrogènes** ils permettent le développement des seins au moment de la puberté et les années qui suivent les premières règles. Lors du cycle menstruel les œstrogènes sont sécrétés dès le début du cycle par les ovaires et augmentent progressivement jusqu'à un « pic ovulatoire » lors de l'ovulation. Puis la sécrétion d'œstrogènes est

encore assez forte jusqu'à la survenue des règles. Celles-ci surviennent par l'arrêt de la sécrétion des ovaires quand il n'y a pas de grossesse.

- **Progestérone** est sécrétée par les ovaires essentiellement à partir de l'ovulation et jusqu'aux règles. Elle a une action de modération des œstrogènes sur la glande mammaire.

Pendant toute la grossesse, le sein est soumis à de fortes doses de sécrétion d'œstrogènes et de progestérone ce qui induit le développement maximal des lobules et des canaux mammaires, entraînant une augmentation importante du volume du sein. À l'accouchement sous l'influence d'une autre hormone, la prolactine (sécrétée par l'hypophyse), le sein commence sa fonction de sécrétion lactée. Cette sécrétion sera entretenue par la succion du mamelon par le bébé. À la ménopause, avec l'arrêt de la sécrétion de la progestérone et des œstrogènes, les glandes diminuent progressivement et laissent plus de place au tissu graisseux.

Les hommes possèdent aussi des glandes mammaires qui restent atrophiques, mais pouvant également se canceriser (**Cassagnes, 2015**).

La fonction principale du sein est de fabriquer du lait lors de la lactation. La fabrication du lait a lieu dans les lobules mammaires. Le lait est ensuite évacué par le système galactophorite jusqu'au mamelon. Chaque lobule mammaire est constitué d'un regroupement d'acini. Chaque acinus est bordé par une membrane basale sur laquelle reposent des cellules myoépithéliales et des cellules épithéliales, appelées encore luminales car elles sont au contact de la lumière des acini. Ce sont les cellules luminales qui fabriquent le lait (**Macgrogan, 2016**).

2. Épidémiologie

Le cancer du sein (CS) est le cancer le plus courant et la deuxième cause de décès par cancer chez les femmes (**Zaidi et Dib, 2018**).

2.1. Dans le monde

Le CS est la localisation la plus fréquente chez la femme. L'augmentation de l'incidence du CS dans les 20 dernières années du 20e siècle est observée dans tous les pays

du monde. Selon un bilan du Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) de l'Organisation mondiale de la santé basée à Lyon, le CS a connu une forte augmentation dans le monde depuis 2008. L'incidence a augmenté de 20% depuis 2008 et la mortalité de 14%.

Le CS est la cause la plus fréquente de décès par cancer chez les femmes et le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez ces dernières dans 140 de 184 pays pour lesquels les données sont disponibles.

Cependant les incidences varient de 27/100000 en Asie Centrale-Est et en Afrique à 85–94/100000 (Australie, Amérique du Nord et Europe de l'Ouest) (**Sancho-Garnier et Colonna, 2019**).

2.2. En France

Se situe parmi les fréquences les plus élevées d'Europe, la survie à 5 ans est de l'ordre de 88 % et de 78 % à 10 ans, elle est parmi les taux les plus élevés d'Europe de l'Ouest. L'excès de mortalité aux CS est donc faible (< 5 %) mais variable selon l'âge, maximum les deux premières années du suivi (**Sancho-Garnier et Colonna, 2019**).

2.3. En Algérie

En Algérie, il représente le 1^{er} cancer de la femme et de toute la pathologie cancéreuse et il occupe la première place en matière d'incidence, en comparaison aux autres types de cancers, l'incidence du CS est de 65 pour 100 000 femmes avec une fréquence de 21.5% de CS (**Globocan, 2020**).

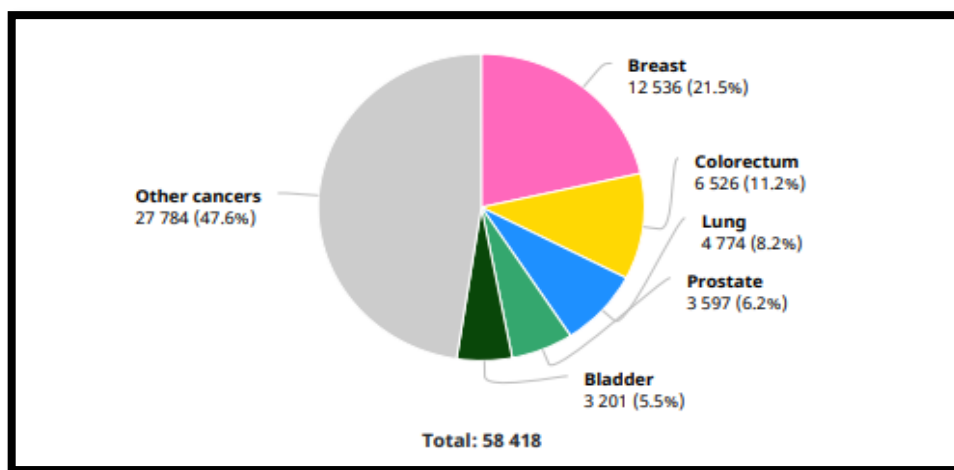


Figure 2: Nombre de nouveaux cas en 2020, les deux sexes, tous âgés (Base de données Globocan, 2020).

L'augmentation de l'incidence du CS concerne les deux sexes passant, chez l'homme, d'un taux d'incidence brut de 0.6 en 2014 à 1.08 pour 100000 habitants en 2017. Chez la femme, le taux d'incidence brut passe de 40.8 en 2014 à 61.9 pour 100000 habitants en 2017 (Hamdi *et al.*, 2020).

Tableaux 1 : incidence du cancer de sein dans les deux sexes, Réseaux Est et Sud-est (Hamdi *et al.*, 2020).

	2014		2015		2016		2017	
	M	F	M	F	M	F	M	F
Taux brut/ 100000h	0.6	40.8	0.8	50.3	2.6	60.9	1.08	61.9
Taux standardisé/ 100000h	0.6	46.8	1.0	56.6	3.2	67.3	1.56	73.4
% / autres cancers	0.8	41.8	0.8	40.8	2.6	42.0	1.19	42.4

3. Classification des tumeurs mammaires

3.1 Classification selon le type

3.1.1. Tumeurs bénignes du sein

L'apparition d'une masse non cancéreuse dans la glande mammaire et se modifier des structures épithéliales (canaux et lobules) ou bien conjonctives (tissu fibreux et adipeux). Il existe plusieurs tumeurs non cancéreuses du sein :

- **Kyste** : Se présente parmi les lésions mammaires les plus fréquentes. Il se définit comme solitaire de grande taille ou comme kystes multiples. Ils sont remplis de liquide sécrété par des cellules des canaux galactophoriques fermés, le liquide présent dans le kyste peut être ponctionné, Ils se constituent entre (<25 et 45 ans), leur prévalence variant de 37,5 à 90 %, selon l'âge et les séries (NP3) (**Lavoué et al., 2015**).
- **Fibroadénome (FA)** : ce sont les tumeurs bénignes les plus fréquentes, c'est une prolifération mixte épithéliale et conjonctive, il se définit comme une masse composée de tissus fibreux et glandulaires. Cette affection est courante chez les jeunes femmes (< 25-30 ans) (**Bendifallah et al., 2015**).
- **Papillome intra canalaire** : c'est une tumeur bénigne développée à partir du canal galactophore. La tumeur est soit unique et souvent rétro mamelonnaire (papillome solitaire qui apparaît après 50 ans) soit multiple et périphérique au niveau des lobules (apparaissent plus tôt 40 ans) (**Bendifallah et al., 2015**).
- **Tumeurs non cancéreuses, rares** : lipome, adénome, neurofibrome, hémangiome, tumeur à cellules granuleuses, phyllode.

3.1.2. Tumeurs malignes du sein

Multiplication anarchique des cellules normales du sein. Ces cellules cancéreuses sont soit du type canalaire ou du type lobulaire soit in situ ou bien infiltrant selon leur degré d'invasion.

3.1.2.1. Cancer *in situ*

- **Carcinome canalaire *in situ* (CCIS)** : est défini comme une prolifération cellulaire monotone et cohésive à l'intérieur d'un canal de lactation (**Sanders *et al.*, 2014**).
- **Carcinome lobulaire *in situ* (CLIS)** : est un carcinome des canalicules intra lobulaire qui définit comme une prolifération de cellules malignes dans le réseau galactophorite, sans franchissement de la membrane basale (**Bodian, 2014**).

3.1.2.2. Carcinome invasif ou infiltrant :

- **Carcinome canalaire infiltrant (CCI)** : ou bien l'adénocarcinome canalaire, c'est le CS le plus fréquent (80%) (**Larribe *et al.*, 2014**) Il prend naissance dans les canaux mammaires, et traverse la membrane basale du canal et envahit progressivement le tissu mammaire. se dissémine aux ganglions via les vaisseaux lymphatiques ou les vaisseaux sanguins, puis fassent des métastases au niveau d'autres organes.
- **Carcinome lobulaire infiltrant (CLI)** : représente 5 à 15% des CS diagnostiqués (**Bergaoui, 2019**). Il prend naissance dans les lobules du sein. Il traverse ces glandes et se propage au tissu mammaire voisin.

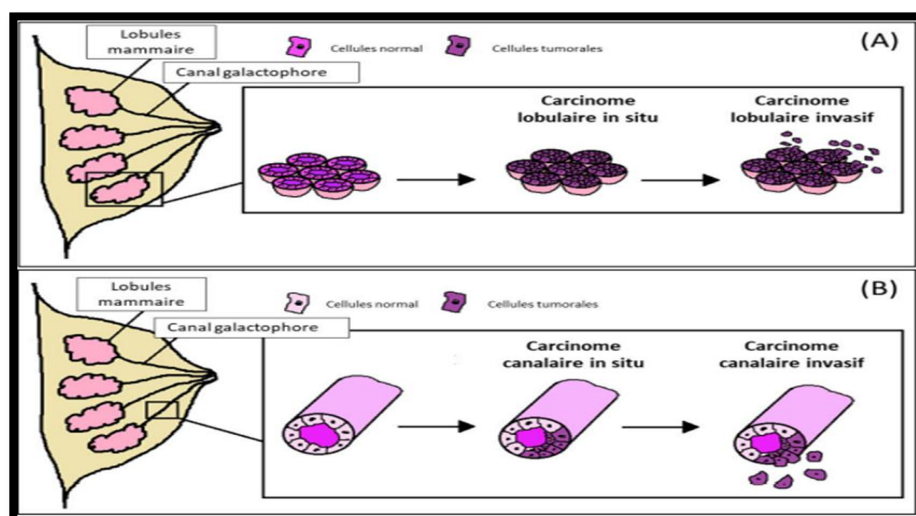


Figure 3 : carcinome lobulaire (A) et carcinome canalaire (B) (**Berrandou, 2018**).

3.2 Classifications selon le stade

La stadification permet d'évaluer l'étendue du cancer du sein. La classification **TNM** est un système de classification le plus utiliser, proposé par « Pierre Denoix » dans les années 1952, basé sur :

- La taille de la tumeur (T)
- L'envahissement ganglionnaire (N).
- La présence de métastases à distance (M) (**Asare et al., 2019**).

Le 1^{er} janvier 2018, la 8^{ème} édition de l'American Joint Comité sur le cancer (AJCC) / Union internationale contre le cancer (UICC) *TNM Cancer Staging Manual* a été officiellement mis en œuvre (**Asare et al., 2019**).

Cette 8^{ème} édition comporte désormais 2 grands volets :

- une classification “anatomique” c'est une classification TNM avec le stade pronostique qui en découle (stades 0, IA/B, IIA/B, IIIA/B/C et IV).
- une nouvelle classification “biologique intrinsèque”, qui associe au TNM des caractéristiques biologiques tumorales, comme le grade histologique, le statut des récepteurs hormonaux, de HER2 et les signatures moléculaires pronostiques (**Triki et Llorca, 2017**).

3.3. Classifications selon le score

La majorité des systèmes de classification du grade tumoral pour le CS combine 3 paramètres morphologiques :

- Le pléomorphisme nucléaire.
- La formation de tubules.
- Le compte de mitoses.

Chaque élément est évalué individuellement. Et un score de 1 à 3 lui est attribué. Le grade histologique résulte de l'addition de ces 3 scores, l'évaluation du grade histologique est effectuée avec deux grades histopronostiques qui permettent de déterminer la nature agressive ou non du CS : le grade de Scarff-Bloom et Richardson (SBR) ou le grade Elston et Ellis (EE) (**Tavassoli et Devilee, 2003**).

Le score total final est utilisé pour déterminer le grade de la manière suivante :

- Les tumeurs de grade I ont un score total de 3-5.
- Les tumeurs de grade II ont un score total de 6-7.
- Les tumeurs de grade III ont un score total de 8 à 9.

3.4. Classification moléculaire

Perou et Sorlie ont proposé pour la première fois la terminologie de "classification moléculaire" dans le CS avec une étude complète montrant les différences d'expression des gènes en 2000 (**Eliyatkin *et al.*, 2015**). La classification moléculaire utilisant immunohistochimie pour refléter l'hormono-réceptivité des tumeurs et d'autres marqueurs cellulaires est devenue de plus en plus utile pour déterminer le traitement et le pronostic. Les sous-types moléculaires du CS, qui reposent sur la présence ou l'absence de récepteurs d'œstrogènes (ER), de récepteurs de progestérone (PR) et du récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2), comprennent : le luminal A (ER+ et/ou PR+ ; HER2-), le luminal B (ER+ et/ou PR+ ; HER2-) et le luminal B (ER+ et/ou PR+ ; HER2+), les cancers de type basal (ER-, PR-, et HER2-), et HER2-enrichi (ER-, PR- et HER2+) (**BYLER *et al.*, 2014**).

Tableau2 : Classification moléculaire de cancer du sein (**Shomaf *et al.*, 2013**).

Type	Hormonal status	Her2/neu
Luminal A	ER+/PR+	-
Luminal B	ER+/PR+	+
BCL	ER+/PR-	-
Her /neu+	ER-/PR-	+

4. Facteurs de risque

Les causes de la survenue du CS sont multiples et les plus clairement identifiées sont représentées par les facteurs liés à la vie reproductive et hormonale, ou au mode de vie (alimentation, manque d'activité physique), ainsi que les facteurs génétiques.

4.1. Facteur génétique

Les femmes ayant des antécédents familiaux de CS ont un risque accru de contracter à leur tour un CS. Les femmes dont la mère ou la sœur est atteinte sont deux fois plus à risque que la population générale (**Stratton *et al.*, 2008**). Moins de 30% des CS sont attribuables à des antécédents familiaux. On estime que 5% à 10% de tous les CS sont héréditaires et attribuables à des prédispositions génétiques (**Evans *et al.*, 2000**), mais les altérations génétiques responsables de ces CS ne sont pas entièrement connues (**Stratton *et al.*, 2008**). Les CS héréditaires sont souvent caractérisés par un diagnostic précoce et un risque en excès de CS bilatéral, Les facteurs génétiques connus pour être impliqués dans le risque de CS consistent en une trentaine de gènes (**Turnbull *et al.*, 2008**).

4.1.1. Gènes rares à forte pénétrance

Les mutations des gènes *BRCA1* et *BRCA2* sont les prédispositions majeures au CS. Les mutations, les réarrangements ou délétions des gènes *BRCA1* et *BRCA2* sont Transmis selon un modèle autosomique dominant. Les défaillances de cette fonction importante contribuent à la tumorigenèse (**Murphy *et al.*, 2010**). De plus, les femmes porteuses d'une mutation BRCA destructrice ont un risque de 60% à 80% de développer un CS au cours de leur vie. D'autre part, d'autres gènes à côté de *BRCA* peuvent être associés au CS. Par exemple : PTEN, TP53, CDH1, STK11 (**Turnbull *et al.*, 2008**).

4.1.2. Gènes rares à pénétrance modérée

De nombreuses études de type « gène candidat » ont été effectuées dans des familles ayant des généalogies suggérant l'existence d'une prédisposition génétique au CS. Ces études ont identifié certains gènes de réparation de l'ADN qui interagissent avec *BRCA1* Et/ou *BRCA2*. En moyenne, les mutations mises en évidence augmentent de deux fois le risque de CS. Parmi ces gènes. On peut citer CHEK2, BRIP1, ATM, PALB2 (**Rahman *et al.*, 2007**).

4.1.3. Allèles communs à faible pénétrance

Ces allèles de susceptibilité sont fréquents dans la population générale (fréquence de L'allèle mineur > 5 %) et sont associés à une augmentation modeste du risque de CS (risque relatif <1,5 ; aucun allèle présentant un risque relatif supérieur à 1,5 n'a été identifié). Les études d'association *pan-génomique* (GWAS) ont permis d'identifier de nombreuses régions (locus) génétiques associés au risque de CS (**Ghoussaini et al., 2013**).

À ce jour, 182 SNP (réparti sur 146 locus) ont été identifiés pour le CS, ce qui permet d'expliquer jusqu'à 18 % d'héritabilité du CS. La majorité des SNP associés au CS sont localisés dans des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose, la croissance cellulaire et la division cellulaire (**Lilyquist et al., 2018**).

4.1.4. Antécédents familiaux

L'histoire familiale, attribuée à des facteurs génétiques similaires parmi les membres d'une même famille est l'un des facteurs de risque établis pour le CS. Le risque de développer un CS est de deux à trois fois supérieur chez les femmes ayant un parent au premier degré (mère, sœur, fille) qui en est atteint. Pour les femmes avec un ou deux membres de la famille au premier degré atteints, le risque cumulé de CS jusqu'à l'âge de 80 ans s'élève respectivement à 13,3 % ou 21,1%. Toutefois, les études épidémiologiques récentes montrent que, même si un risque majoré de CS est retrouvé chez les femmes qui ont des membres de la famille au premier degré atteints de la maladie (**Fernandez, 2005**).

4.2. Facteurs non génétiques

4.2.1. Facteurs hormonaux et reproductifs

- **Grossesse** : Les femmes qui ont eu une grossesse à terme ont un risque accru de CS HR qui atteint son maximum 5 ans après l'accouchement. Cependant, après environ deux décennies, le risque relatif de CS devient légèrement plus faible (d'environ 20 % à 25 %) chez les femmes qui ont accouché que chez celles qui n'ont pas accouché. Le risque est encore réduit chez les femmes qui ont leur premier enfant à un plus jeune âge ou qui ont un plus grand nombre d'enfants. En revanche, le risque accru de CS HR- persiste après une grossesse à terme (**Nichols et al., 2018**).

- **Médicaments de fertilité** : plusieurs études ont montré que le risque de CS n'est pas élevé chez les femmes qui ont recours à la fécondation in vitro (**Van den et al., 2016**). Cependant, les données sont moins claires en ce qui concerne le clomiphène (Clomid), un médicament qui est souvent utilisé comme traitement de première intention pour l'infertilité. Toutefois, le risque de CS invasif était plus élevé chez les femmes ayant subi plus de 12 cycles de traitement au Clomid que chez les femmes n'ayant jamais utilisé de médicaments de fertilité (**Reigstad et al., 2017**).
- **Allaitement** : La plupart des études suggèrent que l'allaitement pendant un an ou plus réduit légèrement le risque global de CS chez la femme, une durée plus longue étant associée à une plus grande réduction du risque. Dans une analyse de 47 études menées dans 30 pays, le risque de CS était réduit de 4 % pour chaque période de 12 mois d'allaitement (**Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2002**). L'effet protecteur pourrait être plus fort pour les cancers triple négatifs, voire limité à ces derniers (**Anstey et al., 2017**).
- **Contraceptifs oraux** : (œstrogènes et progestérone combinés) est associée à une faible augmentation relative (environ 20 %) du risque de CS, en particulier chez les femmes qui commencent à les utiliser avant leur première grossesse. Le risque semble diminuer lorsque les femmes cessent de les utiliser et après environ 10 ans, il est similaire à celui des femmes qui n'ont jamais pris de contraceptifs oraux. Dans l'ensemble, il a été estimé qu'un CS supplémentaire est diagnostiqué pour 7 690 femmes utilisant une contraception hormonale pendant un an (**Mørch et al., 2017**).
- **Ménarche et ménopause** : sont des marqueurs de l'apparition et de l'arrêt, respectivement, de l'activité ovarienne et de l'activité endocrinienne associée à la reproduction. Pendant cette période comprise entre la ménarche et la et la ménopause l'ovaire produit des hormones stéroïdiennes qui affectent directement le développement et la fonction du sein. Les ménarches précoces et la ménopause tardive sont connues pour augmenter le risque de CS chez les femmes (**Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer., 2012**).

4.2.2. Facteurs anthropométriques

- **Taille :** de nombreuses études ont montré que les femmes de grande taille ont un risque plus élevé de CS que les femmes de petite taille (**Elands et al., 2018**). Bien que les raisons ne soient pas entièrement comprises mais elles peuvent refléter des différences dans la croissance précoce ainsi que des facteurs hormonaux ou génétiques. La taille est également associée à un certain nombre d'autres cancers, dont le cancer colorectal et les cancers de l'ovaire.
- **Poids et indice de masse corporelle :** La prise de poids augmente également le risque de CS post-ménopausique (**Keume et al., 2015**). Une vaste méta-analyse a révélé que pour 5 kilogrammes (environ 11 pounds) gagnés à l'âge adulte, le risque de CS post-ménopausique augmente de 11 %. La perte de poids au début de l'âge adulte et après la ménopause est associée à une réduction du risque de CS Dans certaines études, mais pas dans toutes (**Chlebowski et al., 2018**).
- **Densité minérale osseuse :** Une densité minérale osseuse élevée chez les femmes ménopausées a été associée à une augmentation de 60% à 80% du risque par rapport à une densité osseuse faible. Le risque semble être plus fortement lié à la maladie HR+ (**Grenier et al., 2010**). La densité osseuse n'est pas considérée comme un facteur de risque indépendant du CS, mais un marqueur de l'exposition cumulée aux œstrogènes cumulatif (**Kerlikowske et al., 2005**). Cependant, la densité osseuse étant mesurée de façon pour identifier les femmes présentant un risque accru d'ostéoporose (une densité osseuse élevée indique l'absence d'ostéoporose). Elle peut également être utile pour identifier les femmes présentant un risque accru de CS.

4.2.3. Facteurs liés au mode de vie

- **Alimentation :** De nombreuses études ont examiné la relation entre la consommation alimentaire (y compris les graisses, les fibres, le soja, les produits laitiers, la viande, les fruits et les légumes) et le CS. (**Warner et al., 2001 ; Trock et al., 2006**). Avec des résultats mitigés. Une méta-analyse récente a conclu qu'il n'y avait pas d'association entre le CS et consommation de graisses alimentaires (**Cao et al., 2015**). Par ailleurs d'autres études s'intéressant au potentiel

inflammatoire ou anti-inflammatoire de l'alimentation ont suggéré qu'une alimentation de type inflammatoire était associée à un risque accru de CS (**Tabung et al., 2016**).

- **Consommation d'alcool :** De nombreuses études ont confirmé que la consommation d'alcool augmente le risque de CS chez les femmes d'environ 7 % à 10 % pour chaque 10 grammes (environ un verre) d'alcool consommé par jour en moyenne.¹⁴¹ Plusieurs mécanismes ont été évoqués, parmi lesquels l'augmentation de la concentration d'œstrogènes et d'autres hormones liés à la consommation d'alcool (**Assie et al., 2019**), la diminution de l'efficacité de la réparation de l'ADN, la stimulation du métabolisme de substances cancérogènes comme l'acétaldéhyde induisant des dommages à l'ADN (**Gloria et al., 2011**).
- **Consommation de tabac :** une étude menée par des chercheurs de l'American Cancer Society a révélé que les femmes qui ont commencé à fumer plus de 10 ans avant la naissance de leur premier enfant ont un risque de cancer du sein 18 % plus élevé que les femmes qui n'ont jamais fumé (**Gaudet et al., 2013**). Certaines études suggèrent que le tabagisme passif peut augmenter le risque, en particulier lorsque l'exposition a lieu pendant l'enfance et pour le CS préménopausique (**White et al., 2017**).
- **Activité physique :** les femmes qui pratiquent une activité physique régulière ont un risque de CS inférieur de 10 à 20 % par rapport aux femmes inactives, la réduction du risque étant associée à des d'activité physique (**Neilson et al., 2009**). Bénéfice peut être dû aux effets de l'activité physique sur l'inflammation systémique, les taux d'hormones et l'équilibre énergétique (**Mctiernan et al., 2019**).
- **Travail de nuit :** La plupart des études portant sur les infirmières qui travaillent la nuit et des hôtesses de l'air qui subissent une perturbation du rythme circadien causée par la traversée de plusieurs fuseaux horaires ont trouvé un risque accru de CS associé à un emploi de longue durée (**Jia et al., 2013 ; Hansen, 2017**). L'exposition à la lumière de la nuit perturbe la production de mélatonine, une hormone qui régule le sommeil. Des preuves expérimentales suggèrent que la mélatonine peut également inhiber la croissance de petites tumeurs établies et

empêcher le développement de nouvelles tumeurs (**Stevens *et al.*, 2013 ; Fritschi *et al.*, 2011**).

4.2.4. Facteurs environnementaux

- **Rayonnements** : Il a été démontré que l'exposition aux rayonnements augmentait le risque de cancer du sein dans des études portant sur des survivantes de la bombe atomique et des femmes traitées par radiothérapie à forte dose au niveau de la poitrine entre 10 et 30 ans. Le risque de cancer du sein commence à augmenter environ 8 ans après la radiothérapie et reste élevé pendant plus de 35 ans (**Schaapveld *et al.*, 2015**), Bien que les radiothérapies aient évolué pour inclure des doses plus faibles administrées sur des zones plus petites, des études récentes suggèrent que le risque élevé de CS persiste (**Ehrhardt *et al.*, 2019**).

Annexe 1 (Khan N *et al.*, 2010) résume la plupart des facteurs qui sont reconnus pour influencer à divers degrés le risque de développer un cancer du sein.

5. Diagnostic

Le corps de la femme est en constante évolution. Parfois, des changements au niveau des seins, qui semblent normaux peuvent être des signes de cancer. Le CS est généralement détecté soit lors d'un dépistage, avant l'apparition de symptômes, soit après qu'une femme ait remarqué une masse. La plupart des masses observées sur une mammographie et la plupart des bosses dans le sein s'avèrent bénignes (non cancéreuses). C'est dans ce cas qu'intervient le diagnostic.

5.1. Examen clinique

L'examen clinique doit comprendre impérativement un interrogatoire à la recherche d'antécédents personnels et/ou familiaux des patientes, une inspection visuelle ainsi qu'une palpation des deux seins, de la région axillaire et sus-claviculaire (**Le corgne, 2016**).

5.2. Examen mammographique et échographique

La détection précoce du CS par mammographie réduit le risque de décès par CS et augmente les options de traitement, y compris une chirurgie moins importante et/ou l'utilisation d'une chimiothérapie avec moins d'effets secondaires, et parfois, la possibilité de renoncer à la chimiothérapie. L'analyse combinée du dépistage du CS dans les essais randomisés a démontré une réduction globale d'environ 20 % des décès par CS (**Marmotet *et al.*, 2013**). Des résultats plus récents provenant de programmes organisés de mammographie en Europe et au Canada indiquent que le risque de décès par CS a été réduit de plus de 40 % chez les femmes qui ont subi un dépistage (**Tabar *et al.*, 2018**). La mammographie ne permet pas de détecter tous les cancers du sein, et certains CS détectés par le dépistage ont encore un mauvais pronostic (**Nelson *et al.*, 2016**).

L'échographie mammaire est utilisée pour compléter les tests de diagnostic précédent. Effectivement, si une masse est détectée par examen clinique ou par mammographie, l'échographie permettra d'indiquer si cette masse est solide ou remplie de liquide (kyste) (**Le corgne., 2016**).

5.3. Autres techniques d'imagerie

- **Tomodensitométrie** : apparaît très intéressante dans le cadre des cancers inflammatoires car permet un bilan local, difficile à réaliser par les méthodes standards (mammographie et échographie). En cas de cancers volumineux, elle permet un bilan loco-régional et un suivi évolutif objectif sous chimiothérapie.
- **Imagerie par résonance magnétique (IRM)** : L'IRM du sein utilise des aimants puissants, des ondes radio et des ordinateurs pour produire une image. En 2007, l'American Cancer Society a publié des recommandations concernant l'utilisation de l'IRM pour le dépistage des femmes présentant un risque accru de CS (**Saslow *et al.*, 2007**). Il est considéré comme un complément de la mammographie pour les femmes présentant un risque accru de CS. Toutefois, en raison de sa sensibilité élevée, elle permet la distinction entre une tumeur bénigne et une tumeur maligne ainsi que la confirmation de la taille et de l'étendue d'une tumeur (**Menezes *et al.*, 2014**).

6. Traitement

Les décisions de traitement sont prises conjointement par le patient et le médecin après avoir pris en compte le stade et les caractéristiques biologiques du cancer, de l'âge de la patiente, de son statut de ménopause et de ses préférences, ainsi que les risques et des avantages du traitement associés à chaque option.

6.1. Traitement chirurgicale

Les principaux objectifs de la chirurgie du CS sont de retirer le cancer et de déterminer son stade. Le traitement chirurgical implique :

- **Chirurgie conservatrice du sein (BCS)** : également connue mastectomie partielle ou tumorectomie, seuls les tissus cancéreux, ainsi qu'une bordure de tissu normal (marge de la tumeur) enlevés. La *BCS* n'est généralement pas une option dans les cas suivants élevé, des tumeurs multiples dans le même sein, ou des cancers inflammatoires ou localement avancés. Dans la plupart des cas, le *BCS* est suivi d'une radiothérapie du sein (**Albornoz et al., 2015**).
- **Mastectomie** : (ablation chirurgicale de la totalité du sein) Malgré une survie équivalente lorsqu'elle est associée à la radiothérapie, les patientes éligibles pour le *BCS* choisissent de plus en plus souvent la mastectomie pour diverses raisons. Certaines femmes chez qui l'on a diagnostiqué un CS dans un sein choisissent aussi de l'ablation du sein non affecté, ce que l'on appelle la mastectomie ou mastectomie prophylactique controlatérale (MPC) (**Kummerow et al., 2015**).

Les femmes qui subissent une mastectomie peuvent bénéficier d'une reconstruction mammaire, soit avec un implant salin ou en silicone, du tissu provenant d'une autre partie du corps ou une combinaison des deux.

6.2. Chimiothérapie

Le bénéfice de la chimiothérapie dépend de multiples facteurs, notamment la taille de la tumeur et le nombre de ganglions lymphatiques impliqués, ainsi que le statut HR et HER2. Les CS triple négatifs et HER2+ ont tendance à être plus sensibles à la chimiothérapie que les tumeurs HR+ (**Cortazar *et al.*, 2014**).

Il existe également des panels d'expression génétique (tels qu'Oncotype DX, PAM 50 et MammaPrint) qui peuvent contribuer à l'évaluation du risque de récurrence à distance et, éventuellement, à l'évaluation de l'efficacité du traitement (**Siow *et al.*, 2018**).

Lorsqu'une chimiothérapie est administrée aux patients avant chirurgie, on l'appelle néoadjuvante ou préopératoire. Dans le cas de tumeurs mammaires plus importantes, elle est souvent utilisée pour réduire suffisamment la tumeur afin de faciliter l'ablation chirurgicale. La chimiothérapie administrée aux patients après la chirurgie est appelée traitement adjuvant et est utilisée pour tuer les cellules tumorales non détectées (micrométastases).

Le traitement systémique par chimiothérapie peut affecter la fertilité des femmes préménopausées. En outre, elle n'est pas recommandée pendant la grossesse et la chimiothérapie peut provoquer une insuffisance ovarienne prématurée (**Pondé *et al.*, 2018**).

6.3. Radiothérapie

La radiothérapie est souvent utilisée après l'intervention chirurgicale pour détruire les cellules cancéreuses qui restent dans le sein, la paroi thoracique ou l'aisselle et réduire le risque de récurrence (**Castaneda et Strasser, 2017**). Les radiations peuvent également être utilisées pour traiter les symptômes d'un cancer du sein avancé, surtout lorsqu'il s'est propagé au système nerveux central ou aux os, peut être administrée sous forme de faisceau externe, une radiothérapie interne (curiethérapie) ou une combinaison des deux. Le choix de la méthode dépend du type, stade et de la localisation de la tumeur, ainsi que des caractéristiques du patient et des préférences du médecin et du patient. Pour réduire le nombre de traitements, la dose de radiation délivrée par fraction est augmentée. Cela peut également réduire la demande en ressources d'irradiation et être plus pratique pour les femmes (**Hickey *et al.*, 2016**).

6.4. Immunothérapie

Les médicaments d'immunothérapie constituent un domaine émergent du traitement du CS. Ces médicaments stimulent le système immunitaire d'une personne à reconnaître et à détruire les cellules plus efficacement. Les inhibiteurs de points de contrôle sont un type d'immunothérapie qui a été identifié pour traiter certains CS, en particulier le sous-type triple négatif. Les médicaments qui ciblent ces points (comme l'atezolizumab) de contrôle aident restaurer la réponse immunitaire contre les cellules du CS (Schmid *et al.*, 2018).

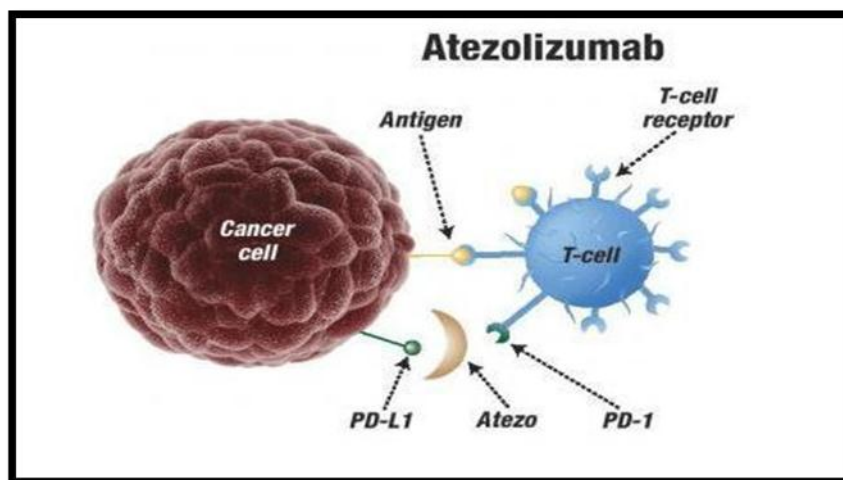


Figure 4 : l'action de l'atezolizumab sur le cancer du sein (Shmid *et al.*, 2018).

6.5. Thérapie ciblée

Plusieurs médicaments sont disponibles pour le traitement du le sous-type HER2+, qui représente environ 15% de tous les CS chez la femme aux États-Unis. Plusieurs médicaments plus récents ont été développés pour cibler la protéine HER2 tel que l'anticorps monoclonal : Le trastuzumab. Tous les cancers du sein invasifs doivent être testés pour la protéine HER2 afin d'identifier les femmes qui pourraient bénéficier de cette thérapie. D'autres médicaments de ciblés supplémentaires, tels que les inhibiteurs de CDK4/6, PARP et PIK3 sont disponibles pour le traitement de certaines patientes à un stade avancé de la maladie. (Masoud *et al.*, 2017).

L'œstrogène, une hormone produite par les ovaires en plus de d'autres tissus, favorise la croissance des CS HR+. Environ 83% et peuvent être traités par une thérapie hormonale pour bloquer les effets des œstrogènes sur la croissance des cellules cancéreuses du sein.

- **Pour les femmes préménopausées :** le tamoxifène pendant une période allant jusqu'à 10 ans est le traitement standard ; toutefois, l'association de la suppression ovarienne et soit le tamoxifène, soit un inhibiteur de l'aromatase est recommandée pour les femmes présentant un risque élevé de récurrence (**Burstein *et al.*, 2018**).
- **Pour les femmes ménopausées :** les inhibiteurs de l'aromatase (le létrozole, l'anastrozole et l'exémestane) sont le traitement hormonal privilégié. La décision de traiter avec un inhibiteur de l'aromatase au-delà de 5 ans est prise individuellement en fonction des facteurs liés au patient et du bénéfice attendu de la réduction du risque de CS ultérieurs (**Burstein *et al.*, 2018**).

I. NAD (P) H : QUINONE OXYDORÉDUCTASE 1

1. NAD (P) H : quinone oxydoréductase 1

Les quinones sont des composés ubiquitaires dans la nature et l'un des éléments indispensables dans les organismes vivants. Ce sont des composés aromatiques transporteurs d'électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale et la chaîne photosynthétique. (**Bolton et Dunlap, 2016**).

Les quinone-réductases sont des oxydoréductases flavine dépendantes. Elles sont ubiquitaires dans le cytoplasme, mais elles n'existent pas dans les mitochondries ni le nucléoplasme (**The Human Protein Atlas, 2019**). Elles catalysent la métabolisation de phase 1 d'une quinone en utilisant comme cofacteur la flavine adénine dinucléotide (FAD). Ces enzymes réduisent la quinone avec 2 électrons pour produire une hydroquinone plus stable est donc potentiellement moins toxique que la semiquinone formée par réduction à 1 électron.

En fait, il existe deux enzymes de type quinone-réductase, la quinone-réductase 1 (QR1) et la quinone-réductase 2 (QR2). Les deux enzymes sont quasiment identiques au niveau structural et au niveau de leur mécanisme de réduction des quinones.

La NAD(P) H : quinone oxydoréductase -1(NQO1), également appelée DPNH(NADH) et TPNH(NADPH) diaphorase ou la DT diaphorase (La DT diaphorase est une flavine adénine dinucléotide (FAD) contenant une flavoprotéine, qui catalyse l'oxydation du NADH et du NADPH par divers colorants et quinones), a été détectée accidentellement en 1958 par Ernster et Navazio dans la fraction soluble d'homogénats de foie, au cours d'études sur les déshydrogénèses de NAD (nicotinamide adénine dinucléotide) et de NADP (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate), il a décrit son fonctionnement cinétique, ses activateurs, ses inhibiteurs et l'a comparée à d'autres protéines utilisant le NADH ou NADPH comme cosubstrat (**Ernster et Navazio, 1958**).

Iyanagi a démontré la capacité de cette enzyme à catalyser la réduction à deux électrons de 020220la p-benzoquinone et de la 2-méthyl-1,4- naphtoquinone (**Iyanagi et Yamazaki, 1970**). Au cours du temps cette enzyme a été nommée quinone-réductase 1 (QR1) puis plus récemment, NQO1. La quinone-réductase 1 est inhibée fortement et spécifiquement par le dicoumarol. Le bleu cibacron et la phénidone sont également connus comme inhibiteurs de QR1 (**Brunmark et Cadenas, 1989; Hosoda et al., 1974**).

2. Gène NQO1

Est un gène anticancéreux, localisé sur le chromosome 16q22.1 (Peng *et al.*, 2014)

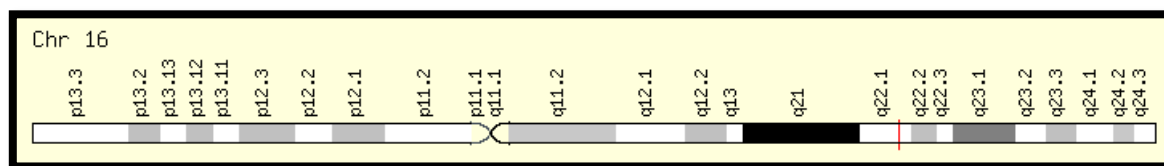


Figure 5 : localisation de gène NQO1 sur le génome humain (Base de données *GeneCards*)

Le gène NQO1 humain est d'environ 18 kb de long et possède six exons interrompus par cinq introns (figure6.). Le site de départ de la transcription a été déterminé par une analyse d'extension d'amorce. Le premier exon a une longueur de 118 pb et code pour deux acides aminés, y compris la méthionine initiale. Dont la méthionine initiale et un G pour le premier codon du deuxième exon. Le sixième exon est le plus grand des exons et a une longueur de 1833 pb. L'analyse de la séquence du sixième exon a révélé la présence de quatre séquences signal de polyadénylation potentielles (AATAAA) et une copie unique de la séquence répétitive Alu. Le deuxième intron est le plus petit de tous les introns (I 16 pb) (Jaiswal, 1991).



Figure 6 : structure du gène NAD(P) H-quinone oxidoreductase 1 (NQO1) (Yu H *et al.*, 2012).

3. Régulation de gène NQO1

Après l'isolement des ADNc humains, la cartographie de restriction et le séquençage ont révélé que le gène NQO1 se compose de six exons et cinq introns pour une longueur approximative de 20 kb. L'exon 1 code les 5 % UT, les deux premiers acides aminés et le premier nucléotide du troisième acide aminé, tandis que les exons 2 à 6 codent les 272 acides

aminés restants et les 3 % UT. Deux éléments régulateurs distincts dans la région flanquante à 5 % du gène NQO1 qui ont été largement étudiés sont l'élément de réponse antioxydant (ARE), également appelé EpRE (élément de réponse électrophile), et l'élément de réponse xénobiotique (XRE), également appelé le AhRE. Il a été démontré que l'ARE et le XRE médient l'induction et la répression de NQO1 dans de nombreux systèmes cellulaires. Les relations structure-fonction au sein du promoteur NQO1 sont maintenant abordées à l'aide de tests fonctionnels, d'analyses mutationnelles et de modèles transgéniques (**Figure 7**)

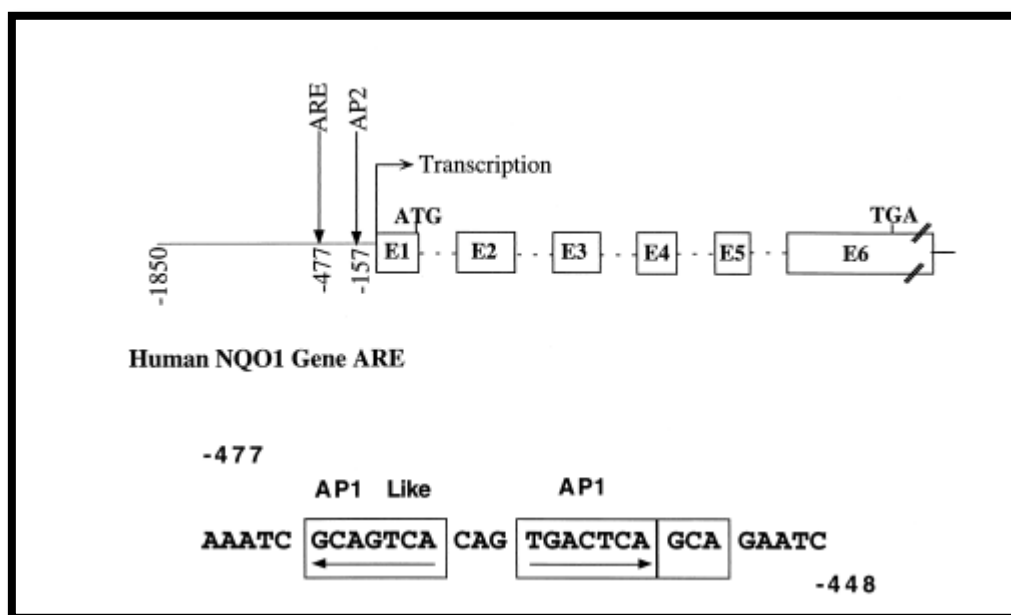


Figure 7 : Structure du gène NQO1 et éléments promoteurs (Jaiswal, 2000).

4. Protéine NQO1

4.1. Structure de la protéine NQO1

La NQO1 est une enzyme homodimérique comportant 274 résidus par monomère, chacun ayant une masse moléculaire estimée à 31 KDA. Chaque sous-unité contient une molécule de flavine adénine dinucléotide (FAD) qui est étroitement liée à deux domaines de chaque monomère, un domaine N-terminal (résidus 1- 220), qui est une domaine catalytique importante, et un domaine C-terminal (résidus 221-274), qui est impliqué dans la démérisation et fait partie du site de liaison pour la portion adénosine du NAD (**Faig et al.,2000**).

Il existe deux sites actifs fonctionnels par dimère, chacun étant situé à l'interface entre les sous-unités. Les molécules de FAD sont attachées de manière non covalente à l'une des parois de chaque site actif, tandis que le reste des limites est constitué de résidus des deux monomères. Les sites actifs sont essentiellement de grandes poches hydrophobes avec trois espaces de liaison définis, l'un pour les parties adénine et ribose du NAD(P)H, un autre pour la molécule de FAD et un dernier pour la partie du NAD(P)H accepteur d'électrons. Les sites actifs de la NQO1 ont la capacité d'accueillir une large gamme de substances telles que les quinones, la vitamine K1 et le dichloroindophénol (DCPIP) (Atia *et al.*, 2014).

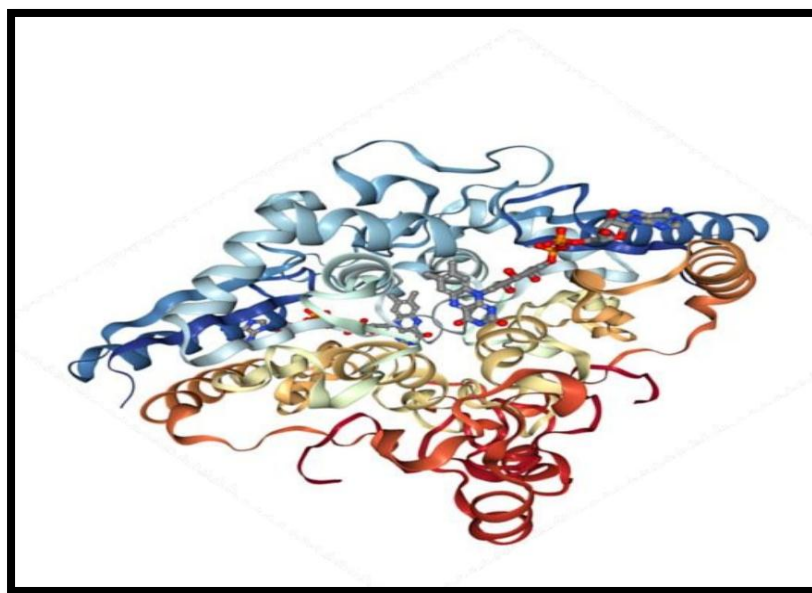


Figure 8 : structure cristalline de la NQO1 humaine (OMIM data base)

4.2. Mécanisme « *Ping-pong* » du NQO1.

La réaction se déroule via un mécanisme enzymatique substitué, également appelé "ping-pong", et la réduction à deux électrons se produit en deux étapes séquentielles (**Figure 9**). Première étape, NAD(P)H réduit le cofacteur FAD lié au site actif de la NQO1, formant NAD(P)⁺ et FADH₂. Ensuite, le NAD(P)⁺ est libéré et l'enzyme peut alors accepter le second substrat, souvent une quinone, qui est réduit par FADH₂ et forme à nouveau du FAD. La forme initiale de l'enzyme est ainsi régénérée, ce qui permet un nouveau cycle de catalyse. Cette réaction est fortement et compétitivement inhibée, par rapport au NAD(P)H, par le dicoumarol, une hydroxycoumarine avec une forte activité anticoagulante, qui se lie dans le

site actif, vraisemblablement en raison de la présence de l'enzyme. Se lie dans le site actif, chevauchant vraisemblablement le site de liaison du NAD(P)H (**Pey et al., 2016**).

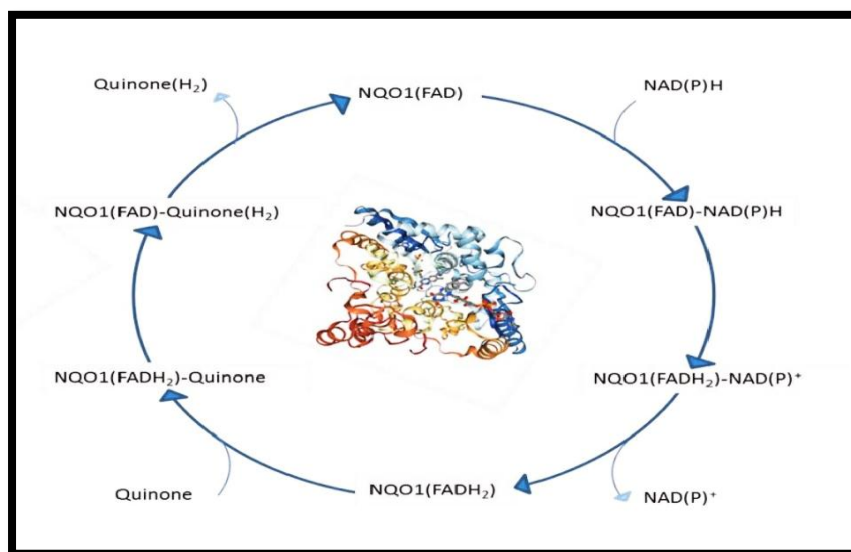


Figure 9 : Mécanisme de « Ping-pong » de la NQO1 (**Laure-Estelle., 2015**).

4.3. Fonctions de la NQO1

4.3.1. Système de détoxification

La NQO1 empêche la formation de semiquinones nuisibles par les réductions obligatoires à deux électrons des quinones exogènes et endogènes, quinoneimines, de composés nitroaromatiques et de colorants azoïques, en hydroquinones stables. Les semiquinones sont des substances très instables qui réagissent rapidement avec l'oxygène moléculaire à un pH physiologique pour former des radicaux libres superoxyde (**Munday, 2004**). En outre, la NQO1 agit en tant qu'enzyme de détoxification de phase II, puisque les produits hydroquinoniques de la réaction de la NQO1 sont transformés en hydroquinones stables (**Pey et al., 2016**). Produits de la réaction de la NQO1 sont des métabolites plus solubles dans l'eau et donc plus facilement excrétés (**Ross et al., 2000**). Ces réductions diminuent les niveaux de quinone, minimisant ainsi les possibilités de participer à des réactions qui pourraient entraîner une déplétion en sulfhydryle. A remarque distincte doit être faite pour la capacité de la NQO1 dans la protection contre les toxicités du benzène (**Bauer et al., 2003**).

4.3.2. Enzyme antioxydante

La NQO1 contribue à maintenir certains antioxydants endogènes dans leur forme réduite et active et ainsi, la NQO1 peut aider à protéger les membranes cellulaires contre les dommages oxydatifs. En particulier, la NQO1 peut réduire l'ubiquinone et la vitamine E quinone dépourvus de potentiel antioxydant, en ubiquinol et en hydroquinone de vitamine E respectivement, deux composés ayant des capacités antioxydantes signalées (**Ross *et al.*,2000**). En outre, NQO1 peut piéger directement le superoxyde libre par réaction avec son cofacteur, produisant du peroxyde d'hydrogène comme produit final de la réaction (**Siegel, 2001**). Bien que la NQO1 élimine le superoxyde moins efficacement que la superoxyde dismutase (SOD), cette propriété de la NQO1 serait particulièrement importante dans les tissus dont l'état de santé est critique. Serait particulièrement importante dans les tissus ayant une faible expression de la SOD, tels que les cellules cardiovasculaires (**Zhu *et al.*, 2007**)

4.3.3. Gardien du protéasome 20S

La NQO1 se lie physiquement au protéasome 20S et protège certaines IDP de la dégradation comme, p33, p53, p63, p73, c-Fos, C/EBP, PGC-1 ou Ornithine décarboxylase (ODC). Il semble que le rôle de régulation de la NQO1 soit conservé au cours de l'évolution (**Ben-Nissan et Sharon ,2014**).

Par ailleurs, il est également important de mentionner l'interaction entre NQO1 et le protéasome 20S puisque, d'une part, NQO1 peut empêcher l'activité protéolytique du protéasome 20S, alors que d'autre part, le protéasome régule les niveaux de NQO1 puisque lorsque NQO1 est à l'état apoptose (NQO1 en l'absence de FAD), la protéine est largement déstructurée et devient un substrat du protéasome 20S (**Ben-Nissan et Sharon, 2014**).

4.3.4. Activateur de promédicaments anticancéreux

Cette fonction de NQO1 est d'un intérêt particulier car, NQO1 est surexprimée dans de nombreux tissus cancéreux par rapport aux tissus normaux. Bioactivation des quinones antitumorales par la NQO1 a été largement démontrée, et différents types de différents types de quinones tels que la mitomycine C (MMC), l'indoloquinone E09, et le aziridinybenzoquinones (AZQ), entre autres, ont été caractérisées comme des quinones bioactivées par cette enzyme (Gutierrez, 2000).

4.3.5. Autres fonctions

La NQO1 est essentiellement connue pour ses capacités antioxydantes et détoxifiantes, bien qu'il s'agisse d'une protéine polyvalente de nouveaux rôles pour cette enzyme sont encore à découvrir (**Figure 10**).

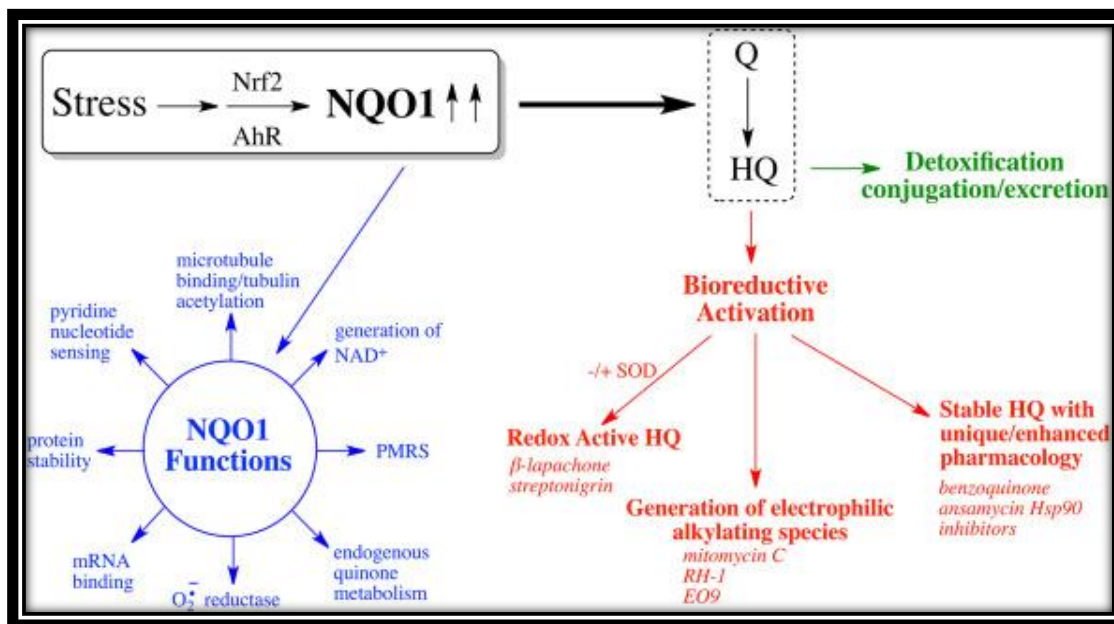


Figure 10 : les fonctions de la NQO1 (Ross et Siegel, 2021).

4.3.6. Localisation cellulaire

La NQO1 est une flavoenzyme largement distribuée dans les tissus humains, avec des niveaux plus élevés dans les cellules épithéliales et endothéliales, en particulier celles du rein et du tractus gastro-intestinal. En outre, cette enzyme est fortement exprimée dans certaines cellules cancéreuses (**Pey et al., 2016**). Au niveau intracellulaire, la NQO1 est essentiellement une enzyme cytosolique, bien qu'elle ait également été localisée en plus petites quantités dans les mitochondries, le réticulum endoplasmique et le noyau (**Danson et al., 2004**).

Bien que la NQO1 se trouve principalement dans le cytoplasme, où elle fonctionne comme une quinone réductase et/ou d'antioxydant, elle peut se transloquer dans le noyau dans conditions stressantes ce qui est considéré comme pertinent pour sa fonction de stabilisation de p53. Il est intéressant de noter qu'une étude récente utilisant à la fois l'immunohistochimie

et la microscopie confocale a démontré qu'elle est associée avec le fuseau mitotique pendant les différentes phases de la mitose (**Kang *et al.*, 2018**).

5. NQO1 et le cancer

Bien qu'une activité NQO1 réduite ou absente ait été corrélée à une susceptibilité accrue au développement de cancers humains, de nombreuses études ont montré que la NQO1 est régulée à la hausse dans un certain nombre de cancers tels que le cancer du sein, le cancer du pancréas, le cancer colorectal, le cholangiocarcinome, le cancer du col utérin, le mélanome et le cancer du poumon (**Ma *et al.*, 2014**). Dans les cancers du sein, du col de l'utérus et du col de l'utérus, on a constaté que l'expression élevée de NQO1 était associée à un stade clinique avancé de la maladie, à une différenciation médiocre et à des métastases des ganglions lymphatiques (**Yang *et al.*, 2014**). De manière cohérente, les patients atteints de cancer du sein et du col de l'utérus avec des niveaux d'expression élevés de NQO1 présentent des taux de survie sans maladie (DFS) et de survie globale (OS) à 5 ans inférieurs à ceux des patients ayant une expression NQO1 plus faible. En outre, l'activité de la NQO1 dans de nombreux cancers est nettement supérieure à celle des tissus normaux adjacents (**Terai *et al.*, 2009**).

De nombreuses preuves ont été publiées suggérant un Effet de NQO1 en biologie du cancer, où il se comporte comme soit un suppresseur de tumeur, soit un promoteur de tumeur NQO1 est exprimé de manière constitutive à des niveaux relativement faibles dans divers tissus normaux dans des conditions physiologiques (**Pey *et al.*, 2016**).

Un certain nombre d'agents anticancéreux potentiels sont activés par réduction catalysée par NQO1. Fait intéressant, un manque d'activité NQO1 est lié à un risque accru de cancer. Forme polymorphe naturelle du gène (C609T ; prévenir l'apoptose des cellules endommagées et potentiellement cancéreuses (**Phillips *et al.*, 2017**).

La validation préliminaire de NQO1 en tant que cible thérapeutique a été réalisée principalement grâce à des expériences de knockdown ARNi. Cependant, les études basées sur l'ARNi ne récapitulent pas nécessairement les effets observés avec les inhibiteurs de petites molécules. Cela a mené s'intéresser au développement d'inhibiteurs NQO1, mais des études avec les inhibiteurs NQO1 actuellement disponibles ne montrent aucune corrélation entre l'inhibition de NQO1 et l'activité anticancéreuse (**Madajewski *et al.*, 2016**).

Plus loin une étude est encore nécessaire pour déterminer si l'inhibition de NQO1 par de petites molécules peuvent être utilisées pour des applications thérapeutiques. Certains inhibiteurs présentent une excellente activité anticancéreuse, en particulier en combinaison avec d'autres agents chimiothérapeutiques, et en plus, les inhibiteurs NQO1 efficaces et sélectifs peuvent servir d'outils avec qui pour étudier la biologie du NQO1 au-delà du knockdown de l'ARNi expériences (Madajewski *et al.*, 2016).

6. Polymorphismes de la NQO1

Il existe deux polymorphismes connus pour ce gène : le polymorphisme NQO1-C609T, abrégé NQO1*2, et le NQO1-polymorphisme C465T, abrégé NQO1*3.

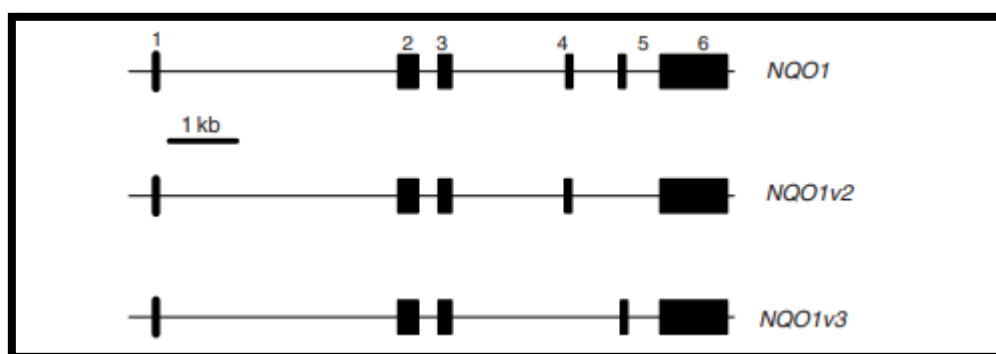


Figure 11 : Structure du gène NQO1 humain et de deux variantes d'épissage répertoriées dans la base de données (Vasiliou *et al.*, 2006).

Plus de 20 SNP ont été découverts dans la NQO1. Le SNP de la NQO1 le plus étudié est l'allèle mutant NQO1*2 caractérisé par une substitution de paires de bases C à T à la position 609 de l'ADNc humain, ce qui entraîne un changement de proline en sérine à la position de l'acide aminé 187. Cela conduit à une modification de la structure tridimensionnelle de la protéine (Ross et Siegel, 2021). La fréquence des allèles mutants homozygotes (NQO1*2/*2) varie considérablement d'une population ethnique à l'autre, allant de 4 % chez les Caucasiens à 34 % dans la population Hmong d'Asie du Sud-Est.

La protéine NQO1*2 mutante présente une stabilité nettement réduite, une capacité de liaison au FAD et une demi-vie considérablement réduite en raison d'une polyubiquitination rapide et d'une dégradation protéasomique, ce qui entraîne la déstabilisation de la protéine NQO1. Le changement P187S déstabilise le dimère NQO1 et augmente la flexibilité du

domaine C terminal (**Pey et al., 2016**). Le phénotype résultant du polymorphisme NQO1*2 mutant est l'absence quasi complète de protéine fonctionnelle chez les individus homozygotes pour l'allèle mutant, tandis que des niveaux réduits de protéine fonctionnelle sont observés chez les individus hétérozygotes (**Ross et Siegel, 2021**).

7. Effet de NQO1*2 sur le CS

La NQO1 est une enzyme qui est impliquée dans le métabolisme de nombreuses quinones endogènes. L'échange de la proline en position 187 par la sérine conduit à une enzyme non fonctionnelle. Les individus homozygotes pour l'allèle 187serine présentent un risque élevé pour de nombreux types de cancers, y compris le CS.

Plusieurs études ont montré une association fortement positive entre le polymorphisme NQO1 C609T et le risque de CS chez des patientes Caucasiennes et Asiatiques (indiennes du nord) atteintes d'un CS (**Yadav et al., 2016 ; Yuan et al., 2010**).

Une méta-analyse a été reconnue comme un outil important pour définir plus précisément l'effet de polymorphismes génétiques sur le risque de CS et d'identifier les sources importantes potentielles d'hétérogénéité en incluant toutes les études disponibles afin de fournir l'évaluation la plus complète possible des associations entre le polymorphisme Pro187Ser de NQO1 et le risque de CS (**Yuan et al., 2010**).

PARTIE 02
PARTIE PRATIQUE

I. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Matériel et méthodes

Dans le cadre de nos travaux sur l'effet de polymorphisme de NQO1*2 sur le cancer du sein, la stratégie méthodologique utilisée consiste une étude moléculaire basée sur la technique de PCR RFLP complété par des études statistiques.

Notre recherche est une étude prospective, Elle a été réalisée entre (avril 2021 et juin 2021) au sein du laboratoire de recherche de biologie moléculaire et cellulaire de l'université des Frères Mentouri Constantine 1 et le laboratoire pédagogique de la biologie moléculaire de la faculté de sciences de la nature et de la vie.

1. Échantillonnage

Notre étude comporte un échantillon de 47 sujettes réparties en deux populations : une population de témoins et une population de patients.

1.1. Population témoin

C'est une population générale de référence, en nombre de 28.

Critères d'inclusion des sujets de sexe féminin, pré résumés seins sans des antécédents familiaux ou personnels du cancer.

Critères d'exclusions ceux qui ont des antécédents familiaux ou personnelles de cancer et ceux qui ont refusé de faire la prise de sang.

1.2. Population Patient

L'échantillon a été repéré de la banque de données de Biologie et Génétique Moléculaire (université Constantine 3). Nous avons pris 19 ADN de patientes atteints d'un CS.

2. Méthodes

2.1. Recueil des données

Un questionnaire comprenant toutes les données nécessaires est établi pour la population témoin (**Annexe 2**). Tous les renseignements nécessaires sont enregistrés après interrogation.

2.2. Prélèvement sanguin

Ce prélèvement doit respecter les critères suivants

- Le prélèvement se fait aux patients répondant aux critères d'inclusion de notre étude.
- L'accord du sujet.
- Le prélèvement est réalisé dans un tube EDTA (Ethylen- Diamin – tetra-acetic Acide), et il s'agit de 6 à 8 ml du sang sous vide.

2.3. Étude moléculaire

Pour une étude moléculaire nous avons employé plusieurs techniques : extraction de l'ADN, la spectrophotométrie, une technique de polymérisation en chaîne (PCR) suivie par une digestion enzymatique par l'enzyme de restriction spécifique *HinfI*.

2.3.1. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN à partir d'un prélèvement sanguin est une technique permettant d'isoler l'ADN contenu dans les leucocytes. La méthode d'extraction choisie est une extraction au NaCl. Les leucocytes sanguins représentent la source majeure d'ADN.

Dans notre travail, l'extraction d'ADN génomique à partir du sang total a été réalisée par la technique de NaCl « *Salting out* ». Suivant cette méthode les leucocytes sont séparés du sang total par une lyse hypotonique et traité ensuite par un détergent sodium dodécyle sulfate (SDS) et une protéinase K, et de cette manière l'ADN nucléaire est libéré dans le milieu. La pelote d'ADN est formée dans le surnageant par précipitation avec l'éthanol. L'ADN est solubilisé en phase aqueuse (**Annexe 3**).

2.3.2. Estimation de la qualité et la quantité d'ADN

a. Estimation qualitative

La concentration d'ADN est déterminée par lecture de la densité optique (DO) à 260 nm sur un spectrophotomètre en sachant que : 1 unité de DO 260 nm = 50 µg / ml d'ADN double brin.

La pureté d'ADN est contrôlée par la détermination du rapport de DO260/ DO280 en mesurant la densité optique des extraits à 260 et 280 nm ces dernières correspondent, respectivement, aux longueurs d'onde d'absorption des acides nucléiques et des protéines, ce rapport permet de s'assurer de la pureté d'ADN de toute contamination d'ADN soit de protéine ou d'ARN.

- Si le rapport DO260/DO280 est compris entre 1.6 et 2 => l'ADN est suffisamment pur.
- Si le rapport DO260/DO280 > 2 => l'ADN est contaminé par les ARN.
- Si le rapport DO260/DO280 < 1,6 => l'ADN est contaminé par les protéines.

L'ADN pur est conservé à -20°C jusqu'à utilisation, et dans le cas de contamination par des ARN ou par des protéines, une réextraction est nécessaire pour un bon usage.

b. Estimation quantitative

Principe

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

$$\mathbf{1 \text{ unité de DO } 260 \text{ nm} = 50 \text{ } \mu\text{g} / \mu\text{l d'ADN double brin}}$$

En prenant en considération que l'ADN obtenu est dilué à 1/100, la quantité obtenue est multipliée par 100 et la concentration est calculée selon la formule suivante :

$$\mathbf{[ADN] \text{ } \mu\text{g} / \mu\text{l} = \text{facteur de dilution} \times \text{DO } 260 \times 50 \text{ } \mu\text{g} / \text{ml}}$$

2.3.3. Génotypage de polymorphisme

Pour la mise en évidence des polymorphismes : C609T du gène NQO1 ; nous avons procédé à un génotypage par la PCR/RFLP qui s'est déroulé selon les étapes suivantes :

- Une amplification par PCR.
- Un contrôle des produits PCR par une électrophorèse sur gel d'agarose.
- Une digestion du produit de PCR par l'enzyme de restriction *HinfI*.
- Une migration électrophorétique sur gel d'agarose pour la séparation des produits de digestion.

2.3.4. Amplification par PCR

La PCR est une méthode de biologie moléculaire permettant d'amplifier des séquences d'ADN cible (l'amplicon) en plusieurs millions d'exemplaires. La PCR est une réaction en chaîne qui consiste à effectuer de 37 cycles successifs d'amplification.

Avant procéder à notre PCR, nous avons préparés un MIX de PCR comprenant des désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP), une enzyme d'amplification in vitro (Taq polymérase), un environnement réactionnel (tampons, MgCl₂, H₂O et deux amorces Oligonucléotidique (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Préparation du milieu réactionnel de la PCR.

Mix de PCR	Concentrations	Quantités μl pour un échantillon
Eau distillé		16.7 μl
Tampon	10X	2.5 μl
MgCl ₂	(25mM)	1.5 μl
dNTP	(5mM)	2 μl
Amorce F	(10pM)	0.5 μl
Amorce R	(10pM)	0.5 μl
Taq polymérase		0.3 μl
ADN cible		1 μl

Échantillon : 24 μl + 1 μl ADN.

Un cycle d'amplification est composé de trois étapes : dénaturation, hybridation et élongation qui se dérouleront à des températures différentes de façon cyclique. Le procédé s'effectue en une trentaine de cycle (**Tableau 4**).

- **Dénaturation :** la première étape s’effectue à la même température de dénaturation initiale. À cette température, l’ADN matriciel, qui sert de matrice au cours de la répliation, est dénaturé : les liaisons hydrogènes ne peuvent pas se maintenir à une température supérieure à 80°C et les ADN doubles brins se dénaturent en ADN simples brins.
- **Hybridation :** la deuxième étape s’effectue à une température généralement comprise entre 50 et 70°C, dite température d’hybridation des amorces. La diminution de la température permet aux liaisons hydrogène de se reformer et donc aux brins complémentaires de s’hybrider. Les amorces qui sont de courtes séquences monocaténares complémentaires à la région encadrant la séquence d’intérêt, s’hybrident aux brins d’ADN matriciel.
- **Élongation :** la troisième période s’effectue à une température de 72°C, dite température d’élngation. À 72°C, la Taq polymérase se lie aux ADN monocaténares amorcés et catalyse la répliation en utilisant les dNTPs.

Tableau 4 : Représentation d’amorces spécifique de NQO1 et leur programme PCR.

Gene	Amorce	Programme de PCR
NQO1	NQO1 (S): 5'- AAG CCC AGA CCA ACT TCT -3' NQO1 (R): 5'- TCT CCT CATCCT GTA CCT CT -3	Dénaturation : 6 min à 94 C° 35 Cycle : 30s à 94 C° 30s à 58 C° 30s à 72 C° Élongation : 10 min à 72

2.3.5. Contrôle des produits PCR

En amont du dépistage des mutations par RFLP, 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 2% (2 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 20 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 d'amplifiant en présence de 2 µl du Bleu de Bromophénol (BBP) qui permet de suivre le front de migration. Parallèlement un échantillon sans ADN (blanc /B) est inclus dans la série à amplifier et sert de contrôle négatif. 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 min. 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.

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).

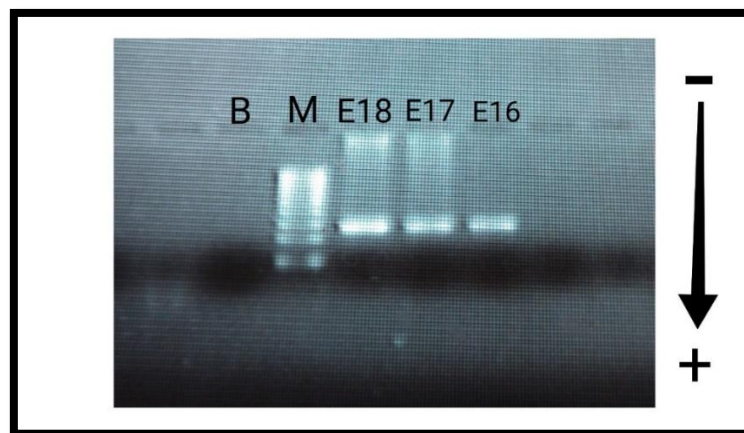


Figure 12 : Résultat observé d'un contrôle des produits PCR (taille 271), B : le contrôle négatif, E : Echantillon, M : marqueur de taille 100pb.

2.3.6. Digestion enzymatique des produits PCR

Les produits PCR sont soumis à une digestion enzymatique par une enzyme de restriction spécifique *HinfI* pour la détection de polymorphisme C609T.

L'enzyme de restriction *HinfI* reconnaît les sites G[^]ANTC et coupe de façon optimale à 37°C. Le reste du produit PCR est réservé et on a rajouté 1µl d'enzyme.

5'-G ↓ANT C-3'

3'-C TNA ↑G-5'

2.3.7. Electrophorèse des produits de la digestion

Les fragments d'ADN digérés par l'enzyme de restriction *HinfI* sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 3% pour le polymorphisme C609T du gène de la NQO1.

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.

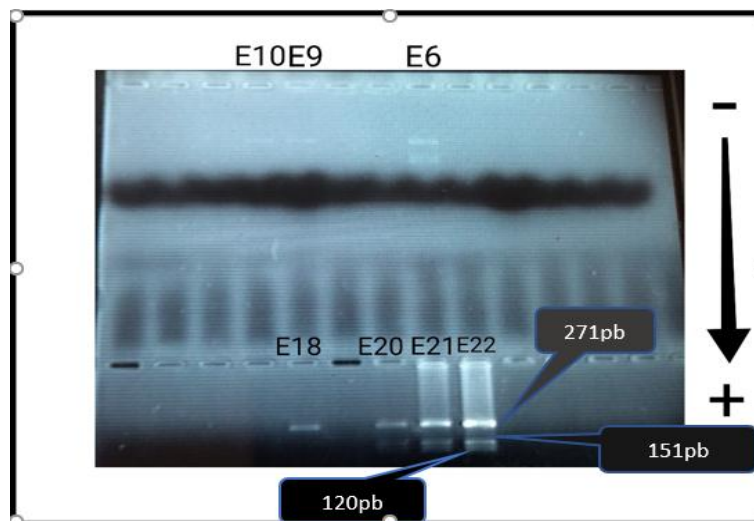


Figure 13 : Photographie d'un profil de digestion du polymorphisme NQO1*2 du gène NQO1.

L'allèle de type sauvage (CC) de NQO1 a été identifié par une bande de 271 pb, tandis que le variant hétérozygote (CT) a été identifiés par une bande de 271 pb et deux bandes de 151 pb et 120 pb. Ainsi, deux bandes 151pb et 120 pb sont observé pour le variant homozygote (TT).

3. Étude statistique analytique

Dans ce travail nous avons effectué une étude statistique vérifiant si une éventuelle association entre le polymorphisme C609T de la NQO1et le survenu d'un CS. L'étude statistique est basée sur l'évaluation d'un odds ratio (OR) est des P valu.

Les calculs statistiques de tous les échantillons obtenus ainsi que tous les paramètres considérés ont été obtenu par le logiciel Epi-info version 6.0.

3.1. Calcul de l'Odds Ratio

Pour calculer l'OR nous avons établi un tableau de contingence : il est sous forme de tableau croise 2x2.le statut malade /non malade des sujets de l'étude est présenté en colonne et le caractère exposé/non expose en ligne.

	Patients	Témoins
Exposé	A	C
Non exposé	B	D

L'intensité de l'association entre le polymorphisme et l'actité cytotoxique est calculée comme suite :

$$\text{OR} = \frac{A \cdot D}{B \cdot C}$$

L'odds ratio représente une mesure d'association épidémiologique entre un facteur et une maladie, en particulier lorsque la maladie est rare parmi la population (Prévalence < 5%). Dans ce cas l'odds ratio peut être une bonne approximation du risque relatif que donnerait une enquête de cohorte de la population.

3.2. Choix de la « p value »

Le seuil critique a priori est de 0.05 (risque α). Si la valeur de p calculée à posteriori est inférieure à ce seuil, la différence entre les paramètres est déclarée statistiquement significative. L'usage a retenue de manière consensuelle l'ensemble des seuils (0.05, 0.01, 0.001) qui représentent des risques raisonnables pour prendre une décision.

I. RÉSULTATS

Résultats

Les fréquences alléliques des différents allèles T et C ainsi que les fréquences génotypiques, les homozygotes T/T, des hétérozygotes C/T et des homozygotes C/C chez les deux populations témoins et malades ont été calculées.

1. Dans la population témoin

Nous avons recruté 28 individus comme témoins pour cette étude. Les résultats obtenus pour la population des témoins sont représentés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme C609T du gène de la NQO1 dans la population témoins.

Gene et polymorphisme	Genotypes	Nombre (%)	Fréquences alléliques
NQO1 C609T	CC	10 (35, 71%)	F(C) = 0.64 F(T) = 0.36
	CT	16 (57, 14%)	
	TT	2 (7, 14%)	

Dans la population Témoin, le génotype hétérozygote CT représente le pourcentage le plus élevé avec 57.14%. Les génotypes sauvage CC et muté TT étaient les moins fréquents avec des pourcentages (35.71%, 7.14%) respectivement.

En calculant les fréquences alléliques, nous avons remarqué une prédominance de l'allèle sauvage avec une fréquence de 64.28 %.

2. Dans la population des patients

Cette étude inclus des patients diagnostiqués d'un CS. Les résultats du génotypage sont mentionnés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme C609T du gène de la NQO1 dans la population patient.

Gène et polymorphisme	Génotypes	Nombre (%)	Fréquences alléliques
NQO1 C609T	CC	11 (57, 89%)	F(C) = 0.76
	CT	7 (36, 84%)	
	TT	1 (5, 26%)	F(T) = 0,24

Les résultats de notre étude montrent une prédominance de la fréquence génotypique sauvage CC chez les patients par contre les homozygotes mutés TT avec un taux de 5.26 %.

La fréquence de l'allèle C est plus importante par rapport à l'allèle T par un taux de 76 %.

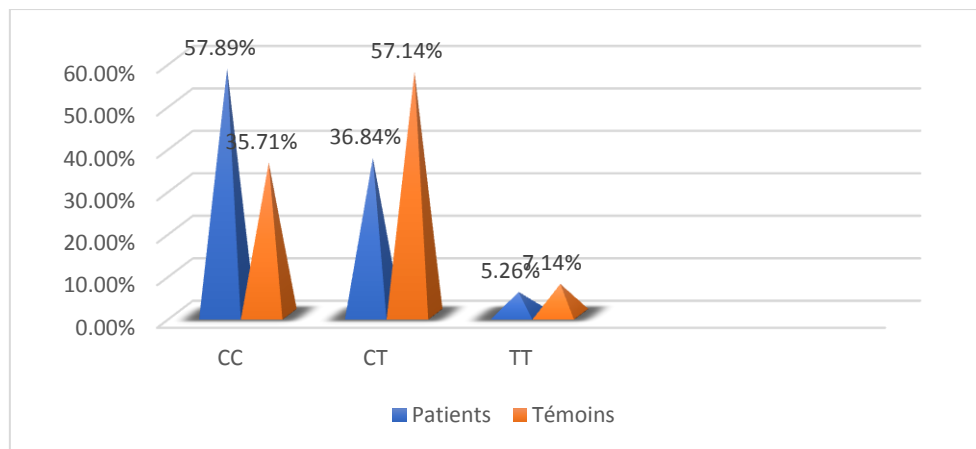


Figure 14 : Comparaison des fréquences génotypiques du polymorphisme NQO1*2 du gène NQO1 entre les témoins et les patients.

La comparaison entre les deux groupes témoins et patients, montre qu'il y a une différence dans la distribution des fréquences génotypique, les hétérozygotes CT étaient plus important chez la population des témoins, tandis que la fréquence le plus grand revient au génotype sauvage chez les patients.

Les homozygotes mutés ont représenté le taux le plus faible dans les deux populations.

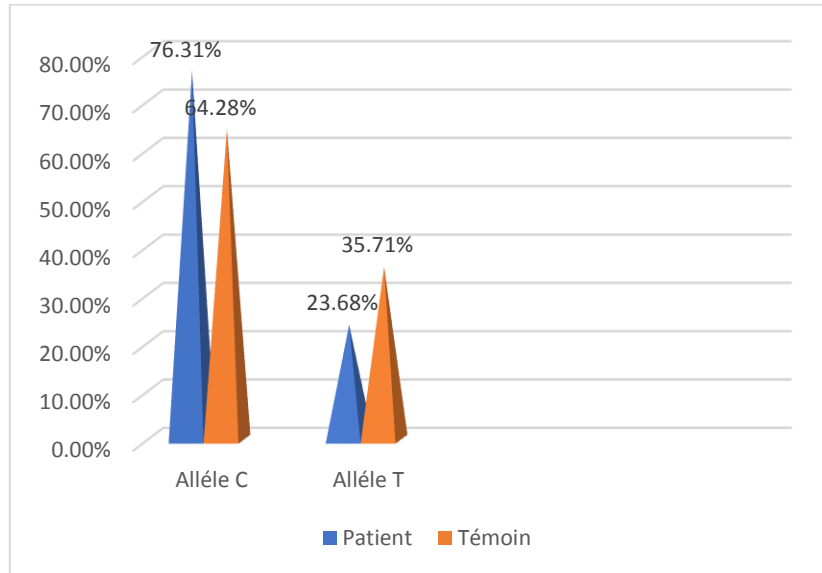


Figure 15 : Comparaison des fréquences alléliques entre les patients et témoins.

Nous avons observé que la fréquence de l’allèle C est prédominante dans les deux populations avec un taux supérieurs de 64.28%.

Tableau 7 : comparaison des fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme C609T du gène NQO1.

NQO1*2 Génotype	Patientes		Témoins		OR	p value
	N	%	n	%		
TT	1	5,26	2	7,14	2.20	0.54
CT	7	36,84	16	57,14	2.57	0.13
CC	11	57,89	10	35,71		
TOTAL	19	100	28	100		
Allèle C	29	76.31	36	64.28		
Allèle T	9	23.68	20	23.68	1.79	0.21

Les résultats observés lors de la comparaison du génotype TT avec le génotype CT montre qu’il n’y a pas une relation significative entre le génotype TT du polymorphisme C609T du gène de la NQO1 et le risque de cancer du sein (avec l’OR= 2.20 ; p= 0.54).

Après le calcul des Odds ratio et des P value la comparaison des génotypes CC et CT, permet de conclure qu'il n'existe pas une association entre le génotype CT du polymorphisme C609T du gène de la NQO1 et le risque de cancer du sein (avec l'OR=2.57 ; P= 0.13).

Cela est confirmé par la comparaison de l'allèle sauvage C avec l'allèle muté T avec un OR= 1.79 ; P=0.21. Ce qui nous permet de conclure que l'allèle muté est ne lié pas à un risque accru de CS.

I. DISCUSSION

Discussion

Notre étude est effectuée sur une population (patient et témoin) nous avons étudié le rôle potentiel du polymorphisme de la NQO1*2 dans la susceptibilité au CS chez les patientes atteintes de cancer du sein.

L'identification du polymorphisme commun dans le gène NQO1 et la démonstration que les génotypes variables de ce polymorphisme NQO1*2 sont attirés l'intérêt de considérables chercheurs ces dernières années. Cependant, il y a eu peu d'études qui ont établi l'impact de polymorphisme C609T de la NQO1 sur le risque de la survenue du CS.

La relation entre le CS et la NQO1*2 peut être récemment identifiée : il s'agit d'une mutation ponctuelle C609T conduisant à une substitution ce qui entraîne un changement de proline en sérine à la position d'acide aminé 187 et à une diminution de l'activité de l'enzyme. Par conséquent, la détermination simultanée préalable de tous les génotypes de NQO1 peut donner une interprétation fiable du rôle de la famille de NQO1 dans le développement de cancer.

Les résultats de notre étude ont montré qu'il n'y a pas une association entre le polymorphisme C609T du gène de la NQO1 et la survenue de cancer du sein ce qui nous a permis de déduire que le polymorphisme C609T du gène de la NQO1 ne représente pas un facteur de risque dans la survenue du CS.

Des résultats semblables ont été observés dans l'étude publiée par (**Singh et al.,2011**) sur des patientes atteintes de CS du nord de l'Inde ont conclu que le polymorphisme NQO1 C609T ne joue pas un rôle significatif dans la prédisposition au CS chez les femmes indiennes.

Cependant, de nombreuses études récentes montrent une forte association entre le polymorphisme NQO1 C609T et le risque de CS, chez les patientes indiennes du nord atteintes d'un CS, de sorte que son utilisation éventuelle comme facteur de risque devrait être étudiée plus avant. Les résultats de (**Yadav et al.,2016**) suggèrent que le génotype hétérozygote présente un risque plus élevé de CS que le génotype 187S homozygote et également suggèrent que le polymorphisme NQO1 C609T peut être associé de manière significative à l'avancement du stade du cancer du sein.

Les progrès exponentiels réalisés dans la compréhension des mécanismes qui président à l'apparition et à la progression des cancers, les avancées technologiques dans les méthodes

d'analyse actuelle disponible ainsi que l'étude des altérations génomiques des cellules tumorales ont mis en évidence des ambiguïtés dans la relation entre notre polymorphisme et le CS.

Dans une future proche la mise en évidence de nouveaux biomarqueurs du CS est fortement demandée pour confirmer nos résultats. Ainsi la taille de notre échantillon n'était pas vraiment importante, une étude plus large est nécessaire.

CONCLUSION

Conclusion

Notre travail a porté sur le potentiel effet du polymorphisme NQO1*2 sur le risque de CS. Ce polymorphisme affectant le gène NQO1, localisé sur le chromosome 7, consiste en une substitution C à T en position 609 de l'exon 6 du gène qui remplace la proline en sérine en position 187.

L'étude que nous avons entreprise est une étude de type cas-témoins concernant 42 sujets. Les résultats de notre travail ont montré que la distribution des fréquences génotypiques était dissemblable et qu'il n'y a pas une association significative entre le polymorphisme C609T du gène de la NQO1 et la survenue de CS.

Cependant, ces résultats ne peuvent être généralisée à l'ensemble de la population algérienne, vu la taille de l'échantillon très réduite, les difficultés rencontrées lors de la réalisation de PCR en plus du temps imparti pour l'analyse moléculaire, la pénurie des matériels moléculaires soit les machines ou bien les produits principaux pour l'étude.

Comme perspectives de notre travail, il serait intéressant de poursuivre la recherche sur ce thème en :

- ❖ Elargissant la taille de l'échantillon étudié que ce soit en termes de témoins ou de patients
- ❖ Engageant d'autres polymorphismes de gène NQO1
- ❖ Développant l'étude sur le gène NQO1, en étudiant sa fonction ce qui va permettre de mieux comprendre l'étiologie et son implication dans la cancérogénèse mammaire
- ❖ Recherchant les influences potentielles d'autres polymorphismes des gènes impliqués dans la pathogenèse de la CS.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- ✚ Anstey, E H, Shoemaker, ML, Barrera, CM, O'Neil, ME, Verma, AB., & Holman, DM. (2017). Breastfeeding and Breast Cancer Risk Reduction: Implications for Black Mothers. *American Journal of Preventive Medicine*, 53(3): S40–S46.
- ✚ Asare, EA, Grubbs, E G, Gershenwald, JE, Greene, FL., & Aloia, TA. (2019). Setting the “stage” for Surgical Oncology fellows: Pierre Denoix and TNM staging. *Journal of Surgical Oncology*. 119(7):823.
- ✚ Assi, N, Rinaldi, S, Viallon, V, Dashti, S G, Dossus, L, Fournier, A, Ferrari, P. (2019). Mediation analysis of the alcohol- postmenopausal breast cancer relationship by sex hormones in the EPIC Cohort. *International Journal of Cancer*.
- ✚ Bendifallah, S, Canlorbe, G . (2015). Prise en charge des tumeurs bénignes du sein épidémiologiquement fréquentes de type adénofibrome, phyllode (grade 1 et 2), et papillome : recommandations. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction*, 44(10), 1017-1029, ISSN 0368-2315.,
- ✚ Bergaoui, H, El Mhabrech, H, Zouari, I, Njima, M, Daldoul, A, Ahmed, H, Faleh, R. (2019). Le carcinome lobulaire infiltrant du sein : à propos de 30 cas. *Pan African Medical Journal*, 34(70).
- ✚ Boardman, L A, S N Thibodeau, DJ Schaid, N M et al. (1998). Increased risk for cancer in patients with the Peutz-Jeghers syndrome. *Ann Intern Med* 128(11): 896-899.
- ✚ Bodian CA, Espié M., Page DL & Roquancourt A. (2014). Prise en charge thérapeutique du carcinome lobulaire in situ . Article paru dans le *Genesis*., N°180.
- ✚ Bolton, JL, & Dunlap, T. (2016). Formation and Biological Targets of Quinones: Cytotoxic versus Cytoprotective Effects. *Chemical Research in Toxicology*, 30(1), 13–37.
- ✚ Brunmark, A et Cadenas, E. (1989), Redox and addition chemistry of quinoid compounds and its biological implications. *Free Radical Biology and Medicine*, 7 (4), 435- 477.
- ✚ Cao, Y, Hou, L, & Wang, W. (2015). Dietary total fat and fatty acids intake, serum fatty acids and risk of breast cancer: A meta-analysis of prospective cohort studies. *International Journal of Cancer*, 138(8), 1894–1904.

- ✚ Cassagnes, L.,E. (2015). Cycle redox quinone-quinone réductase 2 et conséquences sur la production d'espèces oxygénées réactives dans le contexte cellulaire. Biologie cellulaire. Université Paul Sabatier - Toulouse III
- ✚ Chlebowski, R. T, Luo, J, Anderson, G. L., Barrington, W, Reding, K, Simon, M. Stefanick, M. L. (2018). Weight loss and breast cancer incidence in postmenopausal women. *Cancer*.
- ✚ Danson, S, Ward, T, Butler, J, & Ranson, M. (2004). DT-diaphorase: a target for new anticancer drugs. *Cancer Treatment Reviews*, 30(5), 437–449.
- ✚ David Ross, David Siegel. (2021). The diverse functionality of NQO1 and its roles in redox control, *Redox Biology*, Volume 41, 101950.
- ✚ Drake R., Richard L, Vogl A.et al. (2010). *Gray's anatomie pour les étudiants*
- ✚ Ehrhardt, M. J, Howell, C. R, Hale, K, Baassiri, M. J, Rodriguez, C, Wilson, C. L, Hudson, M. M. (2019). Subsequent Breast Cancer in Female Childhood Cancer Survivors in the St Jude Lifetime Cohort Study (SJLIFE). *Journal of Clinical Oncology*,37(19):1647-1656.
- ✚ Elands, R. J, Offermans, N. S, Simons, C. C, Schouten, L. J, Verhage, B. A., van den Brandt, P. A., & Weijenberg, M. P. (2018). Associations of adult-attained height and early life energy restriction with postmenopausal breast cancer risk according to estrogen and progesterone receptor status. *International Journal of Cancer*.
- ✚ Eliyatkin, N, Yalcin, E, Zengel, B, Aktaş, S, & Vardar, E. (2015). Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way. *Journal of Breast Health*, 11(2), 59–66.
- ✚ Emilie A, Lise-Marie B, Frederique M, et al. (2005). binding of the methyl binding domain protein 2 at the BRCA1-NBR2 locus. *Nucleic Acids Research* 33: 4243–4254.
- ✚ Ernster, L. et Navazio, F., 1958. Soluble diaphorase in animal tissues. *Acta Chemica Scandinavica* 12 (3), 595-602
- ✚ Evans, J. P, C. Skrzynia, L. Susswein, et al. (2005). Genetics and the young woman with breast cancer. *Breast Dis* 23: 17-29.
- ✚ Faig, M, Bianchet, M. A, Talalay, P, Chen, S, Winski, S, Ross, D. et Amzel, L. M. (2000), Structures of recombinant human and mouse NAD(P)H:quinone oxidoreductases: Species comparison and structural changes with substrate binding and release. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (7), 3177- 3182.

- ✚ Ferlay J, Shin HR, Bray F et al. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer: GLOBOCAN. *Int J Cancer*, 127:2893–2917.
- ✚ Fritschi, L., Glass, D. C., Heyworth, J. S., Aronson, K., Girschik, J., Boyle, T., ... Erren, T. C. (2011). Hypotheses for mechanisms linking shiftwork and cancer. *Medical Hypotheses*, 77(3), 430–436.
- ✚ Galgani JE, Uauy RD, Aguirre CA et al. (1990). Effect of the dietary fat quality on insulin sensitivity. *Br J Nutr*, 100 (3) 471-479.
- ✚ Gaudet, M. M, Gapstur, S. M, Sun, J, Diver, W. R, Hannan, L. M, & Thun, M. J. (2013). Active Smoking and Breast Cancer Risk: Original Cohort Data and Meta-Analysis. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 105(8), 515–525.
- ✚ Ghoussaini, M, P. D. P. Pharoah and D. F. Easton et al. (2013). Inherited genetic susceptibility to breast cancer: the beginning of the end or the end of the beginning?" *The American Journal of Pathology* 183(4): 1038-1051.
- ✚ Gloria D, C, Jeannette ,B, Jennifer ,L, PhC. (2011). Alcohol consumption and the risk of breast cancer. *salud pública de méxico*. 53(5).
- ✚ Grenier, D, Cooke, A. L, Lix, L, Metge, C, Lu, H, & Leslie, W. D. (2010). Bone mineral density and risk of postmenopausal breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 126(3), 679–686.
- ✚ Habour, N, N et al. (2007). Eude épidémiologique et anatomopathologique du cancer de sein dans l'ouest algérien et recherche de quelque facteur risques. *Oran essenia* 81 - 44.
- ✚ Hamdi Cherif, M, Kara, L, Atoui, S, Boudefar F. (2020). Données épidémiologiques du cancer dans l'Est et le Sud-Est Algérien 2014-2017 *Algerian Journal of Health Sciences*. 9(14).
- ✚ Hansen, J. (2017). Night Shift Work and Risk of Breast Cancer. *Current Environmental Health Reports*, 4(3), 325–339.
- ✚ Hosoda S, Nakamura W, Hayashi K. (1974). Properties and reaction mechanism of DT diaphorase from rat liver. *J Biol Chem*. 249(20):6416-23. PMID: 4138437.
- ✚ Iyanagi, T. et Yamazaki, I. One-electron-transfer reactions in biochemical systems V. (1970). Difference in the mechanism of quinone reduction by the NADH dehydrogenase and the NAD(P)H dehydrogenase (DTdiaphorase). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 216 (2), 282- 294.

- ✚ Jemal A., Bray F., Center MM., et al. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 61:69–90.
- ✚ Jia, Y, Lu, Y, Wu, K, Lin, Q, Shen, W, Zhu, M., Chen, J. (2013). Does night work increase the risk of breast cancer? A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *Cancer Epidemiology*, 37(3), 197–206.
- ✚ Joubert & Francis (1984). *Anatomie pathologique gènèrale*, Masson, paris p : 155.
- ✚ Kang, H.-J., Song, H. Y., Guo, Y., Ahmed, M. A., Zhang, M., Chen, C., ... Vassilopoulos, A. (2018). NQO1 regulates mitotic progression and response to mitotic stress through modulating SIRT2 activity. *Free Radical Biology and Medicine*.
- ✚ Kerlikowske, K., Shepherd, J., Creasman, J., Tice, J. A., Ziv, E., & Cummings, S. R. (2005). Are Breast Density and Bone Mineral Density Independent Risk Factors for Breast Cancer? *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 97(5), 368–374.
- ✚ Keum, N., Greenwood, D. C., Lee, D. H., Kim, R., Aune, D., Ju, W., Giovannucci, E. L. (2015). Adult Weight Gain and Adiposity-Related Cancers: A Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Observational Studies. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 107(2).
- ✚ Kim, SY., Mori, T., Chek, M.F. et al. (2021). Structural insights into vesicle amine transport-1 (VAT-1) as a member of the NADPH-dependent quinone oxidoreductase family. 11 (2120)
- ✚ Lacroix-Triki .M, Penault-Llorca F., (2017). Classification TNM pour le cancer du sein (8e édition). *Correspondances en Onco-Théranostic.*, 5 (3)., 130-131.
- ✚ Lavoué, V., Fritel, X., Antoine, M., Beltjens, F., Bendifallah, S., Boisserie-Lacroix, M., ... Daraï, E. (2015). Tumeurs bénignes du sein : recommandations pour la pratique clinique du Collège national des gynécologues et obstétriciens français (CNGOF) – Texte court. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de La Reproduction*, 44(10), 1049–1064.
- ✚ Lilyquist, J., K. J. Ruddy, C. M. Vachonet al (2018) "Common Genetic Variation and Breast Cancer Risk-Past, Present, and Future." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 27(4): 380-394.

- ✚ Ma, Y., Kong, J., Yan, G., Ren, X., Jin, D., Jin, T., ... Lin, Z. (2014). NQO1 overexpression is associated with poor prognosis in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *BMC Cancer*, 14(1).
- ✚ Macgrogan G (2016). Anatomie pathologique des cancers du sein en phase précoce. In: *Cancer du sein*. Elsevier Masson SAS. France, 35.
- ✚ Malone KE, Daling JR, Thompson JD, et al (1998). BRCA1 mutations and breast cancer in the general population: analyses in women before age 35 years and in women before age 45 years with first-degree family history. *279: 922–9*.
- ✚ Manfred S, Andreas C, Larissa S al (2002). BRCA2: a genetic risk factor for breast cancer. *Cancer Letters*, 1–8.
- ✚ MCTIERNAN, A., FRIEDENREICH, C. M., KATZMARZYK, P. T., POWELL, K. E., MACKO, R., BUCHNER, D., ... PIERCY, K. L. (2019). Physical Activity in Cancer Prevention and Survival. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 51(6), 1252–1261
- ✚ Mørch, L. S., Skovlund, C. W., Hannaford, P. C., Iversen, L., Fielding, S., & Lidegaard, Ø. (2017). Contemporary Hormonal Contraception and the Risk of Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 377(23), 2228–2239
- ✚ Murphy, C. G. & M. E. Moynahan (2010). BRCA gene structure and function in tumor suppression: a repair-centric perspective. *Cancer J* 16(1): 39-47.
- ✚ Neilson, H. K., Friedenreich, C. M., Brockton, N. T., & Millikan, R. C. (2009). Physical Activity and Postmenopausal Breast Cancer: Proposed Biologic Mechanisms and Areas for Future Research. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 18(1), 11–27.
- ✚ Nichols, H. B., Schoemaker, M. J., Cai, J., Xu, J., Wright, L. B., Brook, M. N., ... Sandler, D. P. (2018). Breast Cancer Risk After Recent Childbirth. *Annals of Internal Medicine*
- ✚ Peng, Q., Lu, Y., Lao, X., Chen, Z., Li, R., Sui, J., ... Li, S. (2014). The NQO1 Pro187Ser polymorphism and breast cancer susceptibility: evidence from an updated meta-analysis. *Diagnostic Pathology*, 9(1), 100.

- ✚ Pey, A. L., Megarity, C. F., Medina-Carmona, E., and Timson, D. J. (2016). Natural small molecules as stabilizers and activators of cancer-associated NQO1 polymorphisms. *Curr. Drug Targets* 17(13), 1506–1514.
- ✚ Rahman, N., S. Seal, D. Thompson, P. et al (2007). PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nat Genet* 39(2): 165-167.
- ✚ Reigstad, M. M., Storeng, R., Myklebust, T. Å., Oldereid, N. B., Omland, A. K., Robsahm, T. E., ... Larsen, I. K. (2017). Cancer Risk in Women Treated with Fertility Drugs According to Parity Status—A Registry-based Cohort Study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 26(6), 953–962.
- ✚ Ross, D. & Siegel, D. (2021). The diverse functionality of NQO1 and its roles in redox control. *Redox Biology*, 41.
- ✚ Sancho-Garnier, H., & Colonna, M. (2019). *Épidémiologie des cancers du sein. La Presse Médicale*, 48(10) :1076-1084.
- ✚ Sanders, M. E., Schuyler, P. A., Simpson, J. F., Page, D. L., & Dupont, W. D. (2014). Continued observation of the natural history of low-grade ductal carcinoma in situ reaffirms proclivity for local recurrence even after more than 30 years of follow-up. *Modern Pathology*, 28(5), 662–669.
- ✚ Schaapveld, M., Aleman, B. M. P., van Eggermond, A. M., Janus, C. P. M., Krol, A. D. G., van der Maazen, R. W. M., ... van Leeuwen, F. E. (2015). Second Cancer Risk Up to 40 Years after Treatment for Hodgkin's Lymphoma. *New England Journal of Medicine*, 373(26), 2499–2511.
- ✚ Shomaf, M., Masad, J., Najjar, S., & Faydi, D. (2013). Distribution of breast cancer subtypes among Jordanian women and correlation with histopathological grade: molecular subclassification study. *JRSM Short Reports*, 4(10)
- ✚ Stevens, R. G., Brainard, G. C., Blask, D. E., Lockley, S. W., & Motta, M. E. (2013). Breast cancer and circadian disruption from electric lighting in the modern world. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 64(3), 207–218.
- ✚ Stratton, M. R. & N. Rahman (2008). The emerging landscape of breast cancer susceptibility. *Nat Genet* 40(1): 17-22.
- ✚ Tabung, F. K., Steck, S. E., Liese, A. D., Zhang, J., Ma, Y., Caan, B., ... Hébert, J. R. (2016). Association between dietary inflammatory potential and breast cancer

incidence and death: results from the Women's Health Initiative. *British Journal of Cancer*, 114(11), 1277–1285.

- ✚ Takiy Eddine Berrandou. Gènes du métabolisme des xénobiotiques : rôle prédictif dans les niveaux de contamination biologique par les polluants environnementaux et implication dans le risque de cancer du sein. Analyse de l'étude CECILE. *Cancer*. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. Français.
- ✚ Tavassoli FA, Devilee P., (2003). Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. WHO Classification of Tumours.,4(13),
- ✚ Terai, K., Dong, G.-Z., Oh, E.-T., Park, M.-T., Gu, Y., Song, C. W., & Park, H. J. (2009). Cisplatin enhances the anticancer effect of β -lapachone by upregulating NQO1. *Anti-Cancer Drugs*, 20(10), 901–909.
- ✚ The Human Protein Atlas, Cell Atlas, NQO1, 2019a, consulté le 27 mars 2019. disponible sur: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000181019-NQO1/cell>
- ✚ Turnbull, C. & N. Rahman (2008). Genetic predisposition to breast cancer: past, present, and future. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 9: 321-345.
- ✚ Van den Belt-Dusebout, A. W., van Leeuwen, F. E., & Burger, C. W. (2016). Breast Cancer Risk After Ovarian Stimulation for In Vitro Fertilization—Reply. *JAMA*, 316(16), 1713
- ✚ Vasiliou, V., Ross, D., & Nebert, D. W. (2006). Update of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO) gene family. *Human Genomics*, 2(5), 329.
- ✚ White, A. J., D'Aloisio, A. A., Nichols, H. B., DeRoo, L. A., & Sandler, D. P. (2017). Breast cancer and exposure to tobacco smoke during potential windows of susceptibility. *Cancer Causes & Control*, 28(7), 667–675.
- ✚ Yang, Y., Zhang, Y., Wu, Q., Cui, X., Lin, Z., Liu, S., & Chen, L. (2014). Clinical implications of high NQO1 expression in breast cancers. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 33(1), 14.
- ✚ Yu H, Liu H, Wang LE, Wei Q (2012) A functional NQO1 609C>T polymorphism and risk of gastrointestinal cancers: A meta-analysis. *PloS ONE* 7: e30566.
- ✚ Yuan, W., Xu, L., Chen, W., Wang, L., Fu, Z., Pang, D., & Li, D. (2010). Evidence on the association between NQO1 Pro187Ser polymorphism and breast cancer risk in the current studies: a meta-analysis. *Breast Cancer Research and Treatment*, 125(2), 467–472.

- ✚ Zoubida Zaidi, Hussain Adlane Dib. The worldwide female breast cancer incidence and survival, (2018). In: Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2019; 2019 Mar 29-Apr 3; Atlanta, GA. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res 2019;79(13): 4191.
- ✚ Zucca-Matthes G, Urban C, Vallejo A.(2016).Anatomy of the nipple and breast ducts. Gland Surg;5(1):32-36.

ANNEXES

Annexe 1

Facteurs reproductifs	
Puberté précoce	↑↑
Forte densité mammaire	↑↑
Nulliparité	↑↑
Grossesse après 40 ans	↑
Ménopause tardive	↑
Nombre élevé de grossesse à terme	↓
Allaitement	↓
Facteurs environnementaux et habitudes de vie	
Provenance: Amérique du Nord ou Europe	↑↑
Exposition à des radiations	↑
Prise de contraceptifs oraux	↑
Traitements hormonaux substitutifs	↑
Alimentation riche en gras saturé	↑
Consommation d'alcool	↑
Déficiences en folate	↑
Classe socioéconomique élevée	↑
Provenance: Afrique ou Asie	↓↓
Exercice physique	↓
Facteurs génétiques	
Histoire familiale	↑↑
Mutations de forte pénétrance (BRCA1/2)	↑↑
Mutations de faible pénétrance	↑
Autres facteurs	
Âge avancé	↑↑
Affections mammaires antérieures bénignes	↑↑
Grande taille	↑
Poids élevé à la naissance	↑

↑↑: Forte augmentation du risque ↑: Augmentation modérée du risque

↓↓: Forte diminution du risque ↓: Diminution modérée du risque

Annexe 2

FICHE DE RECUEIL D'INFORMATION/ TEMOIN (FEMME)

CARACTÉRISTIQUES SOCIO-DÉMOGRAPHIQUES

Nom :

Prénom :

Date/lieu de naissance :

Lieu d'habitat : Urbain Rural

Etat civil : célibataire mariée divorcée veuve

Enfants : OUI NON Si oui, préciser le nb d'enfants (inclure les enfants décédés) :

Niveau d'étude : analphabète primaire moyen secondaire supérieur

Profession : active retraitée femme au foyer étudiante

Si active ou retraitée, préciser l'activité principale :

CARACTÉRISTIQUES PHYSIQUES

Poids actuel : Kg

Taille actuelle : Cm

MODE DE VIE

Consommation du tabac :

Fumeuse : OUI NON Si Oui,paquet/j, depuisans

Ancienne fumeuse : OUI NON Si Oui,paquet/j, duréeans

Consommatrice du tabac à chiquer : OUI NON Si Oui, préciser, fois/j, depuisans

Ancienne consommatrice du tabac à chiquer : OUI NON Si Oui, préciser, fois/j, duréeans

Consommation d'alcool :

Actuellement : OUI NON Si Oui, préciser, ...fois/mois, depuisans

Au passé : OUI NON Si Oui, préciser, ...fois/mois, duréeans

Consommation de caféine : OUI NON Si Oui, préciser, ...tasse/j

Exposition à certains produits : OUI NON

Si OUI, préciser : pesticides herbicides métaux lourds produits chimiques

Préciser la durée de l'exposition : ans

RENSEIGNEMENTS CLINIQUES SUPPLEMENTAIRES

Age de la ménarche :ans

Cycle menstruel : régulier irrégulier

Nb de grossesses normales : Nb de grossesses arrêtées : Pas de grossesses :

Nb de fausses couches spontanées : Prise de contraception durée

ANTECEDENTS MEDICAUX FAMILIAUX : OUI NON

Si Oui, préciser :

.....

Annexe 3: Technique d'extraction de l'ADN

A .Préparation des leucocytes

- ✓ Dans un type Falcon de 50 ml ; mettre le sang total et compléter à 25 ml avec du (TE) Tris EDTA 20 :5.Laisser 10 min dans la glace.
- ✓ Centrifuger 10 min à 3900g (3800rpm).
- ✓ Aspirer le surnageant avec la trompe à vide.
- ✓ Ajouter quelques ml de TE 20 :5 au culot et le remettre en suspension avec une pipette stérile.
- ✓ Compléter à 25 ml avec du TE 20 :5 au culot et laisser 10 min dans la glace.
- ✓ Centrifuger dans les mêmes conditions précédentes.
- ✓ Aspirer le surnageant avec la trompe à vide : obtention du culot leucocytaire.

B. Extraction de l'ADN

- ✓ Transvaser le culot de leucocytes dans un tube Falcon de 15 ml.
- ✓ Ajouter 3 ml de tampon de lyse en dilacérant le culot avec passette stérile.
- ✓ Ajouter 200 µl de SDS à 10%.
- ✓ Ajouter 100µl de protéinase K à 10mg/ml.
- ✓ Agiter le tube sur une roue à 37°C pendant une nuit.
- ✓ Le lendemain ; refroidir dans la glace.
- ✓ Ajouter 1 ml de NaCl 4M et agiter rigoureusement à la main.
- ✓ Remettre 3 mn dans la glace (précipitation des protéines).
- ✓ Centrifuger 15mn à 2500 rpm.
- ✓ Transverse le surnageant dans un tube Falcon de 50 ml ; ajouter 2 fois son volume d'éthanol absolu préalablement refroidi et agiter en tournant 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 rincer 2 fois dans l'éthanol à 70%.
- ✓ Mettre la pelote dans un tube nunc.

C. Solubilisation

- ✓ Ajouter entre 300 et 1000 µl de TE 10 :1, selon la grosseur de la pelote et la concentration souhaitée.
- ✓ Laisser une nuit sur un agitateur rotateur à 37 °C puis à température ambiante jusqu'à la dissolution complétée (3 à 7 jours).

Annexe

Réactif :

-TE 20.5 :(tris 20mM, EDTA 5Mm, pH 7.5) auto clavé

Tris : 2.422g /l

EDTA : 1.86g/l

Ajuster le pH avec HCL 1N

-TE 10/1 :(tris 10mM, EDTA 1Mm, pH 7.4) auto clavé.

Tris : 0.606g

EDTA : 0.1869g pour 500ml.

Ajuster le pH avec de l' HCL 1N

-Tompon de lyse : NaCl 400Mm.

Tris : 10mM

EDTA : 2mM.

pH8.2

-SDS 10%

-Proteinase K: 10mg /ml H₂O.

-NaCl 4M

-Ethanol absolu

-Ethanol 70%

-Bleu de Bromophénol : (BBP):BBP20mg

Tris 0.5M: 2ml.

Glycerol: 5ml.

pH7.5

H₂O 10ml

-TBE 10X: Tris 108g.

Acide borique 55g.

Ajuster le pH à 8.3 avec l'acide acétique glacial.

EDTA9.3g.

H₂O 1L.

RÉSUMÉ

Abstract

Breast cancer is the first cause of death in women; it represents a major public health problem and is a heterogeneous and multifactorial pathology. The C609T polymorphism of the NQO1 gene (also called NQO1*2) may be an important factor in the predisposition to breast cancer.

To evaluate this hypothesis, we studied the effect of the C609T polymorphism of the NQO1 gene on the occurrence of breast cancer, this polymorphism was detected by PCR-RFLP.

Our results did not show an effect of the NQO1*2 polymorphism on the occurrence of breast cancer. Indeed, the comparison between the frequencies of the CC and CT genotypes, allows to conclude that there is no association between the CC genotype of the C609T polymorphism of the NQO1 gene and the risk of breast cancer with the OR=2.57 and P=2.13. This same result is found when comparing the frequencies of the CC and TT genotypes (OR=2.20 and P=0.54). This finding is confirmed by comparing the wild type C allele with the mutated T allele (OR= 1.79; P=0.21). This allows us to conclude that the mutated allele is not associated with a risk of CS.

However, these results cannot be confirmed, a larger study is needed to verify our results, and it will be useful to take into consideration other more sensitive parameters.

ملخص

سرطان الثدي هو السبب الأول للوفاة عند النساء فهو يمثل مشكلة صحية عامة كبرى وهو مرض غير متجانس ومتعدد العوامل. قد يكون عاملا مهما في الاستعداد للإصابة بسرطان الثدي. $2 * NQO1$ ويسمى أيضا $NQO1$ للجين $C609T$

لتقييم هذه الفرضية، قمنا بدراسة تأثير تعدد الأشكال $C609T$ للجين $NQO1$ على حدوث سرطان الثدي، تم اكتشاف هذا التعدد بواسطة $PCR-RFLP$.

لم تظهر نتائجنا تأثير تعدد الأشكال $2 * NQO1$ على حدوث سرطان الثدي. في الواقع، تسمح المقارنة بين ترددات الأنماط الجينية CC و CT باستنتاج أنه لا يوجد ارتباط بين النمط الجيني CC لتعدد الأشكال $C609T$ للجين $NQO1$ وخطر الإصابة بسرطان الثدي مع $OR = 2.57$ و $P = 2.13$. تم العثور على هذه النتيجة نفسها عند مقارنة ترددات الأنماط الجينية CC و TT ($OR = 2.20$ و $P = 0.54$)؛ ($P = 0.21$). وقد تم تأكيد هذه النتيجة من خلال مقارنة أليل النوع البري C مع أليل T المتحور ($OR = 1.79$ ؛ $P = 0.21$). هذا يسمح لنا باستنتاج أن الأليل المتحول لا يرتبط بخطر الإصابة بسرطان الثدي.

ومع ذلك، لا يمكن تأكيد هذه النتائج، وهناك حاجة إلى دراسة أكبر للتحقق من نتائجنا، وسيكون من المفيد مراعاة المعلمات الأخرى الأكثر حساسية.

Année universitaire : 2020 - 2021

Présenté par : KHELIFA NESRINE
LOUCIF RACHA

Titre
Eude de l'effet du polymorphisme NQO1*2 sur la survenue du cancer du sein

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Génétique

Résumé

Le cancer du sein est la première cause de mortalité chez les femmes, il représente un problème majeur de santé publique et constitue une pathologie hétérogène et multifactorielle. Le polymorphisme C609T du gène NQO1 (encore appelé NQO1*2) peut-être un facteur important dans la prédisposition au cancer du sein.

Pour évaluer cette hypothèse nous avons étudié l'effet du polymorphisme C609T du gène NQO1 sur la survenue du cancer du sein, ce polymorphisme a été mis en évidence par une PCR- RFLP.

Nos résultats n'ont pas montré un effet du polymorphisme NQO1*2 dans l'apparition du cancer du sein. En effet, la comparaison entre les fréquences des génotypes TT et CT, permet de conclure qu'il n'existe pas une association entre le génotype TT du polymorphisme C609T du gène de la NQO1 et le risque de cancer du sein avec $OR=2.20$ et $P=0.54$. Ce même résultat est trouvé en comparant les fréquences des génotypes CC et CT ($OR=2.57$ et $P=2.13$). Ce constat est confirmé par la comparaison de l'allèle muté T avec l'allèle sauvage C ($OR= 1.79$; $P=0.21$). Ce qui nous permet de conclure que l'allèle muté n'est pas lié à un risque de CS.

Ces résultats ne peuvent pas être confirmatifs, une étude plus large est nécessaire pour vérifier nos résultats, en plus il sera utile de prendre en considération d'autre paramètre plus sensible.

Mots-clefs : cancer du sein, gène NQO1, C609T, facteur de risque.

Laboratoires de recherche :

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire (Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

Président du jury : Dr BENHIZIA Hayet (MCB - Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

Encadreur : Dr SEDRATI Khadîdja (MCB- Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur : Dr SEMAME Ouarda (MCB - Université des Frères Mentouri, Constantine 1).