

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



Université Constantine I
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie Animale

Spécialité : Génétique Moléculaire

Intitulé:

**Le polymorphisme C677T de la méthylène tétrahydrofolate
réductase (*MTHFR*) et risque de cancer gastrique**

Présenté et soutenu par : *BOUDRAA Hicham*

Le : 30/06/2014

Devant le Jury d'évaluation

Président du jury : D.SATTA (Professeur Université Constantine 1)

Rapporteur : K.SIFI (MCA-Faculté de médecine Université Constantine 3)

Examineurs : S .ZEKRI (MAA-Faculté de médecine Université Constantine 3)

D.REZGOUNE- CHELLAT (MCB Université Constantine 1)

*Année universitaire
2013-2014*

En préambule à ce mémoire nous remercions **DIEU** de nous avoir accordé des connaissances de la science et de nous avoir aidés à réaliser ce travail

Remerciements

Je remercie du fond du cœur le Dr.K.SIFI pour m'avoir encadré. Elle a su me guider et m'encourager pendant ces mois avec patience, merci pour votre gentillesse et votre disponibilité.

Je remercie également madame SATTI responsable de la filière de Génétique pour son dévouement, son suivi et ses encouragements sa confiance et sa simplicité et générosité durant tout le parcours de ma formation et d'être le président du jury. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je vous adresse ma gratitude pour tout cela.

Je remercie très sincèrement les Drs D.REZGOUNE- CHELLAT et S .ZEKRI d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

J'exprime ma gratitude au Professeur N.ABADI, Directeur du laboratoire de Biologie et de Génétique Moléculaire au CHUC qui nous a ouvert les portes de son laboratoire en nous facilitant la réalisation de cette étude.

Un grand merci aussi à nos enseignants qui ont veillé sans relâche à nous transmettre le savoir durant toutes ces années dans un cadre de respect mutuel

Je tiens sincèrement à remercier toute personne ayant collaboré de loin ou de près à la réalisation de ce travail et en particulier madame Yasmina, madame Nadia, docteur AMRANE, docteur BOUDAOU, docteur CHIREUF, professeur HAMADA, sans oublier Kahina, Maya, et Hamid et tous les membres du laboratoire et tous les patients.

Dédicaces

Je dédie ce mémoire :

À Ma mère la plus belle chose dans ma vie, Aucune dédicace ne serait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

À mon père pour sa patience, sa confiance et son respect de mes choix, rien au monde ne vont les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

À mes très chères sœurs et frère Majeda, Hanane, Mohamed, Ali, Dalala Ahcen, Houcine et Abd al-Rahime en témoignage, De l'attachement de l'amour et de l'affection que je porte pour vous.

À ma grande mère et ma tante que dieu vous protège.

À toute ma famille et à tous mes amis Farouk, Zakaria, Houssam, . Salah el dine, Aïmed, Adel, et tous ceux qui m'aiment et tous ceux que j'aime.

À toute la promotion 2014 de génétique moléculaire.

CORDIALEMENT HICHAM

Table des matières :

Remerciements	
Dédicaces	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	01
Partie bibliographique	
I. Rappel Anatomique.....	03
I.1. Anatomie; et Histologie de l'estomac	03
I.2. Fonctions de l'estomac	04
I.3. La vascularisation de l'estomac.....	05
I.3.1.Les artères	05
I.3.2.Les veines	05
I.3.3.Les vaisseaux lymphatiques de l'estomac.....	05
II. Cancer de l'estomac.....	06
II.1. Épidémiologie	06
II.2. Facteurs de risque du cancer de l'estomac	07
II.2.1. Facteurs infectieux.....	07
II.2.2. Facteurs génétiques	07
II.2.3. Facteurs environnementaux.....	08
II.3. Classification des cancers gastriques.....	08
III. Génétique et carcinogénèse des cancers gastriques.....	11
III.1. L'instabilité génomique.....	11
III.1.1. Instabilité génique (phénotype MSI)	11
III.1.2. Instabilité chromosomique (phénotype CIN).....	11
III.1.3. Hyperméthylation de l'ADN (phénotype CIMP).....	12

III.2.	Gènes altérés dans les cancers gastriques.....	12
III.2.1.	Les proto-oncogènes; oncogènes	13
III.2.1.1.	Le gène K-RAS	13
III.2.1.2.	Le gène c-erbB2, Le gène c-met.....	13
III.2.1.3.	Le gène VEGF.....	14
III.2.2.	Les gènes suppresseurs de tumeurs.....	14
III.2.2.1.	Le gène APC	14
III.2.2.2.	Le gène P53.....	14
III.2.2.3.	Le gène DCC	14
III.2.2.4.	Le gène CDH1.....	15
III.3.	Le Polymorphisme du gène MTHFR	15
IV.	Diagnostic des cancers de l'estomac	18
V.	Principes du traitement du cancer de l'estomac	18

PARTIE PRATIQUE

I.	Patients et méthodes.....	19
I.1.	Recrutement des Sujets.....	19
I.2.	Prélèvement sanguine	20
I.3.	Questionnaire et Enregistrement	20
I.3.1.	Questionnaire.....	20
I.3.2.	Enregistrement.....	20
I.4.	Extraction d'ADN.....	21
I.4.1.	Principe.....	21
I.4.2.	Détermination de la pureté et de la concentration d'ADN	21
I.5.	Génotypage de la MTHFR.....	22
I.6.	La PCR (Polymérase Chaîne Réaction).....	22
I.6.1.	Préparation du milieu réactionnel (ou mix) de PCR.....	23
I.6.2.	Déroulement des cycles de la PCR.....	23
I.6.3.	Contrôle des produits de la PCR.....	23
I.6.4.	Digestion des produits de PCR.....	24
I.6.4.1.	Digestion par l'enzyme de restriction HinfI.....	24

I.6.5.	Conditions de migration.....	25
I.6.6.	Révélation du profil électrophorétique.....	25
I.7.	Les paramètres statistiques.....	27
I.7.1.	Calcul de l'odds ratio.....	27
I.7.2.	Les intervalles de confiance.....	28
I.7.3.	P-value	28
II.	Résultats.....	29
II.1.	Répartition des sujets.....	29
II.1.1.	Répartition des témoins selon l'âge et le sexe.....	29
II.1.1.1.	La répartition des témoins selon le sexe.....	29
II.1.1.2.	La répartition des témoins selon l'âge.....	29
II.1.2.	La répartition des témoins selon l'âge et le sexe.....	31
II.1.3.	Répartition des fréquences génotypiques et alléliques de la MTHFR chez les témoins.....	31
II.1.3.1.	Répartition des fréquences génotypiques chez les témoins	32
II.1.3.2.	Répartition des fréquences alléliques	32
II.1.4.	Répartition des sujets malades.....	33
II.1.4.1.	Selon le sexe	33
II.1.4.2.	Selon l'âge.....	33
II.1.4.3.	Selon la localisation de cancer gastrique (GC)	35
II.1.4.4.	Selon les facteurs de risque	36
II.1.4.5.	Selon les antécédents	37
II.1.4.6.	Répartition des malades selon le groupe sanguin	38
II.1.4.7.	Répartition selon le type histologique du cancer gastrique.....	38
II.1.4.8.	Répartition des fréquences génotypiques et alléliques chez les sujets malades	39
III -	Discussion.....	43
	Conclusion et perspective	51
	Références bibliographiques	
	Annexes	
	Résumé	

Liste des abréviations

-**AJCC**: American Joint Committee on Cancer

-**ala**: alanine

-**APC**: Adenomatous Polyposis Coli.

-**BabA** : Blood group antigen binding adhesion

-**BBP**: Bleu de Bromophénol

-**BET**: Bromure d'éthidium

-**cagPAI** : îlot de pathogénicité cag

-**CDH1** : cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial).

-**CDKN2A**: cyclin dependent kinase 2a

-**CIMP**: CpG Island Methylator Phenotype

-**CIN**: Chromosomal Instability

-**CpG**: Dinucléotide 5'-cytosine-guanine-3'

-**DCC**: deleted in colon carcinoma.

-**DHF** : dihydrofolate. Metabolic cycle folate

-**EDTA**: Acide Ethylène Diamine Tétracétique

-**EGF**: Epidermal Growth Factor

-**FAD**: Flavine Adénine Nucléotide

-**GC**: Gastric cancer

-**HCl**: Acide chlorhydrique

-**HER2 (ERBB2)**: Human Epidermal Growth Factor Receptor-2

-**HGF** : Hepatocyte growth factor

hgjb

-**HNPCC**: Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer

-**HP**: *Helicobacter pylori*

-**IC** : intervalle de confiance

-**IGF-1**: Insulin-like growth factor-1.

-**K-RAS**: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

-**MALT**: Mucosa-Associated Lymphoid Tissue

-**MCC** : mutated in colorectal cancer

-**Met**: Mesenchymal-Epithelial Transition Factor

-**MLH1**: human mutL homolog 1

-**MMR** : Mismatch Repair

-**MS** : méthionine synthase/vitamine B12

-**MSI** : Micro-Satellite Instability

-MTHFR:Méthylène-Tétra-Hdro-Folate Réductase

-v-erb-b2:avianerythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2

-MUC1 : Mucine 1

-NS: Non significative.

-OMS:Organisation Mondiale de Santé

-OR:Odds Ratio.

-P: Probabilité d'erreur.

-P53:Protéine de 53 kD

-PCR :Polymerase Chain Reaction

-RFLP:Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction

-RUNX : runt-related transcription factor

-SAH : S-adénosyl-homocystéine

-SAM : S-adénosyl-méthionine

-SDS:Sodium dodécyle sulfates

-TGF: Transforming growth factor

-THF: Tetra Hydro Folate

-TNM:**T:** La tumeur**N:**l'absence ou la présence **M:** L'absence ou la présence métastases.

-TS :thymidylate synthase

-VacA :Vacuolating cytotoxin A

-VEGF: Vascular Endothélial Growth Factor

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Anatomie et histologie de l'estomac.....	03
Figure 2 : Vascularisation de l'estomac	05
Figure 3 : Progression des lésions histopathologiques	09
Figure 4 : Mécanisme d'inactivation de la transcription.....	12
Figure 5 : La localisation de gène MTHFR	15
Figure 6 : Cycle des folates	16
Figure 7 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR.	24
Figure 8 : Site de restriction par l'enzyme Hinf I.....	24
Figure 9 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments issus par clivage de Hinf I présentant différents génotypes de la MTHFR.	26
Figure 10 : Répartition des témoins selon le sexe.	29
Figure 11 : Répartition des témoins selon l'age	30
Figure 12 : Répartition de la population témoin selon l'âge et le sexe.....	31
Figure 13 : Répartition des fréquences génotypiques chez les témoins.	32
Figure 14 : Répartition des fréquences alléliques chez les témoins.....	33
Figure 15 : Répartition des sujets malades selon le sexe	33
Figure 16 : Répartition des sujets malades selon l'âge.	34
Figure 17 : Répartition des sujets malades selon la localisation du GC.	36
Figure 18 : Répartition des sujets malades selon les facteurs de risque.....	37
Figure 19 : Répartition des sujets malades selon les antécédents au cancer.....	38
Figure 20 : Répartition selon le type histologique du cancer.....	39
Figure 21 : Répartition des fréquences génotypiques chez les malades.	40
Figure 22 : Répartition des fréquences alléliques chez les malades.....	40
Figure 23 : Représentation de Répartition des génotypes de la MTHFR des témoins et des malades.....	41

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Rôle des différentes structure du sac gastrique	2
Tableau 2 : Classification de l'AJCC de 2009	10
Tableau 3 : Tableau de contingence.....	27
Tableau 4 : Répartition des témoins en fonction de leur sexe.....	29
Tableau 5 : Répartition en tranche d'âge de la population témoin.	30
Tableau 6 : Répartition de la population témoin selon l'âge et le sexe.	31
Tableau 7 : Fréquences génotypiques de la mutation C677T du gène de la MTHFR dans la population témoin.....	32
Tableau 8 : Répartition des fréquences alléliques de la MTHFR dans la population témoin.....	32
Tableau 9 : Répartition des sujets malades selon l'âge.....	34
Tableau 10 : Répartition des sujets malades selon la localisation du GC.....	35
Tableau 11 : Répartition des sujets malades selon les facteurs de risque.....	36
Tableau 12 : Répartition des sujets malades selon les antécédents.....	37
Tableau 13 : Répartition des malades selon leur groupe sanguin.	38
Tableau 14 : Répartition selon le type histologique du cancer.....	39
Tableau 15 :Fréquence génotypique de la mutation C677T du gène de la MTHFR dans la population malade.....	39
Tableau 16 : Répartition des fréquences alléliques de la MTHFR dans la population malade.....	40
Tableau 17 : Répartition des génotypes de la MTHFR des témoins et des malades.....	41
Tableau 18 : Répartition des fréquences alléliques de la MTHFR dans la population témoin et chez malades.....	42
Tableau 19 : Calcule des Odds ratio chez les malades.....	42
Tableau 20 : Les fréquences génotypiques et alléliques dans différents pays et groupes ethniques	46

INTRODUCTION

Introduction :

Le cancer gastrique constitue un problème majeur de santé publique à l'échelon mondial. Il représente le quatrième cancer fréquent parmi les cancers diagnostiqués chez l'homme dans le monde après le cancer du poumon, de la prostate, et colorectale et le cinquième chez les femmes après le cancer du sein, colorectale, du col de l'utérus, des poumons [1].

En dépit de la diminution de son incidence observée dans les pays occidentaux au cours de ces 50 dernières années, il reste la deuxième cause de mortalité par cancer dans le monde (soit 9,7% au total) [1,2]. En Algérie, Ils représentent 8,6 % de l'ensemble des cancers incidents chez l'homme [14].

Le cancer gastrique, cancer agressif, présente une symptomatologie clinique discrète, le plus souvent tardive et aspécifique, témoignant d'une maladie déjà localement avancée ou métastatique, ce qui est responsable du mauvais pronostic malgré les progrès de la chirurgie et de l'oncothérapeutique [3,4 ,11].

Le cancer de l'estomac est une maladie d'étiologie complexe qui implique des facteurs de risque multiples.

La plupart des cancers gastriques sont sporadiques et semblent être le résultat des effets cumulés de différents facteurs environnementaux tels que le tabac, l'alcool, les habitudes alimentaires [7, 8,87], et surtout l'infection à *Helicobacter pylori* (HP), auxquels s'ajoutent es facteurs génétiques de prédisposition.

Aujourd'hui les progrès constants de la biologie des tumeurs ont conduit à une meilleure compréhension de la pathogénie du Cancer de l'estomac.

Son développement est caractérisé par une combinaison complexe entre événements génétiques et épigénétiques avec une instabilité marqué du génome tumoral.

Des progrès considérables ont été apportés à l'étude des facteurs de risque du GC en particuliers ceux liés à certaines voies métaboliques, on cite la *MTHFR*.

De ce fait, dans ce travail nous avons évalué chez des patients le risque de cancer de l'estomac par la recherche de la mutation C677T du gène de la *MTHFR*.

Les objectifs de notre travail étaient :

- De nous initier à la pratique de techniques de biologie moléculaire à savoir l'extraction d'ADN et la réalisation de PCR/Digestion.
- De rechercher le polymorphisme C677T de la *MTHFR* chez des témoins et chez des patients présentant un Cancer de l'estomac.
- D'évaluer le risque de cancer de l'estomac associé à l'expression du polymorphisme C677T de la *MTHFR*.

PARTIE

BIBLIOGRAPHIQUE

I. Rappel Anatomique :

L'estomac est la portion dilatée du tractus digestif entre l'œsophage et l'intestin grêle. Il est spécialisé dans l'accumulation des aliments ingérés qui y sont préparés chimiquement et mécaniquement à la digestion et au passage dans le duodénum. Le suc gastrique transforme graduellement la nourriture en une bouillie semi-liquide, le chyme qui passe assez rapidement dans le duodénum.

I.1. Anatomie et Histologie de l'estomac :

L'estomac se divise en quatre régions : le cardia, le fundus, le corps et le pylore (figure.1). Le cardia entoure l'orifice supérieur de l'estomac. Le fundus est la partie arrondie au-dessus et à gauche du cardia. La grande partie centrale sous le fundus constitue le corps. Le pylore (pyle : porte ; ourus: garder) est la partie inférieure de l'estomac qui se rattache au duodénum. Il comporte deux parties, l'antré pylorique (antrum: caverne), qui est reliée au corps de l'estomac, et le canal pylorique, qui mène au duodénum. Le pylore communique avec le duodénum de l'intestin grêle par le sphincter pylorique [5].

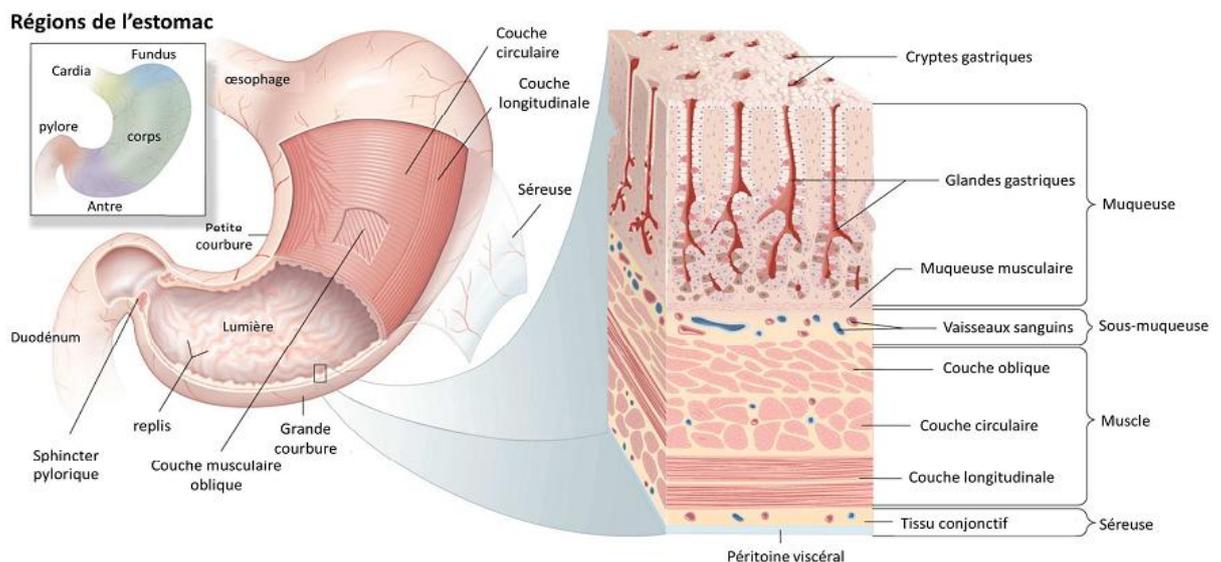


Figure 1. Anatomie et histologie de l'estomac [9]

La paroi de l'estomac est formée des mêmes tuniques de base que le reste du tube digestif, mais elle comporte quelques différences.

L'estomac est constitué de 3 couches musculaires : une couche longitudinale externe, une couche intermédiaire circulaire et une couche interne oblique. La paroi interne de l'estomac est composée de 4 couches : la séreuse, le muscle, la sous-muqueuse et la

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

muqueuse. La muqueuse est densément munie de glandes gastriques composées de cellules produisant les enzymes digestives, de l'acide chlorhydrique et du mucus [9].

I.2. Fonctions de l'estomac :

L'ensemble des fonctions de l'estomac est résumé dans le tableau 1.

Tableau 1 : Rôle des différentes structure du sac gastrique [5]

DIGESTION DANS L'ESTOMAC		
Structure	Activité	Résultat
MUQUEUSE		
Cellules principales	-Sécrètent le pepsinogène. -Sécrètent la lipase gastrique.	-Un précurseur de la pepsine est produit. -Scinde les triglycérides à chaîne courte.
Cellules pariétales	-Sécrètent de l'acide chlorhydrique. -Sécrètent le facteur intrinsèque.	-Détruit les microbes dans les aliments. Dénature les protéines. Convertit le pepsinogène en pepsine. -Nécessaire à l'absorption de la vitamine B12, qui est utilisée pour la formation des globules rouges.
Cellules à mucus	-Sécrètent du mucus.	-Forme une barrière protectrice qui empêche la destruction de la paroi de l'estomac.
Cellules G	-Sécrètent de la gastrine.	-Stimule la sécrétion de HCl et de pepsinogène.
MUSCULEUSE		
	-Ondes de mélange. Péristaltisme.	-Macèrent les aliments, les mélangent avec le suc gastrique, les réduisent en chyme et poussent celui-ci à travers le sphincter pylorique.
SPHINCTER PYLORIQUE		
	-S'ouvre pour laisser passer le chyme dans le duodénum.	-Règle l'entrée et la sortie du chyme.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I.3. La vascularisation de l'estomac :

I.3.1. Les artères :

L'estomac possède une très riche irrigation artérielle en provenance du tronc coeliaque et de ses branches. La plus grande partie du sang provient d'anastomoses, qui se forment le long de la petite courbure, entre les artères gastriques droite et gauche et le long de la grande courbure, entre les artères gastro-épiplœiques droite et gauche. Le fundus et la partie supérieure du corps reçoivent du sang des artères gastriques postérieures et courtes [6].

I.3.2. Les veines :

Les veines gastriques sont satellites des artères gastriques.

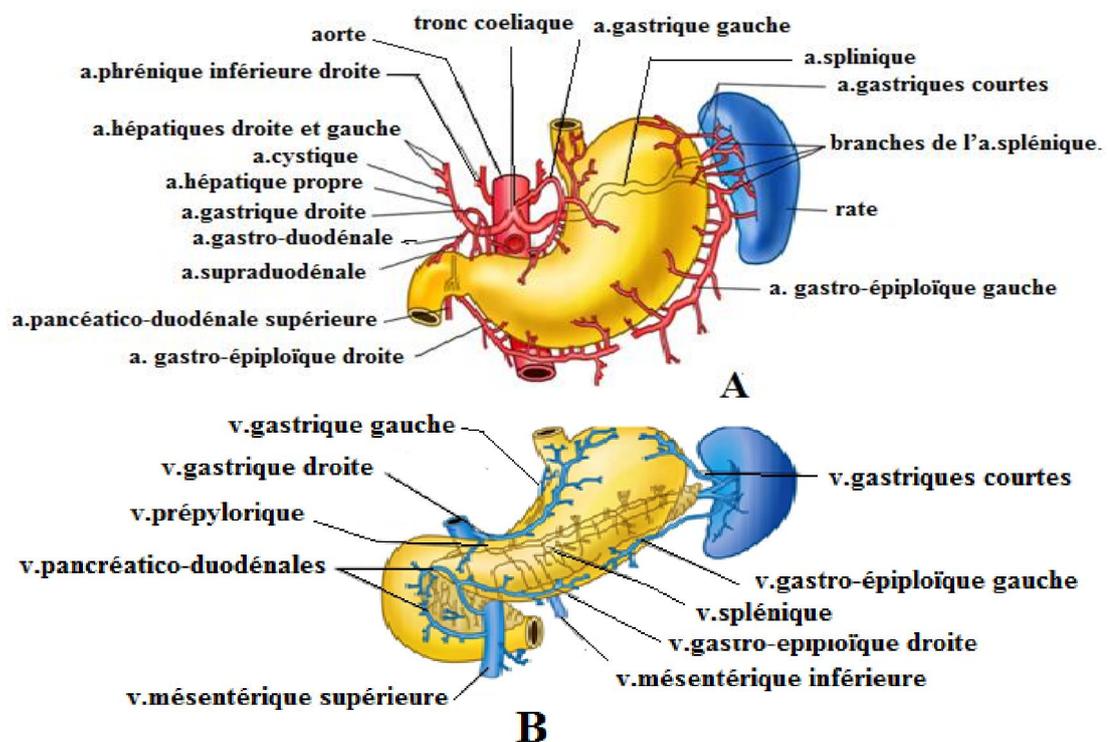


Figure 2 : Vascularisation de l'estomac [128]

[A] Artères de l'estomac [B] Veines de l'estomac

I.3.3. Les vaisseaux lymphatiques de l'estomac [6] :

Le drainage lymphatique de l'estomac peut être résumé de la façon suivante :

- ❖ La lymphe des deux tiers supérieurs de l'estomac est drainée le long des artères gastriques droites (pylorique) et gastriques gauches (coronaire stomachique) vers les nœuds lymphatiques gastriques, la lymphe du fundus et de la partie supérieure du corps de l'estomac sont également drainées le long des artères gastriques courtes et

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

gastro-épiploïques gauches vers les nœuds pancréatico-spléniques (ganglions de la chaîne splénique).

- ❖ La lymphe des deux tiers droits du tiers inférieur de l'estomac est drainée le long de l'artère gastro-épiploïque droite vers les nœuds pyloriques (ganglions sous-duodéno-pyloriques).
- ❖ La lymphe en provenance du tiers gauche de la grande courbure est drainée le long des artères gastriques courtes et spléniques vers les nœuds pancréatico-duodénaux (ganglions de la chaîne splénique).

II. Cancer de l'estomac :

Les tumeurs de l'estomac sont développées aux dépens de la muqueuse, de la sous muqueuse, des cellules endocrines ou du système immunitaire.

Les tumeurs épithéliales sont bénignes (polypes hyperplasiques, adénomes, polypes glandulokystiques) ou malignes (adénocarcinome) [10]. Le cancer de l'estomac reste un cancer grave avec un mauvais pronostic [4].

II.1. Épidémiologie :

Le cancer gastrique est le quatrième cancer fréquent parmi les cancers diagnostiqués chez l'homme dans le monde après les cancers de poumon, de la prostate, et colorectale et le cinquième chez les femmes après les cancers de sein, colorectale, du col de l'utérus, des poumons [1].

Bien que son incidence diminue dans la plupart des pays, cependant, il reste la deuxième cause de mortalité par le cancer dans le monde avec 738,000 morts estimés pour s'être produits en 2008 [2].

L'Afrique se situe dans les régions à faible risque de cancer gastrique, les pays occidentaux et l'Amérique de nord sont à risque moyen, en revanche, les taux plus élevés sont retrouvés au Japon et en Chine [11,12].

En Algérie et selon une étude épidémiologique des cancers digestifs dans la région de Chlef, le cancer gastrique arrive en première position parmi les cancers digestifs pour les deux sexes [13].

Selon le registre de Sétif, Les cancers de l'estomac se situent au quatrième rang des principales localisations du registre. Ils représentent 8,6 % de l'ensemble des cancers incidents chez l'homme. Ces cancers sont deux fois plus fréquents chez l'homme que chez la femme. Le cancer de l'estomac est d'évolution stable au cours de cette période [14].

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

II.2. Facteurs de risque du cancer de l'estomac :

Le cancer de l'estomac est une maladie d'étiologie complexe qui implique des facteurs de risque multiples composés essentiellement de facteurs infectieux, génétiques, et environnementaux.

II.2.1. Facteur infectieux :

L'*Helicobacter pylori* (HP) est un facteur de risque certain du cancer de l'estomac distal (mais pas du cardia), en favorisant le développement de la gastrite chronique atrophique par les altérations de la muqueuse qu'il provoque [15,16].

Mais cela ne veut pas dire que toutes les personnes infectées par HP développeront un cancer gastrique. Les personnes infectées par le HP ont un risque relatif voisin de 2 de développer un cancer de l'estomac par rapport aux personnes non infectées [17].

H. pylori est classée dans le groupe des *Epsilonprotéo* bactéries, bactérie à Gram négatif, de forme spiralée, mobile grâce à ses flagelles et microaérophiles. Son génome est composé de 1.5 Mb, dont environ 1200 gènes sont communs à toutes les souches, et 200 à 400 gènes, situés principalement dans des zones de plasticité ou dans l'îlot de pathogénicité *cag* (*cagPAI*), Certaines souches bactériennes sont associées à une majoration du risque en rapport avec l'expression de différents facteurs de virulence dominés par la protéine *CagA* et certaines isoformes de la protéine *VacA* [18,19].

L'infection par *H.pylori* provoque systématiquement une gastrite aiguë majoritairement asymptomatique mais pouvant évoluer vers des pathologies plus sévères telles que les ulcères gastriques et duodénaux (10 à 20%), le cancer gastrique (1 à 2%) et le lymphome de MALT [9].

II.2.2. Facteurs génétiques :

La présence de facteurs génétiques influençant le risque individuel de développer un cancer gastrique a été suggérée, d'une part par l'existence d'un risque multiplié par 2 ou 3 chez les apparentés au premier degré d'un sujet atteint [20-22].

Par ailleurs, l'adénocarcinome gastrique fait partie des cancers fréquents du syndrome HNPCC (hereditary non polyposis colorectal cancer), mais fait aussi partie du phénotype de la polypose adénomateuse rectocolique familiale, du syndrome de Peutz-Jeghers et de la

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

polypose juvénile. Certaines formes familiales de cancers gastriques doivent faire rechercher une mutation de l'E-cadhérine après consultation d'oncogénétique. Les « cancers gastriques diffus héréditaires » sont liés à une mutation germinale de l'anti-oncogène CDH1 avec une perte de fonction de la protéine cadhérine E [23, 24].

II.2.3. Facteurs environnementaux :

Les facteurs de risques alimentaires ou environnementaux comme le tabac jouent très probablement un rôle majeur, ils augmentent le risque de cancer de l'estomac. La fumée du tabac contient des teneurs très élevées en acétaldéhyde qui se dissout dans la salive et est déglutie dans l'estomac. L'acétaldéhyde a récemment été classé par l'OMS comme carcinogène du groupe 1. L'acétaldéhyde est le principal métabolite de l'alcool dans le tube digestif [25, 26].

Le sel ainsi que les aliments salés, fumés ou frits (alimentation asiatique) sont incriminés dans la genèse des cancers de l'estomac. La consommation de viandes rouges favoriserait également la survenue d'un cancer de l'estomac alors qu'un régime riche en fibres et pauvre en graisses a un rôle protecteur [15, 25, 26].

Le niveau socio-économique bas et une faible consommation de fruits et légumes sont les facteurs exposant au risque de cancer gastrique. La profession constitue aussi un facteur de risque ; car le cancer gastrique serait plus fréquent chez les mineurs des mines de charbon, les ouvriers travaillant dans l'industrie du caoutchouc, du bois, du cuivre et de l'amiante [27, 28].

II.3. Classification des cancers gastriques :

Dans les cancers de l'estomac, Il y a deux classifications principales, celle de Lauren est la plus souvent utilisée; elle distingue deux types de cancers : le type intestinale, et le type diffus [29- 32].

D'autre part, la classification de l'OMS, moins communément utilisée, est basée essentiellement sur des critères morphologiques [29-32]. Elle comprend les types papillaires, tubulaires, mucineux et à cellules en bague à sceau. Ainsi la classification ,moins utilisée, de Goseki repose sur le degré de différenciation et la quantité de mucus dans le cytoplasme [33]. La limite gastrique est une unité anatomopathologique macroscopique résultant d'une infiltration extensive de la paroi gastrique par un cancer gastrique de type diffus [30].

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Les cancers primitifs sont essentiellement d'origine épithéliale. L'adénocarcinome et ses variantes représentent 90 % de ces cancers. Les tumeurs endocrines sont rares et le plus souvent de bas grade de malignité. Les autres carcinomes sont exceptionnels [17,30].

Parmi les tumeurs non épithéliales, il faut retenir les lymphomes de MALT qui sont souvent de faible grade de malignité. Les sarcomes et les autres cancers non épithéliaux sont exceptionnels. Les tumeurs secondaires correspondent à l'extension d'un cancer d'organe de voisinage (œsophage, pancréas, côlon, foie) ou à des métastases, le plus souvent de cancers du sein, du poumon ou d'un mélanome [17,30].

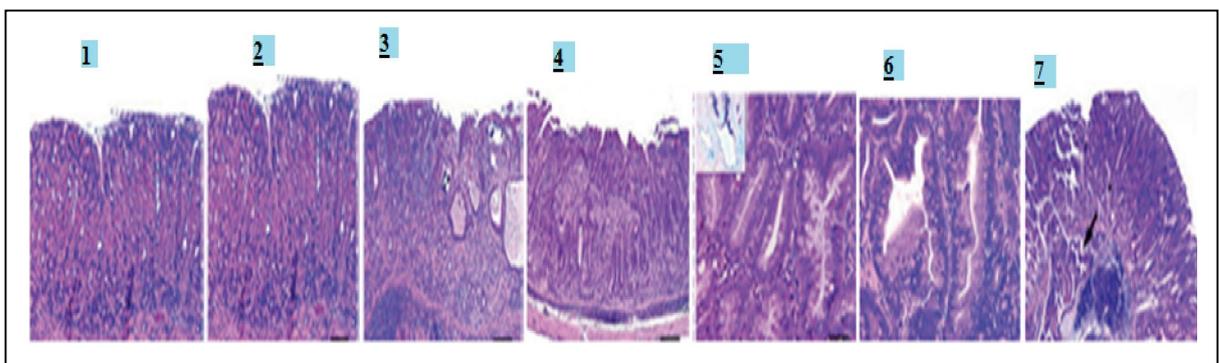


Figure 3: Progression des lésions histopathologiques menant à l'adénocarcinome gastrique de type intestinal [18]

1 :Normal; 2 :Gastrite active; 3 :Gastrite chronique; 4:Gastrite atrophique ;5 : Métaplasie intestinale ;6 :Dysplasie ;7 :Adénocarcinome

– **Classification TNM :** [34, 35,]

Le stade selon la classification TNM des cancers gastriques est évalué à partir de l'imagerie disponible et des données histopathologiques d'une part et d'autre part sont inclus les états ganglionnaires régionaux et les métastases distales.

- **Classification de l'AJCC de 2009 :**

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 2 : Classification de l'AJCC de 2009

T Tumeur primitive	
Tx	Tumeur non classée
T0	pas de tumeur primitive
Tis	carcinome in situ
T1	tumeur envahissant la lamina propria, la muscularis mucosae ou la sous- muqueuse
T1a	tumeur envahissant la lamina propria ou la muscularis mucosae
T1b	tumeur envahissant la sous-muqueuse
T2	tumeur envahissant la musculature propre ou la sous séreuse, le ligament gastro colique, gastro hépatique, le petit ou grand épiploon si absence de perforation du péritoine viscéral.
T3	tumeur envahissant le péritoine viscéral (séreuse) sans envahissement d'organes adjacents
T4	tumeur envahissant les structures adjacentes
T4a	tumeur envahissant toute la séreuse
T4b	tumeur envahissant les structures adjacentes
ganglions	
Nx	ganglions non évaluables
N0	pas d'envahissement des ganglions régionaux
N1	1 à 2 ganglions envahis
N2	3 à 6 ganglions envahis
N3a	7 à 15 ganglions envahis
M Métastase	
M0	pas de métastase à distance
M1	présence de métastase à distance

III. Génétique et carcinogénèse des cancers gastriques :

Le cancer est actuellement considéré comme une maladie génétique, qui entraîne une croissance cellulaire excessive et non contrôlée. A côté des altérations génétiques, comme les mutations, de nombreux arguments expérimentaux soulignent l'importance des modifications épigénétiques.

Des altérations génétiques et épigénétiques sont impliquées dans la progression tumorale, le phénomène métastatique et la résistance aux thérapeutiques.

L'identification des gènes du cancer a conduit à une meilleure compréhension des processus de la tumorigénèse et a permis d'importantes avancées dans les domaines tant fondamentaux qu'appliqués et à ouvert de nouvelles perspectives en thérapie génique et également améliorée les méthodes de diagnostic et pronostics.

III.1. L'instabilité génomique :

Actuellement, Trois phénotypes de l'instabilité génétique sont connus dans les cancers gastriques : Ce phénotype résulte de l'instabilité des microsatellites (MSI), l'instabilité chromosomique (CIN), et l'hyperméthylation des îlots CpG (CIMP).

III.1.1. Instabilité génique (phénotype MSI)

MSI des cancers de l'estomac est la conséquence d'une mutation ou de modifications épigénétiques au niveau des systèmes de réparation de l'ADN (MMR). Ce mécanisme est retrouvé dans environ 15 à 20 % des cancers gastriques.

Les tumeurs déficientes dans le système MMR accumulent des mutations (délétions ou insertions de quelques nucléotides) au niveau des microsatellites, et seront appelées MSI (microsatellite instable). Les microsatellites sont très nombreux et dispersés dans des régions codantes ou non codantes du génome.

Ainsi ce phénotype est associé à la survenue de mutations sur des gènes de susceptibilité comme le *TGF- β RII*, *IGF R* et *BAX* comme gène dans les tumeurs sporadiques, dans les tumeurs bien différenciées ou on observe des pertes d'hétérozygotie dans les gènes *APC* et *DCC* [36-43].

III.1.2. Instabilité chromosomique (phénotype CIN):

L'instabilité chromosomique (CIN) est observée dans la majorité des cancers, y compris le cancer gastrique. Elle constitue un type d'instabilité génomique plus globale avec une anomalie de nombre des chromosomes (aneuploïdie), cassures chromosomiques, pertes ou amplifications de portions de chromosomes [44-38].

Des niveaux élevés de CIN ont également été associés à une survie plus courte chez les patients atteints de cancer gastrique [47]. L'énorme perte d'hétérozygotie a été identifiée dans des différents brins chromosomiques, y compris en 1p, 3p, 4p, 5q, 7p, 8p, 8q, 9p, 12p, 13q, 17p, 18q, 20q et 22q [48,49]. De plus, les pertes alléliques telles que dans le gène p53 sur le chromosome 17, les gènes *DCC* et *SMAD2* sur le chromosome 18, et dans les gènes *APC* et *MCC* sur le chromosome 5 [50-52,38].

III.1.3. Hyperméthylation de l'ADN (phénotype CIMP):

L'hyperméthylation peut inactiver des gènes en empêchant leur transcription. Des dinucléotides CpG regroupés en îlots sont retrouvés dans les régions promotrices pour la moitié des gènes (Figure 4).

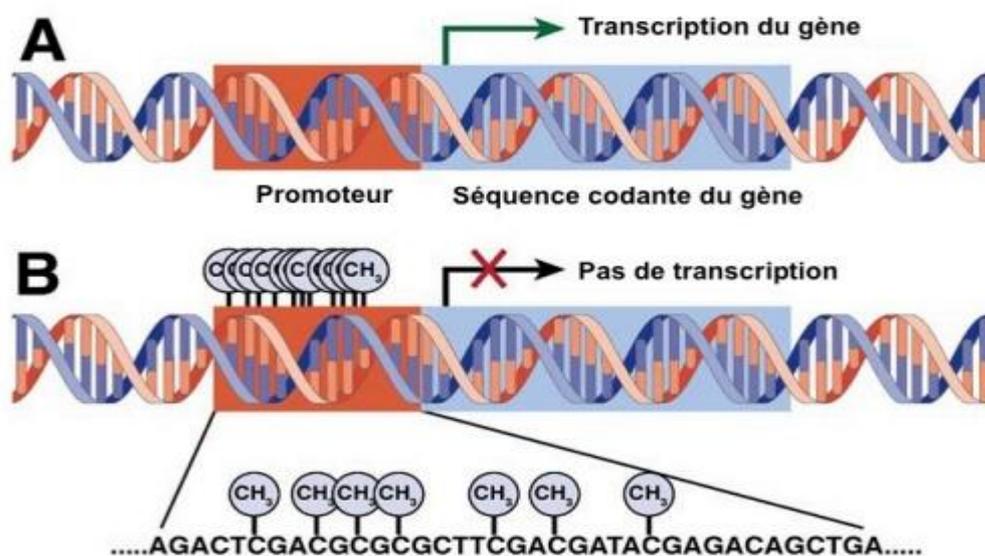


Figure 4: Mécanisme d'inactivation de la transcription [53].

Les gènes liés à la tumeur les plus couramment méthylés dans les cancers de l'estomac sont : *APC*, *CDH1*, *MHL1*, *CDKN2A*, *CDKN2B* et *RUNX3*. Cependant les gènes *CDKN2A*, *CDH1* et *MLH1* sont beaucoup plus inactivés par méthylation que par mutation [54].

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

III.2. Gène altérés dans les cancers gastriques :

Au cours des cancers de l'estomac, des altérations génétiques d'oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur ont été identifiées. [22]

Parmi les gènes impliqués dans la progression tumorale nous citeront quelques proto-oncogènes et quelques gènes suppresseur de tumeur :

III.2.1. Les proto-oncogènes, oncogènes :

Les proto-oncogènes sont des gènes qui stimulent directement la croissance cellulaire.

III.2.1.1. Le gène *K-RAS* :

Le gène *KRAS* est localisé sur le bras court (p) de chromosome 12 en position 12.1 [55], qui a fait l'objet d'un grand nombre d'étude sur différents cancers, est rarement impliqué dans les cancers gastriques [56-58].

III.2.1.2. Le gène *c-erbB2* :

Le nom officiel de ce gène est “*v-erb-b2* avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2”, est localisé sur le bras long (q) du chromosome 17 au position 12 [55].

La surexpression de récepteurs de la surface cellulaire *c-erbB2a* de la famille tyrosine kinase est plus commune dans les cancers gastriques de type intestinal [59-61].

III.2.1.3. Le gène *c-met* :

Le gène *met* est localisé sur le bras long (q) de chromosome 7 au locus 31.

L'amplification du récepteur transmembranaire *c-met* de la famille des tyrosines kinases est observée dans les cancers gastriques de type diffus [62,63].

Les oncogènes *c-met* sont des récepteurs de facteurs de croissance pour les hépatocytes (*HGF*), ils sont préférentiellement amplifiés dans les tumeurs du type diffus [64,65].

La surexpression de *c-met* a aussi été montrée pour être associée avec une mauvaise probabilité de survie [59, 66, 67].

III.2.1.4. Le gène *VEGF* :

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

L'augmentation de l'expression du facteur (*VEGF*) a été démontrée dans les cancers gastriques pour des patients à mauvais pronostic [68].

De plus, l'expression du *VEGF* est corrélée à la présence de métastases ganglionnaires et au pronostic des adénocarcinomes de l'estomac. Il a été démontré que l'inhibition du *VEGF* par un anticorps réduisait la densité microvasculaire, inhibait la croissance tumorale et potentialisait l'activité d'une chimiothérapie conventionnelle dans des modèles murins de xéno greffes de tumeurs gastriques [69-71].

III.2.2. Les gènes suppresseurs de tumeur :

Les gènes suppresseurs contrôlent négativement la croissance cellulaire.

III.2.2.1. Le gène *APC* :

Ce gène localisé sur le bras long (q) du chromosome 5, en q21-q22, intervient dans les phénomènes d'adhésion. Des mutations somatiques, initialement détectées dans les cancers coliques, ont été retrouvées dans les tumeurs de l'estomac [55, 72, 73].

III.2.2.2. Le gène *P53* :

La protéine p53 est une phosphoprotéine de 393 acides aminés. Son gène est localisé sur le bras court du chromosome 17, plus précisément sur la bande chromosomique 17p13.1. Parmi les multiples fonctions biologiques de ce gène suppresseur de tumeur *p53* on retiendra celle de régulateur de l'expression de gènes cruciaux du cycle cellulaire, de la réparation des altérations de l'ADN génomique, de l'angiogénèse, de la sénescence ou encore celle de la mort cellulaire programmée [74].

La fonction du gène du *p53* est fréquemment altérée suite à une perte d'hétérozygotie, mutation (sans ou avec décalage du cadre de lecture), ou d'une méthylation [74 - 78].

Les mutations de *p53* ont été décrites dans environ 50% des cancers gastriques, ou l'implication de *p53* dans l'adénome gastrique paraît fiable [79].

III.2.2.3. Le gène *DCC*

Ce gène, localisé en 18 q, est reconnu comme un acteur essentiel de l'invasion tumorale dans les cancers colorectaux. Pour l'estomac, la perte d'hétérozygotie de *DCC* a été détectée dans

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

10 % des adénomes. Elle s'élève de 30 % à 60 % en cas de cancers gastriques bien différenciés avec une nette prédominance pour les stades avancés. La perte d'autres loci a été reportée mais leurs fréquences n'excèdent pas 10 % dans les adénomes [72].

III.2.2.4. Le gène *CDH1* :

Ce gène code pour l'E-cadhérine, protéine qui appartient à la famille des molécules d'adhésion cellule-cellule et qui joue un rôle central dans l'adhésion calcium dépendante des cellules épithéliales et le maintien de la différenciation cellulaire et de l'architecture normale des tissus épithéliaux [80].

L'adhésion de la cellule peut être affectée par des mutations, des pertes, et des méthylation aberrantes de *CDH1* et sont connues dans le type histologique diffus [80]. Une mutation germinale du gène *CDH1* rendrait compte de 25 à 30 % des formes héréditaires des cancers gastriques de type diffus [81].

III.3. Le Polymorphisme du gène *MTHFR* :

Ce gène a été retenue pour être analysée dans notre étude .c'est un gène qui est impliqué dans le métabolisme des folates.

La localisation du gène :

Le gène *MTHFR* est localisé sur le bras court (p) du chromosome 1 en position 1p36.3 et plus précisément de la paire de base 11845786 jusqu'à la paire de base 11866159 (fig.4).

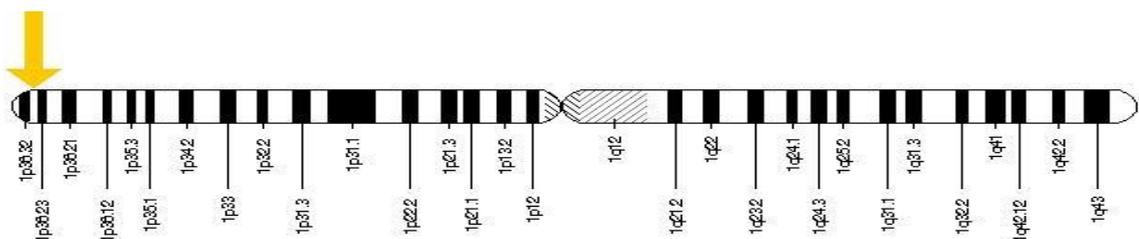


Figure 5 : La localisation de gène *MTHFR* [55]

Il comporte 12 exons. Plusieurs sites d'amorçage de la transcription, d'épissage alternatif et de sites de polyadénylation ont été observés pour le gène *MTHFR*. La proportion de chaque transcription diffère selon les tissus. Il a été mis en évidence qu'il n'y a aucun élément TATA-box pour régler le gène *MTHFR* humain, mais il contient des îlots CpG [55].

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

La protéine *MTHFR* :

La *MTHFR* est un dimère de 150 kDa comprenant deux isoformes de tailles variables : 77 kDa et 70 kDa. L'expression de l'ADNc humain de 2,2 kpb donne une protéine de 70 kDa comportant 656 acides aminés [87]. Le site de démarrage de la traduction de l'isoforme de 77 kDa permet l'ajout de codons additionnels en amont de la séquence de l'isoforme de 70 kDa [85]. L'enzyme *MTHFR* est un homodimère présent dans le cytoplasme, et localisée dans la rate, les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse. Elle possède un site de liaison pour le *FAD*.

La *MTHFR* possède deux domaines : le domaine catalytique représenté par l'extrémité N-terminale de poids moléculaire de 40 KDa, liant le *FAD* (cofacteur), le *NADPH* (donneur d'électrons) et le méthylène tétrahydrofolate et le domaine de régulation à l'extrémité C terminale de poids moléculaire de 37 KDa [86].

La *MTHFR* est une enzyme clé du métabolisme des folates. Cette enzyme va soit vers la méthylation de l'ADN, soit vers la synthèse d'ADN. Cette enzyme catalyse la réduction irréversible du 5,10-méthylène tétrahydrofolate (5,10-méthylène-THF) en 5-méthyl-THF, avec la flavine adénine dinucléotide (*FAD*) comme cofacteur.

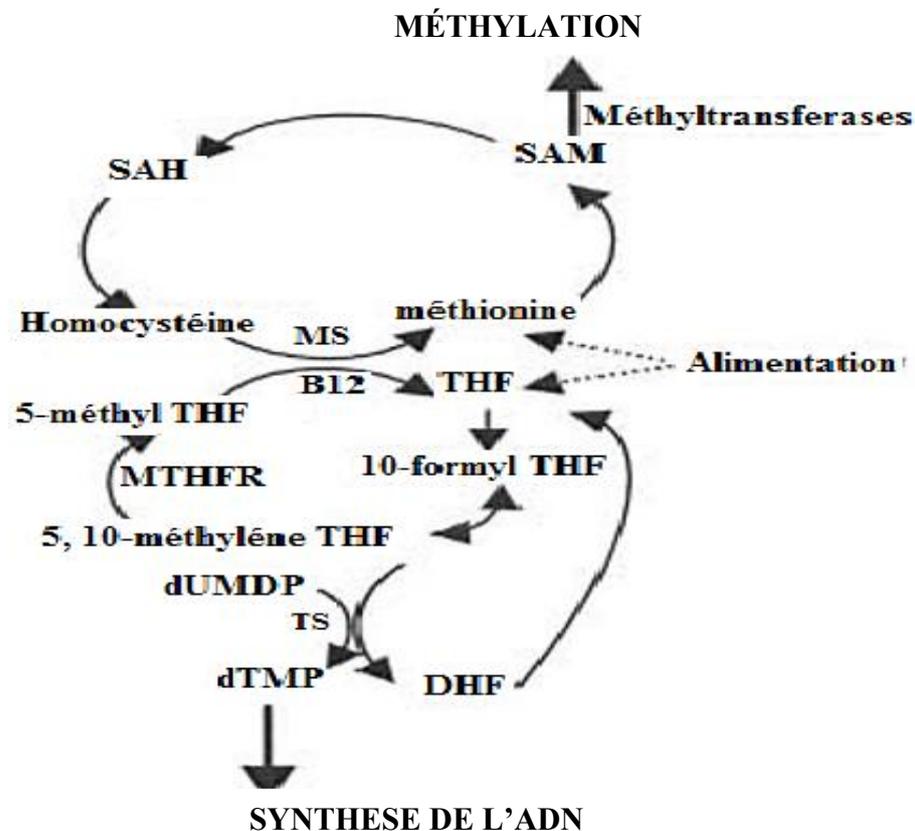


Figure 6: Cycle des folates [89]

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Elle joue donc un rôle essentiel dans la production de radicaux méthyles, et elle est impliquée dans la synthèse de novo des déoxynucléotides et dans la méthylation de l'ADN [84].

Les folates interfèrent avec les phénomènes de la carcinogenèse en modulant la méthylation de l'ADN et en contrôlant la synthèse de l'ADN. Le rôle des folates dans la prévention de la carcinogenèse est fortement suspecté. La *MTHFR* entre dans le métabolisme des folate et est un coenzyme pour la reméthylation de l'homocystéine en méthionine. Ce dernier est le précurseur pour la S-adénosyl-L-méthionine qui est le donateur fondamental du méthyle dans le processus de méthylation d'ADN, donc une forme moins active de *MTHFR* peut mener à un niveau bas de S-adénosyl-L-méthionine (*SAM*), et par conséquent, à l'hypométhylation qui peut augmenter le risque de quelque cancers inclus le cancer gastrique [85]. Son activité est sous le contrôle de la quantité du *SAM* dans la cellule.

Les mutations de la *MTHFR*

En 1995, Frosst et al. [87] ont identifié une mutation commune la C677T, de transmission autosomique récessive, du gène *MTHFR*, provenant du remplacement d'une cytosine en position 677 par une thymine, et à l'origine de la substitution d'une alanine par une valine (677C→T, ala→val), au niveau du codon 222 de la protéine [87,89].

En 1998, deux autres mutations du gène *MTHFR*, moins fréquentes que la précédente, ont été rapportées par Van der Put et al. [90] et par Weisberg et al. [91], la mutation A1298C (1298A→C, glu→ala) qui entraîne également une réduction de l'activité de l'enzyme *MTHFR* plus marquée en cas d'homozygotie, et le mutant T1317C qui est un polymorphisme silencieux [89].

Le polymorphisme C677T du gène *MTHFR* est associé à une réduction significative de l'activité enzymatique, en particulier à l'état homozygote, et est caractérisé par une diminution de l'activité enzymatique de 70 % en cas d'homozygotie, et de 35 % en cas d'hétérozygotie [87].

Généralement, Les hétérozygotes composites C677T/A1298C présentent une diminution de 50 % de l'activité de la *MTHFR* [90].

IV. Diagnostic des cancers de l'estomac : [31]

Le diagnostic d'un cancer de l'estomac repose sur l'interrogatoire et l'étude des antécédents du patient à la recherche de lésions potentiellement précancéreuses, à l'examen clinique et au niveau des examens complémentaires qui feront le diagnostic surtout l'imagerie, l'aspect endoscopique et qui sera confirmé par l'anatomopathologie.

V. Principes du traitement du cancer de l'estomac : [31]

Le seul traitement curatif du cancer de l'estomac est le traitement chirurgical. L'objectif de cette résection chirurgicale, est d'obtenir une résection curative emportant toute la tumeur.

Des gestes de résections très étendues (gastrectomie totale avec curages ganglionnaires majeurs) étaient la règle il y a encore quelques années. Les études récentes mettent en avant l'intérêt de procéder à des résections plus limitées :

- Exérèses locales pour des tumeurs superficielles ne dépassant pas la muqueuse
- Gastrectomie partielle distale, lorsque la tumeur est de petite taille localisée à l'antrum et bien limitée.
- Gastrectomie totale pour les tumeurs de la partie moyenne de l'estomac ou pour les tumeurs infiltrantes.
- Oesogastrectomies pour les cancers du cardia.

PARTIE PRATIQUE

PARTIE PRATIQUE

I. Patients et méthodes:

Notre étude est du type cas témoins, a été réalisée au niveau du laboratoire de biologie et de génétique moléculaire de la faculté de médecine université 3 de Constantine, laboratoire de biochimie et des services de radio et chimiothérapie de gastroentérologie de chirurgie A et de médecine interne du CHU de Constantine. Elle a porté sur deux types de populations :

Une population de 63 témoins présumés sains et une population de 18 malades présentant des cancers gastriques (GC).

I.1. Recrutement des Sujets :

Les témoins : Au nombre de 63 issus de la population générale, sujets présumés en bonne santé des deux sexes originaires de l'Est algérien et âgé de 33 à 62 ans.

Les patients (malades): il s'agit de 18 sujets des deux sexes atteints de cancers gastriques présentant (ou non) des métastases, âgés de 42 à 81 ans, tous originaires de l'Est algérien admis au niveau du (CHUC) et appartenant aux services de : Gastroentérologie, Chirurgie A, Médecine interne, et de radio et chimiothérapie.

Les critères d'inclusions et d'exclusion pour les deux populations :

□ Critères d'inclusion :

Ont été inclus dans l'étude les sujets des deux sexes.

Les témoins :

- Sujets en bonne santé apparente et après interrogatoire, ne présentant aucun antécédent personnel ou familial de cancer.

Les patients :

- Atteints de GC avec ou sans antécédents familiaux, prouvé par une étude anatomo-pathologique en cours de traitement.
- Tous les patients en rémission d'un cancer de l'estomac qui se sont présentés pour un contrôle.
- Tous les patients récemment diagnostiqués pour un cancer de l'estomac se présentant pour une consultation.

PARTIE PRATIQUE

□ Critères d'exclusion :

- Pour les témoins :

Tout patient présentant un antécédent personnel ou familial de cancer, les sujets ayant refusé le prélèvement.

- Pour les patients :

- ✓ Sont exclus dans l'étude tous les patients présentant tout les autres cancers.
- ✓ Les sujets qui ont refusés le prélèvement à cause de leur état général qui n'est pas conservé.
- ✓ Les sujets souffrants une déshydratation.
- ✓ Les sujets aux veines fragilisées par la chimiothérapie.
- ✓ Les sujets ayant subi une transfusion sanguine.

I.2. Prélèvement sanguin :

Le prélèvement sanguin s'est effectué selon certains critères :

- ✓ Le prélèvement s'est fait systématiquement à chaque hospitalisation d'un patient présentant un GC.
- ✓ Tous les prélèvements ont été effectués avec pose de garrot.
- ✓ Nous avons prélevé les sujets en position semi- assise.
- ✓ Les prélèvements ont été réalisés sur deux tubes : EDTA (6 à 10ml).

I.3. Questionnaire et Enregistrement :

I.3.1. Questionnaire :

Un recueil de données a été effectué au niveau du service d'hospitalisation concerné. En plus du dossier médical du patient, un interrogatoire pour chaque patient a été mené par nous même (Annexe 1).

I.3.2. Enregistrement :

Tous les prélèvements recrutés sont étiquetés soigneusement, portant le nom et prénom des sujets associés à la numérotation (1, 2, 3, 4...). Sur chaque questionnaire, ont été mentionnés : le numéro du dossier et le lieu de prélèvement, ainsi que le numéro d'enregistrement de chaque sujet correspondant à celui sur notre registre.

PARTIE PRATIQUE

I.4. Extraction d'ADN :

Dans notre étude, l'ADN génomique a été extrait à partir des leucocytes du sang périphérique en utilisant un solvant inorganique le NaCl (Annexe 2).

I.4.1. Principe :

L'extraction de l'ADN consiste en l'isolation des leucocytes du sang total suite à une lyse hypotonique des globules rouges. Les leucocytes seront ensuite traités par :

- Un détergent Sodium dodécyle sulfate (SDS), qui possède une action lytique sur les membranes cellulaires, il inhibe les nucléases et dénature les protéines par destruction de leur structure tertiaire.
- Une protéinase K, qui dénature et dégrade les protéines.
- L'ADN nucléaire est ensuite libéré dans le lysat, et les protéines qui lui sont associées sont digérées et éliminées par précipitation au NaCl. Le surnageant ainsi récupéré est traité par de l'éthanol pur, dans lequel une pelote d'ADN se forme par précipitation.
- L'ADN est solubilisé en phase aqueuse (Tris EDTA 10 :1).
- La pureté d'ADN ainsi que sa concentration sont estimées par spectrophotométrie à UV.

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

I.4.2. Détermination de la pureté et de la concentration d'ADN :

▪ Détermination de la pureté :

260 nm et 280 nm sont respectivement les longueurs d'ondes d'absorption des acides nucléiques et des protéines. Le rapport de la DO à 260 nm sur la DO à 280 nm est utilisé pour s'assurer de la pureté d'ADN de tout contaminant d'ADN soit protéine ou ARN.

- Ce rapport (DO_{260}/DO_{280}) doit être compris entre 1.6 et 2 pour que l'ADN soit suffisamment pur.
- Si ce rapport est supérieur à 2 ($DO_{260}/DO_{280} > 2$) cela veut dire que l'ADN est contaminé par les ARN.

PARTIE PRATIQUE

- Si ce rapport est inférieur à 1.6 ($DO_{260}/DO_{280} < 1.6$), cela veut dire que l'ADN est contaminé par les protéines.

Si l'ADN est contaminé, il faut procéder à la réextraction de celui-ci pour un bon usage et un bon résultat dans l'étape suivante, la PCR. Enfin l'ADN pur est conservé à + 4°C jusqu'à utilisation.

- **Détermination de la concentration :**

A 206 nm une unité de densité optique correspond à :

- 50 µg/ml pour une solution d'ADN double brin
- 250 µg/ml pour une solution d'ADN simple brin

On mesure donc à 260 nm et 280 nm la DO d'une dilution au 1/100^{ème} de la solution à doser (10 µl de l'ADN dilué dans 990 µl d'eau stérile), et on déduit la concentration d'ADN grâce au calcul suivant :

$$[C](\mu\text{g} / \text{ml}) = \text{facteur de dilution} \times DO_{260} \times 50 \text{ mg} / \text{ml}$$

$$[C](\mu\text{g} / \text{ml}) = DO / \Sigma L \times \text{Vol total} / \text{vol d'ADN}$$

Donc le facteur de dilution est égal à : Vol total / vol d'ADN, considérant que l'ADN est dilué au 1/100^{ème} donc le facteur de dilution est égal à 100 (1000 étant le volume total /10 volume d'ADN).

I.5. Génotypage de la MTHFR:

Le génotypage de la MTHFR a consisté à amplifier une partie de l'ADN contenant le gène, puis de différencier les génotypes par digestion par une enzyme de restriction spécifique.

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

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

I.6. La PCR (Polymérase Chaîne Réaction)

PARTIE PRATIQUE

La PCR ou Polymerase Chain Reaction (la réaction de polymérisation en chaîne) est une technique qui permet d'amplifier l'ADN ou l'ARN in vitro. Elle a été développée par Kary Bank Mullis , prix Nobel de chimie en 1993 [92].

I.6.1. Préparation du milieu réactionnel (ou mix) de PCR

Pour préparer le milieu réactionnel (Annexe 3), multiplier la quantité de chaque composant par le nombre de tubes voulu plus un ou deux, c'est le tube témoin négatif dans lequel on met uniquement le mélange sans ADN.

L'ADN est amplifié par PCR avec deux amorces encadrant la région (exon4) contenant les deux codons polymorphes de l'acide aminé 222 de la MTHFR (Annexe 3).

I.6.2. Déroulement des cycles de la PCR

Chaque cycle de la PCR repose sur trois étapes indispensables : Dénaturation, hybridation et élongation (Annexe 3)

I.6.3. Contrôle des produits de la PCR

Le contrôle de la taille des fragments amplifiés a été effectuée par une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5 % additionné à 10 µl de BET (Bromure d'éthidium), ce dernier est un réactif intercalant qui se fixe entre les bases nucléiques à l'intérieur de la double hélice et qui rendra les ADN fluorescents par exposition aux UV (le gel est ensuite coulé sur une plaque d'une cuve horizontale).

Dans chaque puits du gel, il est déposé :

- 10 µl de produit d'amplification + 3 µl BBP (Bleu de Bromophénol) qui permet de suivre le front de migration.
- 3 µl de marqueur de taille (PM 100pb LADDER, ref.018209) +10µl H₂O + 2µl BBP
Les dépôts se font du côté de la cathode (-).

Le système soumis à une migration sous un courant de 60 à 120 volts pendant 45 min. Cette analyse permet aussi, d'observer si une éventuelle contamination de l'ADN est survenue au cours de la PCR.

Après la migration, le gel est soumis au rayon UV. Les molécules de bromure d'éthidium fixées aux ADN émettent une lumière visible et photographiable permettant de visualiser les

PARTIE PRATIQUE

fragments amplifiés sous forme de bandes fluorescentes de mêmes tailles (figure : 7). Ce contrôle permet aussi de vérifier si une éventuelle contamination de l'ADN est survenue au cours de la PCR grâce au puits contenant le blanc (témoin négatif : T).

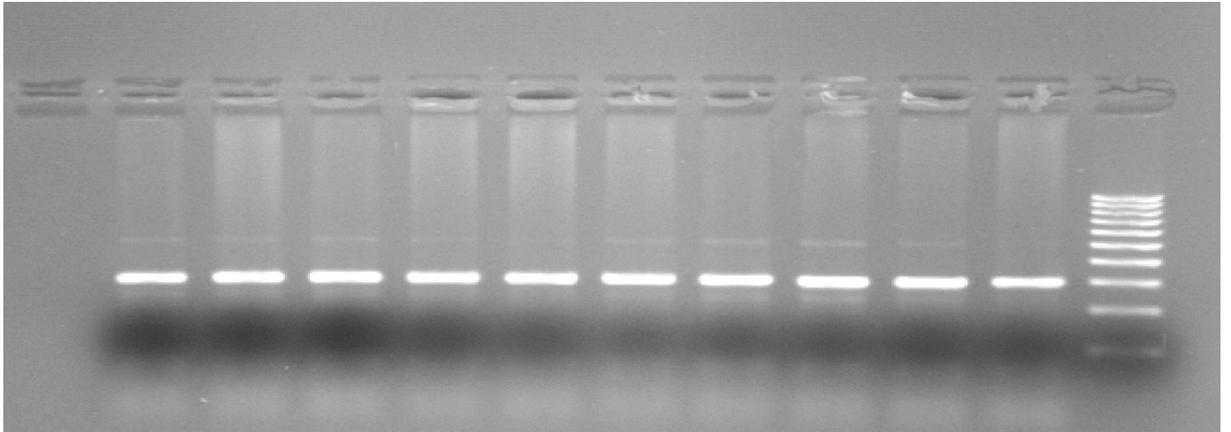


Figure 7: Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % des fragments amplifiés (198pb) par PCR du gène de la *MTHFR*.

I.6.4. Digestion des produits de PCR

Préparer le milieu de digestion de l'enzyme Hinf I pour de tubes voulu + 1 témoin (Annexe 4: tableau 23).

I.6.4.1. Digestion par l'enzyme de restriction HinfI:

Hinf I est une enzyme de restriction produite par la bactérie *Haemophilus influenzae* ;

Elle reconnaît et clive la séquence G/ANTC codant pour l'Alanine en position 222 (figure8).

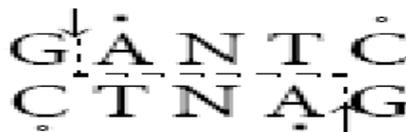


Figure 8: site de restriction par l'enzyme Hinf I

Les produits de PCR sont soumis à une digestion enzymatique par Hinf I. Ils sont incubés pendant une nuit dans un étuve à 37°C.

Après incubation ils sont concentrés.

PARTIE PRATIQUE

I.6.5. Conditions de migration

✚ Préparation d'un gel d'agarose:

Après préparation du gel d'agarose (3g d'agarose dans 100 ml de TBE 1X).

- Monter le support du gel.
- Homogénéiser, couler immédiatement en versant le contenu de bûcher dans le support en plaques de verre en ayant soin de ne pas faire de bulles.
- Placer le peigne plat afin de former les puits et laisser polymériser à température ambiante pendant 1h 30 min à 2h 30 minutes (**Annexe 4**).

✚ Dépôts des échantillons :

Quand le gel est polymérisé, plonger le système (gel + électrodes) dans la cuve horizontale contenant un volume (450ml) du tampon Tris Borate EDTA (TBE 1X).

Oter le peigne et déposer délicatement au fond de chaque puits un échantillon ou marqueur (Annexe 4).

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

✚ Migration :

La migration se fait en parallèle avec des fragments d'ADN appelés marqueurs de taille (leurs tailles sont connues) et en présence d'un témoin hétérozygote connu à un voltage de 80 volts.

I.6.6. Révélation du profil électrophorétique :

Le BET fluorescent aux UV se fixe sur l'ADN (cette molécule s'intercale entre les bases de la molécule d'ADN) et va permettre de visualiser les fragments de restriction dans le gel placé sur la table à UV.

Lorsqu'on obtient une séparation nette des différents fragments du marqueur (après

2h 30 mn, le gel est photographié après transillumination aux UV (figure 9).

PARTIE PRATIQUE

✓ Profils RFLP obtenus

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

La digestion enzymatique de l'amplificat de la MTHFR par Hinf I a générée des fragments de : 175pb, 198pb, et 23pb, le premier apparaît sur le profil électrophorétique sous forme d'une seule bande qui correspond au type homozygote muté (TT), le deuxième apparaît aussi sous forme d'une seule bande, il s'agit du type homozygote sauvage (CC). Les deux bandes ensemble, correspondent au type hétérozygote (CT) (voire la figure 9 ci dessous). Le troisième n'est pas visible à cause de sa faible taille.

Les conditions d'amplification du fragment de 198pb de l'exon 4 , fragment encadrant les sites de restriction ou des mutations par PCR étaient comme suit : une dénaturation initiale à 94 °C pendant 5 minutes, suivie de 30 cycles de PCR, comprenant chacun une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une hybridation à 65 °C pendant 30 secondes et une élongation à 72 °C pendant 40 secondes, et enfin une élongation finale à 72 °C pendant 10 minutes.

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

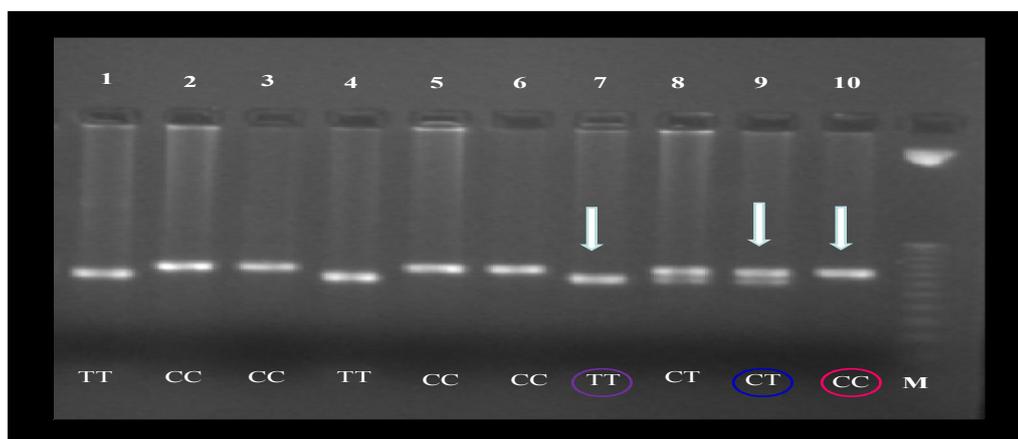


Figure 9: Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments issus du clivage par Hinf I et présentation des différents génotypes de la C677T de la MTHFR.

PARTIE PRATIQUE

I.7. Les paramètres statistiques :

I.7.1. Calcul de l'odds ratio :

Pour calculer l'odds ratio nous avons établi un tableau de contingence : Il est présenté sous forme de tableau croisé 2×2. Le statut malade/non malade des sujets de l'étude est présenté en colonne et le caractère exposé/non exposé en ligne.

Tableau 3: tableau de contingence.

	Malades	Témoins	
Exposé (E+)	A	B	a+b
Non exposé (E-)	C	D	c+d
	a+c	b+d	Totale

Le calcul de l'Odds ratio se fait par la formule suivante :

$$OR = a*d / b*c$$

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

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

I.7.2. Les intervalles de confiance:

L'approche estimative de l'analyse statistique vise à quantifier l'effet étudié et le degré de certitude de cette estimation grâce à un intervalle de confiance, qui identifie généralement une fourchette de valeurs situées de part et d'autre de l'estimation et l'on peut être sûr à 95% d'avoir trouvé la valeur réelle.

La notion d'un intervalle de confiance repose sur l'idée suivante : Si la même étude était réalisée sur un échantillon différent de patients, les résultats ne seraient pas identiques, mais seraient proches du résultat véritable qui reste inconnu. L'intervalle de confiance estime cette variation due à l'échantillon (100).

Il a été calculé selon la méthode de Woolf (méthode des logits) pour la probabilité = 0.05 :

$$\text{Intervalle de confiance Odds Ratio} = (e)^{LN(OR) \pm 1,96(1/A+1/B+1/C+1/D)/2}$$

$$(e) = 2.71828182845904$$

I.7.3. 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

PARTIE PRATIQUE

significative pour apparemment arbitraire est nécessaire pour l'homogénéité de la présentation des résultats.

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

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

II. Résultats :

II.1. Répartition des sujets :

II.1.1. Répartition des témoins selon l'âge et le sexe :

II.1.1.1. La répartition selon le sexe:

Notre étude a inclus 63 témoins répartis en :

- 38 hommes (60 %).

- 25 femmes (40 %) avec un sexe ratio H/F de 1.52.

Tableau 4: Répartition des témoins selon le sexe

Sexe	Effectifs	%
Hommes	38	60 %
Femmes	25	40 %

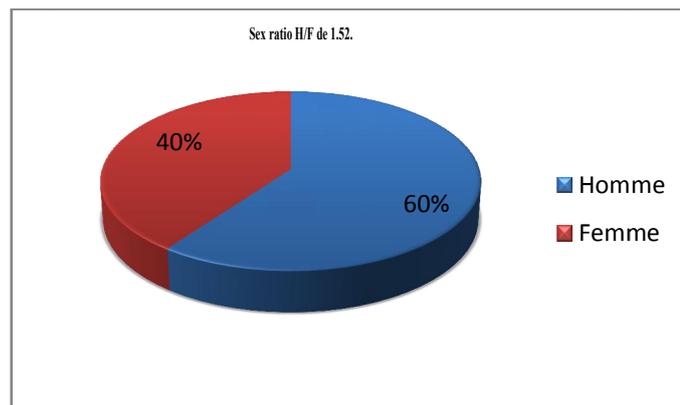


Figure 10: Répartition des témoins selon le sexe.

II.1.1.2. La répartition des témoins selon l'âge:

L'âge moyen de la population témoin était de (33±10) ans chez les femmes et de (28±10) ans chez les hommes. Avec des extrêmes allant de 17 et de 62 ans.

La population témoin a été répartie en tranche d'âge de 10 ans allant de 10 ans jusqu' à 60 ans.

Tableau 5: Répartition en tranche d'âge dans la population témoins.

Tranches d'âge	Population témoins	%
10-19	2	3%
20-29	36	57%
30-39	14	22%
40-49	8	13%
50-59	2	3%
≥60	1	2%
Total	63	100%

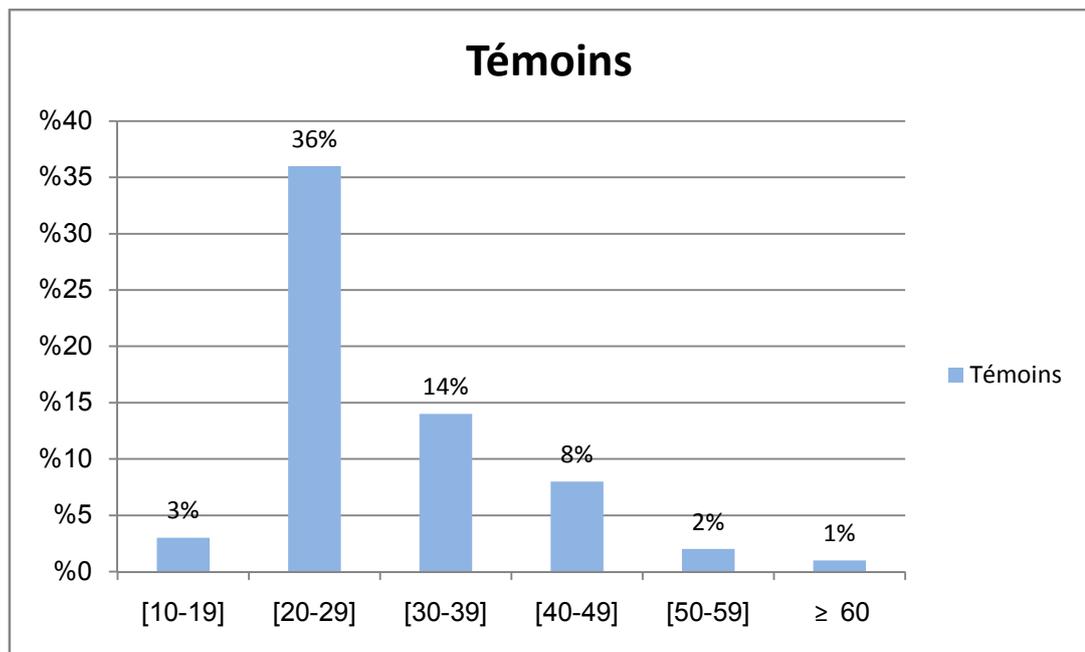


Figure 11: Répartition des témoins selon l'âge .

Dans la population témoin, la tranche d'âge 20 à 29 est plus représentée suivie de la tranche d'âge 39 à 40 ans par contre les autres tranches d'âge sont faiblement représentées et cela pour tous les sexes confondus.

II.1.2. La répartition selon l'âge et le sexe :

Tableau 6: Répartition de la population témoin selon l'âge et le sexe

Age	Hommes		Femmes		Total	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)
10-19	2	5%	0	0%	2	3%
20-29	24	63%	12	48%	36	57%
30-39	5	13%	9	36%	14	22%
40-49	6	16%	2	8%	8	13%
50-59	1	3%	1	4%	2	3%
≥60	0	0%	1	4%	1	2%
Totale	38	100%	25	100%	63	100%

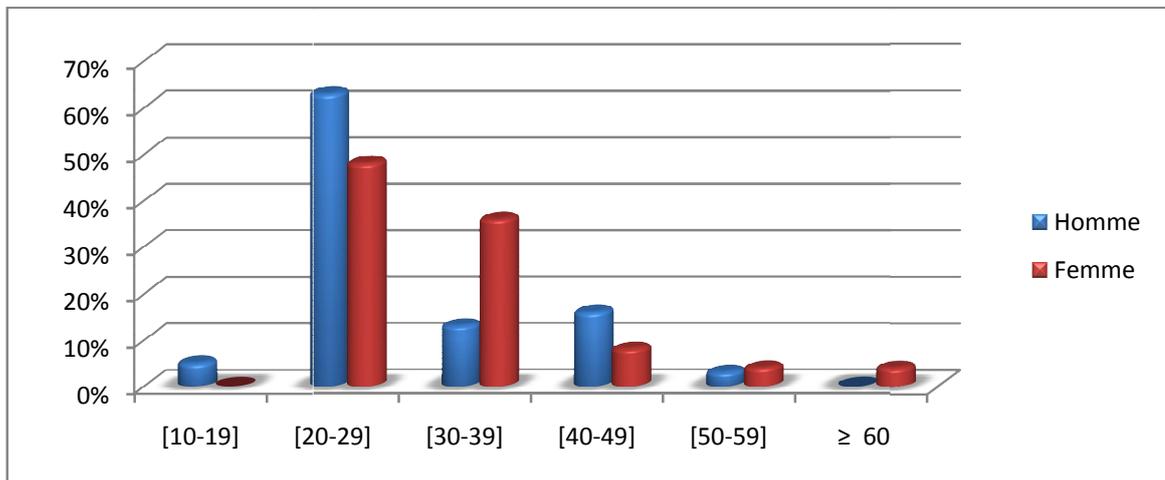


Figure 12: Répartition de la population témoin selon l'âge et le sexe.

Dans la population témoin, la tranche d'âge 20 à 29 est plus représentée suivie de la tranche d'âge 39 à 40 ans chez les hommes et 40-49 chez les femmes par contre les autres tranches d'âge sont faiblement représentées et cela dans les deux sexes.

II.1.3. Répartition des fréquences génotypiques et alléliques de la MTHFR chez les témoins :

L'analyse moléculaire des échantillons des témoins à permis de mettre en évidence la mutation C677T du gène de la MTHFR.

Les fréquences alléliques des deux allèles C et T de et les fréquences génotypiques de la MTHFR homozygotes C/C (val/val), les hétérozygotes C/T (val/ala) et les homozygotes T/T(ala/ala) ont été calculés dans la population témoin.

PARTIE PRATIQUE

II.1.3.1. Répartition des fréquences génotypiques chez les témoins :

Tableau 7: Fréquence génotypique de la mutation C677T du gène de la MTHFR dans la population témoin.

Génotype	Effectifs	Fréquences (%)
T/T	4	6 %
C/C	23	37 %
C/T	36	57 %
Total	63	100 %

36 (57 %) de nos témoins sont hétérozygotes C/T, 4 (6 %) sont homozygotes mutés T/T, et 23 (37 %) sont des homozygotes normaux C/C.

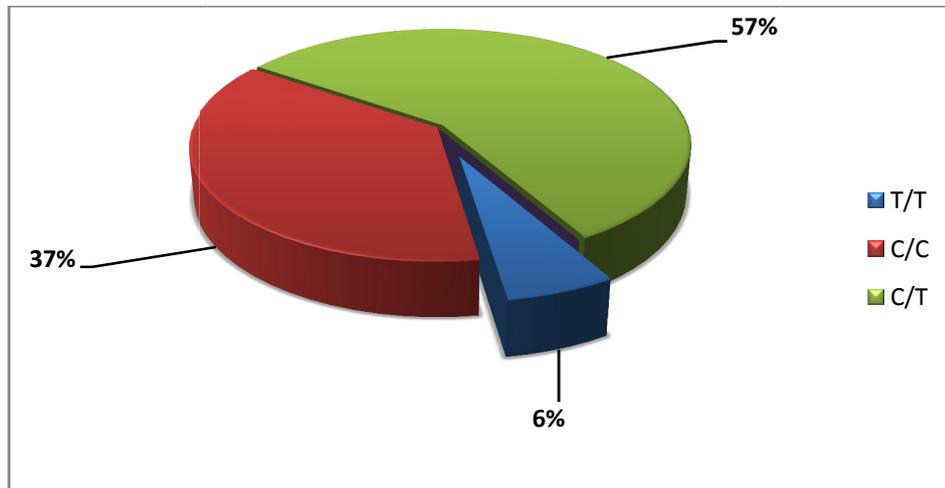


Figure 13 : Répartition des fréquences génotypiques chez les témoins.

II.1.3.2. Répartition des fréquences alléliques :

Tableau 8 : Répartition des fréquences alléliques de la MTHFR dans la population témoin

allèle	Effectifs	Fréquences (%)
T	44	34.92
C	82	65.07
T+C	126	100

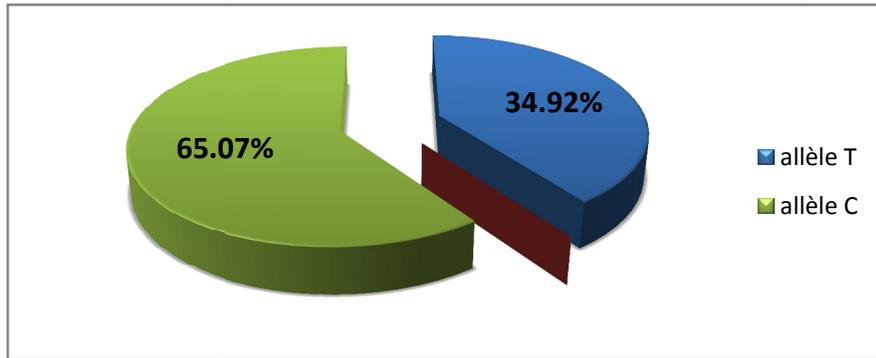


Figure 14: Répartition des fréquences alléliques chez les témoins.

65.07% des témoins portent l'allèle C alors que 34.92 % portent l'allèle T.

II.1.4. Répartition des sujets malades :

II.1.4.1. Selon le sexe :

Les sujets présentant un cancer gastrique sont au nombre de 18 répartis entre :

4 de sexe féminin soit 22.22 %

14 de sexe masculin soit 77.78%

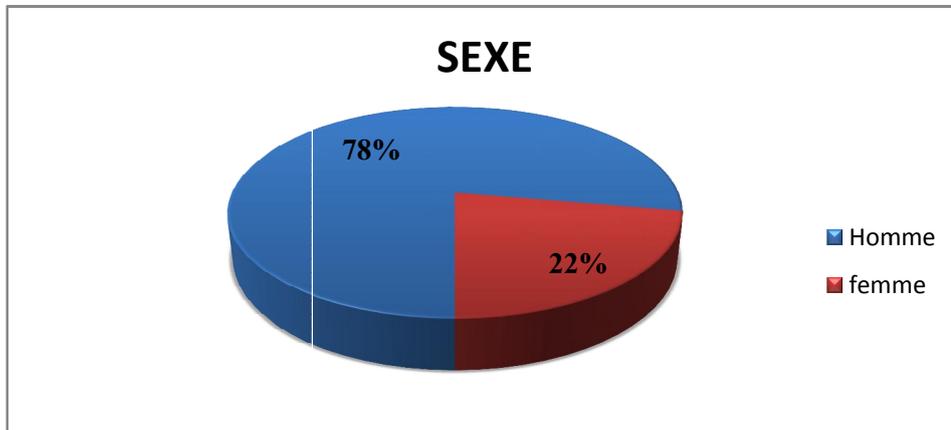


Figure 15 : La répartition des sujets malades selon le sexe

La répartition des sujets malades selon le sexe montre une prédominance du cancer gastrique chez les hommes que chez les femmes avec un sexe ration de 3.5.

II.1.4.2. Selon l'âge :

La moyenne d'âge de notre échantillon est de (58.5 ± 11) ans .les patients ont été ensuite regroupés en tranche d'âge de 40 ans jusqu'à 69 ans, puis en un seul groupe de 70 et au-delà.

PARTIE PRATIQUE

Tableau 9 : répartition des sujets malades selon l'âge

Age (ans)	Hommes		Femmes		Total	
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
30-39	0	0	0	0	0	0
40-49	3	21.43	2	50	5	27.78
50-59	4	28.57	1	25	5	27.78
60-69	6	42.86	0	0	6	33.33
>70	1	7.14	1	25	2	11.11
Total	14	100	4	100	18	100

L'âge moyen de la population malade était de 57.28 ans chez les femmes et de 58.46 ans chez les hommes avec des valeurs extrêmes de 42 à 81 ans.

Dans la population malade, la fréquence des sujets atteints est plus élevée dans la tranche d'âge : 60 à 69 ans (33.33%) et cela pour les deux sexes. Ce taux reste relativement important entre 40 et 49 ans (27.78%) et entre 50 à 60 ans (27.78).

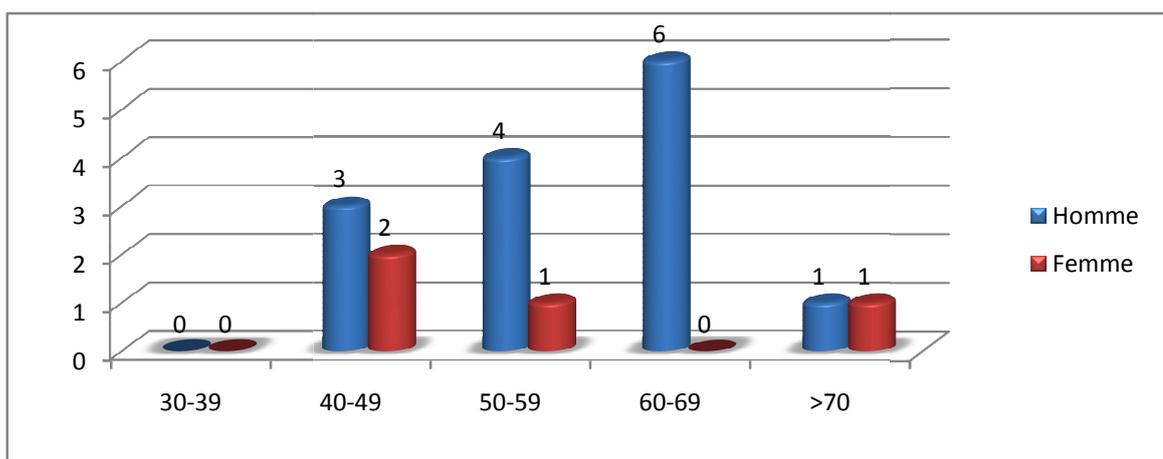


Figure 16 : répartition des sujets malades selon l'âge.

PARTIE PRATIQUE

II.1.4.3. Selon la localisation de cancer gastrique (GC) :

Tableau 10 : Répartition des sujets malades selon la localisation du GC.

Localisation du cancer gastrique	malade	
	Nombre	%
Cardia	2	11.11
fundo cardiale	0	0
fundique	2	11.11
Fundo antrale	2	11.11
Antrale	4	22.22
antropylorique	7	38.89
Tout l'estomac	1	5.56
pylore	0	0
Total	18	100

Dans la population étudiée, le cancer gastrique est majoritairement localisé à la partie antropylorique avec un pourcentage de 38.89% suivi par la localisation antrale 22.22%. Les autres localisations restent minoritaires.

PARTIE PRATIQUE

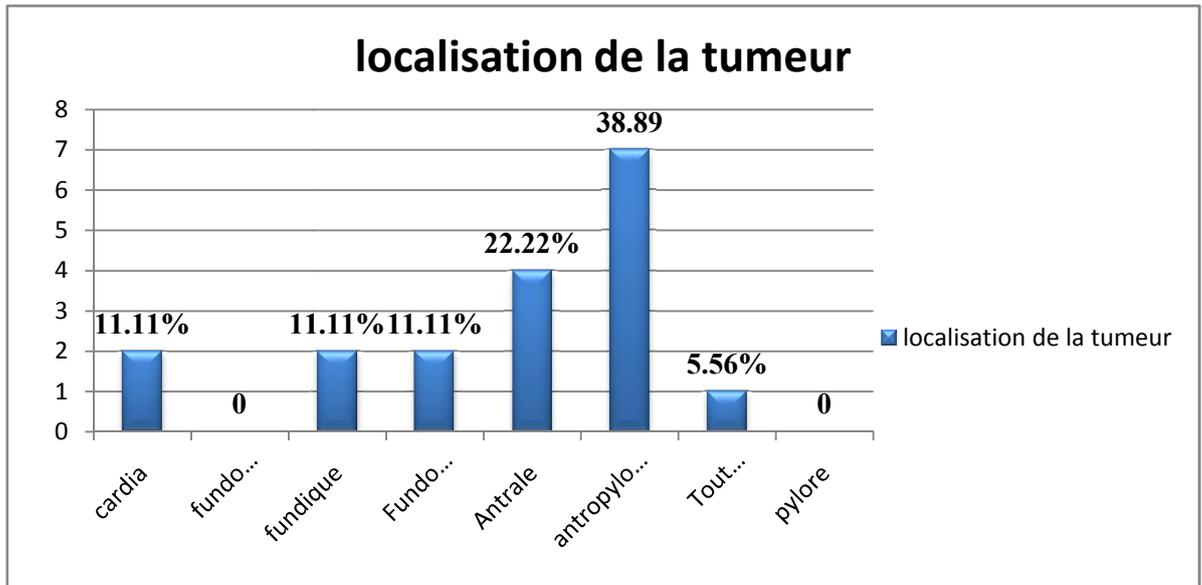


Figure 17 : Répartition des sujets malades selon la localisation du GC.

II.1.4.4. Selon les facteurs de risque :

Tableau 11: Répartition des sujets malades selon les facteurs de risque

Facteurs de risque	Malade exposé	
	Nombre	%
Viande	3	16.66
Sucrerie	5	27.77
Tabac	10	55.55
Café	14	77.77
Alcool	5	27.77
Chique	3	16.66
Végétaux	1	5.55

Les circonstances favorisantes étaient :

PARTIE PRATIQUE

-Chez les hommes dans 55.55% des cas le tabac, suivis dans 27.77% des cas de l'alcool.

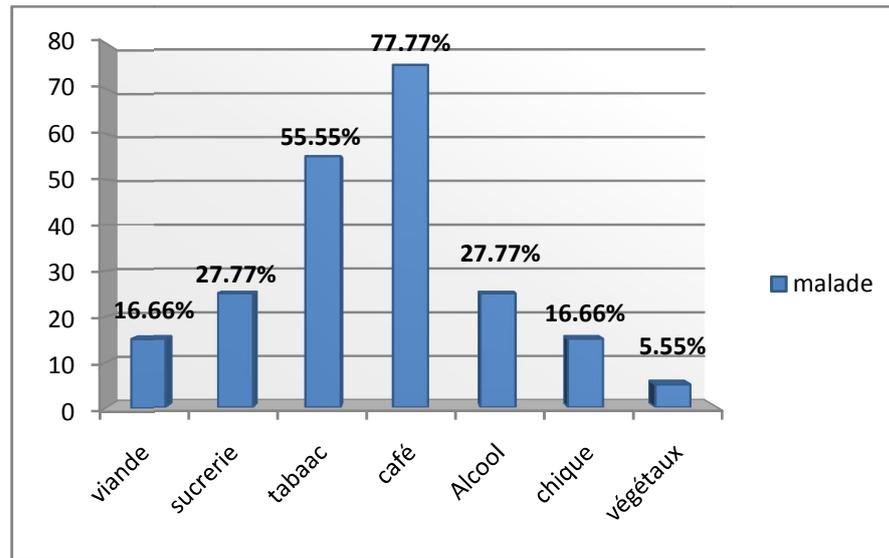


Figure 18: Répartition des sujets malades selon les facteurs de risque

II.1.4.5. Selon les antécédents de cancer

Nous avons constaté dans notre série l'existence d'un manque d'information dans les dossiers de 3 de nos patients concernant les antécédents personnels et pour les antécédents familiaux 2 dossiers.

Tableau 12 : Répartition des sujets malades selon les antécédents

Antécédents des malades	Nombre	%
Ulcère	3	16.66
Familiaux de cancer	6	33.33

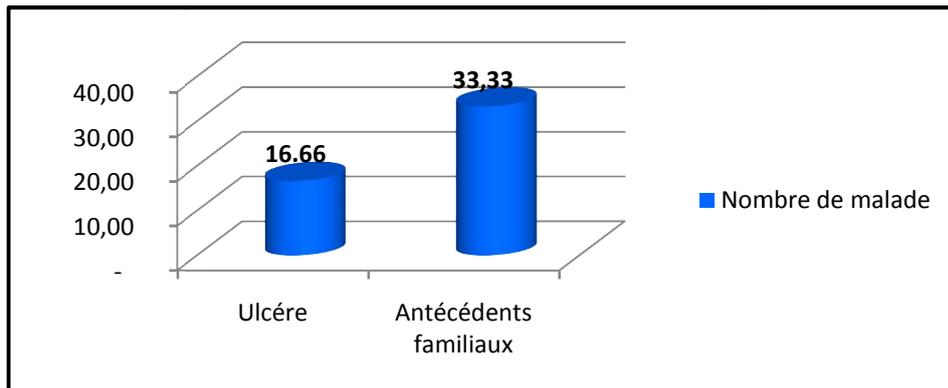


Figure 19 : Répartition des sujets malades selon les antécédents

II.1.4.6. Répartition des malades selon le groupe sanguin :

L'étude des dossiers a montré que la plus part des patients ont des groupes sanguins A et O avec un pourcentage 50% pour O+ et 27.78% pour A+ (les sujet à groupage rhésus non déterminé sont aux nombre de 4).

Tableau 13 : Répartition des malades selon le groupe sanguin.

groupage	Nombre des malades	%
O+	9	50
A+	5	27.78
Non déterminé	4	22.22
Total	20	100

II.1.4.7. Répartition selon le type histologique du cancer gastrique:

L'étude du type histologique de la tumeur montre que l'adénocarcinome est le plus fréquent avec un pourcentage 77.78 % des cas, suivi du lymphome avec 16.16% et du Carcinome épidermoïde avec une fréquence de 5.55%.

PARTIE PRATIQUE

Tableau 14 : Répartition selon le type histologique du cancer.

	Nombre	%
adénocarcinome	14	77.78
Lymphome gastrique	3	16.67
Carcinome epidermoide	1	5.55

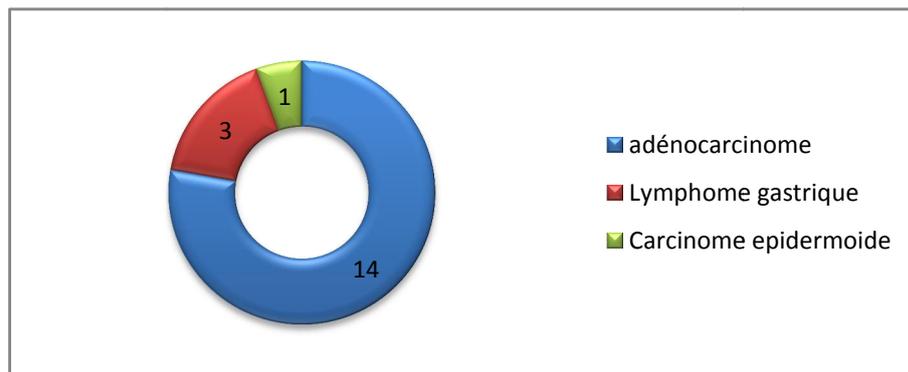


Figure 20 : Répartition selon le type histologique du cancer

II.1.4.8. Répartition des fréquences génotypiques et alléliques chez les sujets malades :

➤ **Fréquences génotypiques des malades :**

Tableau 15: Fréquences génotypiques de la mutation C677T du gène de la MTHFR

dans la population malade

Génotype	Effectifs	Fréquence (%)
T/T	2	11.11%
C/C	11	61.11%
C/T	5	27.78%
Total	18	100%

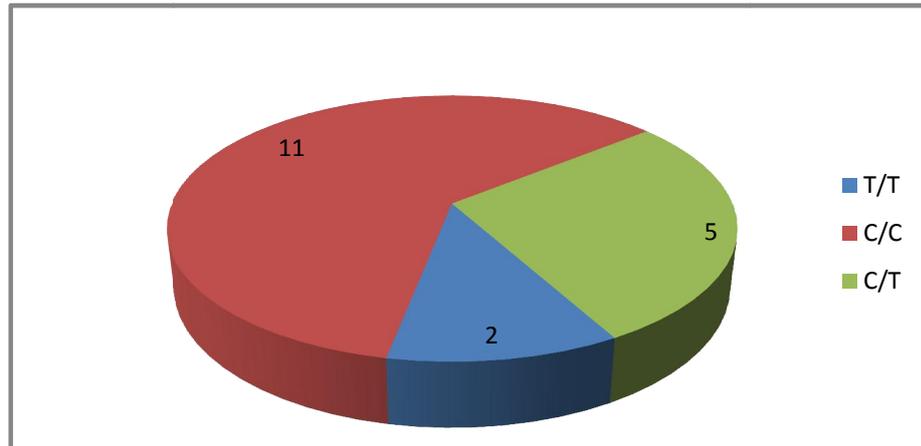


Figure 21: Répartition des fréquences génotypiques chez les malades.

61.11% de nos patients ont présenté le génotype **C/C**, 11.11% le génotype **T/T** et 27.78 % le génotype **C/T**.

➤ **Fréquences alléliques des malades :**

Tableau 16: Répartition des fréquences alléliques de la MTHFR dans la population malade

Allèles	effectifs	%
T	9	25
C	27	75
T+C	36	100

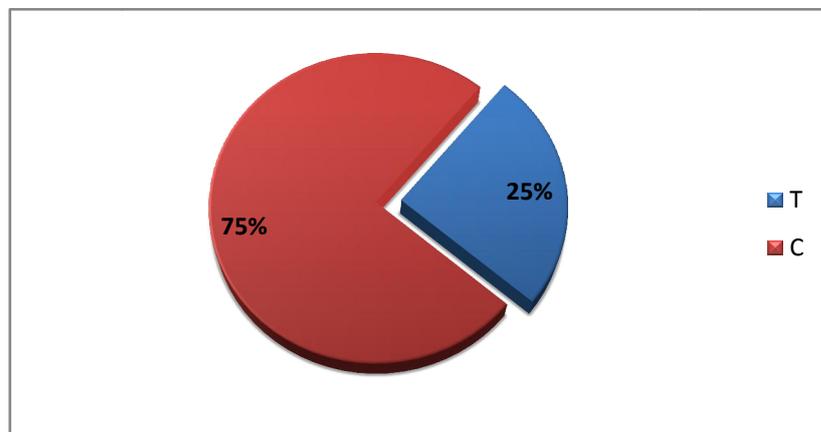


Figure 22: Répartition des fréquences alléliques chez les malades

PARTIE PRATIQUE

Les fréquences des allèles C et T respectivement de 75 % et 25% chez les patients possédant un cancer gastrique tout sexe confondu.

➤ **Fréquences génotypiques des malades et des témoins:**

Le tableau 17 et la figure 23 montrent la comparaison des fréquences entre les témoins et les malades.

Tableau 17: Répartition des génotypes de la MTHFR des témoins et des malades

Génotypes	Témoins		Malades	
	N	%	N	%
T/T	4	6%	2	11.11%
C/C	23	37%	11	61.11%
C/T	36	57%	5	27.78%
Total	63	100%	18	100%

Si on compare les fréquences des génotypes C/C, C/T, et T/T des témoins avec ceux des malades, il apparaît clairement une différence entre la fréquence des différents génotypes.

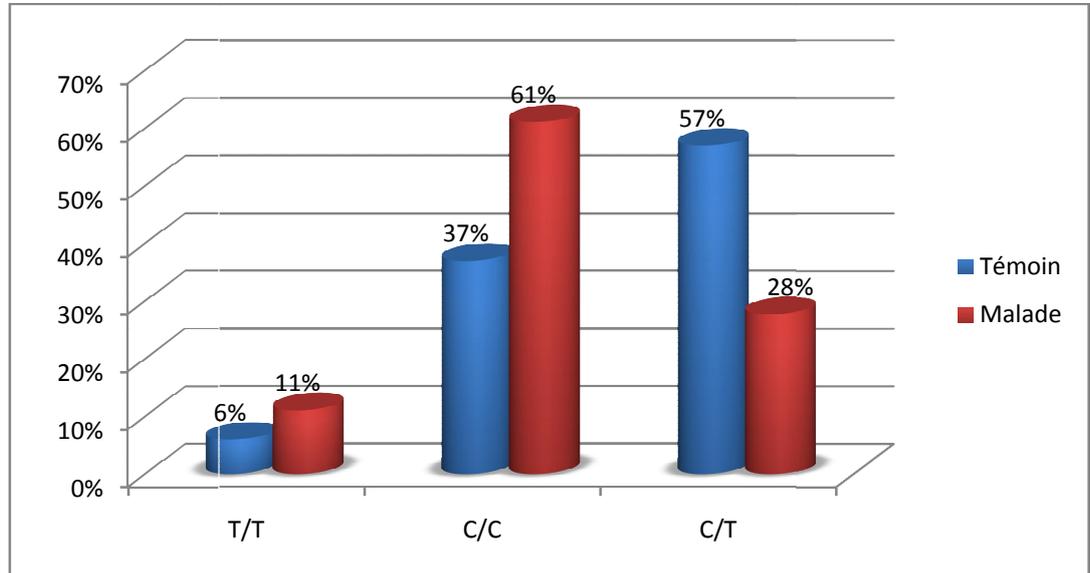


Figure 23: Représentation de Répartition des génotypes de la MTHFR des témoins et des malades.

PARTIE PRATIQUE

Tableau 18 : Répartition des fréquences alléliques de la MTHFR dans la population témoin et malades.

Génotypes	Témoins		Malades	
	N	%	N	%
T	28	34.92	9	25
C	36	65.07	27	75
Total	64	100	36	100

La fréquence de l'allèle T chez les patients présentant un GC est de 25 % est plus basse que celle des témoins. Par contre celle de l'allèle C est prépondérante chez les patients.

➤ **Polymorphisme de la MTHFR et risque de cancer gastrique :**

Tableau 19 : Calcule des Odds ratio des sujets malades ayant un allèle T, T/T par rapport aux témoins ayant un génotype C/C.

	Odds ratio	P
T/T vs C/C	OR= 1.05	Non significatif
TT+CT vs CC	OR= 0.37	Non significatif

Des odds ratio avec un intervalle de confiance ont été calculés à fin de déterminer un lien possible entre le polymorphisme de la MTHFR et le cancer gastrique.

L'odds ratio chez les patients possédant le génotype T/T vs C/C présentant un GC est de OR= 1.05, il est non significatif.

L'odds ratio des patients possédant le génotype C/T vs C/C est de 0.37, il est non significatif.

Selon les données précédentes nous pouvons dire que le polymorphisme C677T de la MTHFR n'est pas impliqué dans la survenue du cancer gastrique.

III - Discussion :

Dans ce travail, nous avons étudié le polymorphisme C677T de la MTHFR dans une population de 18 patients ayant présenté un Cancer gastrique et chez 63 témoins.

Nous avons aussi étudié et comparé les données suivantes :

- Le sexe
- L'âge des patients au diagnostic
- La localisation de cancer gastrique
- Le groupage
- Les antécédentes au cancer
- Le type histologique de la tumeur
- La distribution des fréquences alléliques et génotypiques chez les témoins

➤ Les caractéristiques phénotypiques de nos patients

Selon le sexe et âge :

La répartition des sujets malades selon le sexe a montré que le cancer gastrique (GC) est plus fréquent chez les hommes que les femmes avec une fréquence de 77.78% pour le sexe masculin et seulement 22.22% pour le sexe féminin, avec un sexe ratio de 3.5.

Il y a une différence significative de la prédispositions au cancer gastrique entre les deux sexes. Nos résultats sont en accord avec ceux d'une étude marocaine L. Chabani [93] qui a porté sur 19 cas de GC (19 cas , sexe ratio 3.7) ,en revanche d'autres études comme celle de Jamal et al, 2011 [1], et J. Ferlay et al ,2012 (1.36) [2] et ceux d'une étude Canadienne réalisée en 2011 [94], ont retrouvé des sexe ratio de 1.36 et 1.9 respectivement .Cette différence pourrait être expliquée par le nombre limité des cas de notre étude.

Dans notre étude l'incidence du GC est plus importante chez l'homme que chez la femme, L'origine de cette différence demeure mal expliquée. Il a été suggéré que les hormones féminines auraient un rôle protecteur (Sipponen P et al, 2002) [95].Précisément l'œstrogène puisque des récepteurs d'œstrogènes ont été identifiés à la surface des cellules du tissu gastrique, qui peuvent activer des protéines inhibitrices d'oncogènes [96], de plus L'atteinte s'élève avec l'âge en particulier chez les hommes.

La répartition des malades présentant un cancer gastrique selon l'âge et le sexe a montré une fréquence élevée de la maladie dans la tranche d'âge 60-69 ans chez les hommes suivie de la tranche d'âge 50-59 ans pour les femmes et la tranche d'âge 40-49 ans est la plus élevée les autres tranches d'âge restantes sont faibles.

PARTIE PRATIQUE

Nos résultats sont similaires de celui de M. Hamdi Cherif et al, 2010 [14], cependant le GC dans les pays développés, la moyenne d'âge est supérieure ou égale à 70 ans (Benhamiche A.M et al, 2000) [97].

Tous ces chiffres prouvent que le cancer gastrique survient rarement avant l'âge de 40 ans avec une incidence qui augmente régulièrement après cet âge pour atteindre un pic entre la 6ème et la 7ème décennie [98,99].

En France, le cancer de l'estomac est rare avant 50 ans pour les deux sexes.

Les taux d'incidence augmentent jusqu'aux âges les plus élevés chez les deux sexes, mais le risque demeure constamment plus élevé chez les hommes. Entre 50 et 80 ans, le cancer de l'estomac fait plus que doubler chaque décennie [100]. En Amérique du Nord, l'âge médian de diagnostic de cancer de l'estomac est de 70 ans. Environ 6,4% des patients ont moins de 44 ans [101,102]. L'apparition tardive de la maladie peut être expliquée par l'évolution lente de l'inflammation [103].

Selon la localisation du cancer gastrique :

L'adénocarcinome distal représente 75 % des cancers gastriques dans les pays occidentaux [104]. Dans nos résultats la localisation la plus touchée est l'atteinte de antropylorique avec 38.89%.

Nos résultats corroborent avec ceux d'A. Togo et al, 2010 [105], Koffi E et al, 1999 [98].

Selon le groupage :

L'appartenance au groupe sanguin A, pourraient jouer un rôle dans la pathogénie du cancer gastrique et cela beaucoup plus dans sa forme diffuse que dans sa forme intestinale.

Dans notre série le pourcentage de sujets ayant les groupes sanguins O et A sont similaires à ceux de E Kofi et al, 1999 [98] et ceux de Iodice et al, 2010 [106] par contre dans l'étude de Wang et al, 2012 [107], c'est plutôt le groupe O qui prédominait.

La présence de facteur BabA (antigène binding adhesion) d'*H.pylori* est associée à la maladie ulcéreuse, à l'adénocarcinome et aux lésions précancéreuses. Il y a une affinité de BabA avec l'antigène Leb (Lewis B antigène), retrouvée sur la surface des globules rouges du groupe (O,A), Aspholm-Hurting et al, 2004 [108], Yamaoka, 2008 ; Rad et al, 2002 [109,110].

PARTIE PRATIQUE

Les antécédents aux maladies ulcéreuses et familiales de cancer :

Dans notre étude nous n'avons pas pu rechercher dans les antécédents de tous les patients la présence ou l'absence de maladie ulcéreuse avant l'apparition du GC ; dans les résultats de nos patients, nous avons retrouvé des antécédents d'ulcère gastrique chez 16.66%. Un antécédent d'ulcère gastrique est retrouvé dans environ un quart des cas selon Wanebo et al, 1993 [111].

Dans notre série les patients qui n'ont pas d'antécédents de maladie cancéreuse ont représenté 55.55% et 33.33 % des patients ont présenté des antécédentes de maladies cancéreuses.

Le type histologique de la tumeur :

Plus de 90 % des cancers de l'estomac sont des adénocarcinomes, le restant correspondant essentiellement à des lymphomes ou des tumeurs stromales.

Sur les 18 cas de cancers gastriques, l'adénocarcinome est la forme histologique la plus fréquente (77.78%), suivie par les Lymphomes gastriques (16.67%), et les carcinomes ééidermoïdes (5.55%), ces résultats sont en concordance avec ceux de J.B. Moussavou-Kombila et al [112], Togo et al 1999[105], et ceux de Youssouf Kone du Mali 2006 [27].

➤ Caractéristiques génotypiques de nos patients

36 (57 %) de nos témoins sont hétérozygotes C/T, 4 (6 %) sont homozygotes mutés T/T, et 23 (37 %) sont des homozygotes normaux C/C. En effet les fréquences génotypiques du polymorphisme C677T de la MTHFR des témoins sont très variables selon les différents groupes ethniques [113].

La distribution mondiale du polymorphisme C677T est très hétérogène. Elle correspond géographiquement à une répartition croissante Nord-Sud, notamment en Europe et en Amérique du Nord.

En Europe, la fréquence du génotype T/T est faible au nord , de 4 à 7 % en Finlande et en Russie, intermédiaire de 8 à 10 % en France et 12 à 15% en Espagne et au nord de l'Italie et élevé au sud 20 à 26 % en Sicile. Un gradient similaire a été trouvé en Amérique du Nord, où la fréquence du génotype T/T augmente de l'ouest du Canada (Alberta) au sud-est des Etats-Unis, pour atteindre un pic au Mexique (tableau 20) [113].

PARTIE PRATIQUE

La fréquence du génotype T/T dans notre population témoin est de 6 % ce rapport est similaire à celui retrouvé en Turquie, Tunisie, en France à Rotterdam, et est très différent de celui retrouvé au Mexique et en Italie [113], alors qu'un très faible pourcentage chez les afro-américains est retrouvé [113,114, 115,116]. Parmi 102 malades afro-américains, Mc Andrew et al [115] n'ont retrouvé aucun cas d'homozygotie TT. Adjalla et al [117], ont rapporté une fréquence de 0,8 % du variant génotypique TT dans la population noire issue de l'Afrique de l'Ouest. A l'état hétérozygote (CT), cette mutation est présente chez approximativement 40 % des caucasiens, 20 % des afro-américains, et 15,9 % de la population noire africaine [117].

Le phénotype de ce variant génotypique, appelé « variant thermolabile » selon Kang SS et al [118], est caractérisé par une diminution de l'activité enzymatique de 70 % en cas d'homozygotie, et de 35 % en cas d'hétérozygotie.

Les fréquences des allèles T et C chez les témoins sont respectivement de 34.92 % et 65.07, ces résultats concordent avec ceux des pays de la méditerranée.

Tableau 20 : Les fréquences génotypiques et alléliques dans différents pays et groupes ethniques .[113]

Pays	Fréquence Génotypique			Fréquence Allélique	
	T/T	C/T	C/C	Allèle T	Allèle C
Bretagne	12.1	47.2	40.7	35.7	64.3
London	13.7	39.1	37.2	33.2	66.8
Rotterdam	7.0	48.0	45.0	31.0	68.0
France	9.77	52.6	37.6	36.1	63.9
Nord de l'Italie	21.00	47.0	32.0	44.5	55.5
Centre de l'Italie	30.2	45.3	24.5	52.8	47.2
Sud de l'Italie	18.7	51.3	30.0	44.3	55.7
Yémen	2.2	30.4	67.4	17.4	82.6
Turquie	7.5	41.9	50.6	28.5	71.5
Saoudite Arabie	2.1	23.1	74.8	27.3	72.7
Mexique	32.2	49.6	18.2	57.0	43.0
Tunisie	5.4	24.9	69.7	17.8	82.2

PARTIE PRATIQUE

Maroc	12.3	34.7	53.0	29.6	85.0
Notre étude Algérie	6	57	23	34.92	65.07

Distribution des fréquences alléliques et génotypiques chez les patients :

Tableau : Répartition des fréquences alléliques chez les patients

Allèles	Effectifs	%
T	9	25
C	27	75
T+C	36	100

61.11% de nos patients ayant présenté un CG ont présenté le génotype C/C, 11.11 % le génotype T/T et 27.78 % le génotype T/T. Les fréquences des allèles C et T sont respectivement de 75 % et 25% chez ces patients.

Des odds ratio avec un intervalle de confiance ont été calculés à fin de déterminer un lien possible entre le polymorphisme de la MTHFR et le cancer gastrique.

Le calcul des odds ratios : **TT vs CC : OR= 1.05 p=ns**

: TT+CT vs CC: OR= 0.37 p=ns

Notre population d'étude a montré que les porteurs du génotype T/T 677 ne présentaient pas d'association significative avec le Cancer gastrique suggérant que les sujets ayant un génotype T/T ne sont pas prédisposés à développer cette maladie par rapport aux porteurs du génotype C/C.

Ces résultats n'impliquent aucune corrélation significative entre le génotype T/T et le et le risque de cancer gastrique.

La MTHFR dirige le cycle des folates vers la méthylation de l'ADN et agit indirectement sur le niveau de synthèse de l'ADN.

Cette activité varie selon les polymorphismes de l'enzyme et l'apport alimentaire en folates.

PARTIE PRATIQUE

Le polymorphisme C677T du gène *MTHFR* est celui parmi les polymorphismes des enzymes du métabolisme des folates qui a fait l'objet du plus grand nombre d'études dans le cadre du cancer de l'estomac.

De nombreuses études épidémiologiques ont mis en évidence le rôle important de la méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) dans la carcinogenèse. L'association de la mutation C677T de la MTHFR avec le risque de cancer gastrique reste obscure en raison des résultats très contradictoires dans des études indépendantes entre diverses ethnies.

Dans une méta-analyse basée sur toutes les publications disponibles sur cette association génétique réalisée par Susanna C. et al [119], Dans la plupart de ces études, le variant génotypique MTHFR 677TT (qui est associée à activité enzymatique réduite) a été associé à un risque accru de carcinome à cellules squameuses de l'œsophage, de l'estomac , à l'adénocarcinome du cardia, au cancer gastrique non cardia, au cancer gastrique (tous les sous-sites), et au cancer du pancréas .Dans ces études 13 estimations étaient seulement statistiquement significatives .

Les résultats concernant l'apport alimentaire en folate et le risque de cancer de l'estomac de 11 études cas témoins et 2 cohortes ont montré une incompatibilité avec le développement du cancer gastrique.

Dans l'ensemble, il n'y avait pas d'association significative entre la consommation de folates alimentaires et le risque de cancer de l'estomac; cependant, il y avait une hétérogénéité significative entre les études cas-témoins, mais pas dans les études de cohortes.

Bien qu'il n'y ait pas de relation globale entre la consommation de folates alimentaires et le risque de cancer de l'estomac, il est apparu que le génotype 677TT de la MTHFR est associé à un risque accru.

Les résultats de certains de ces travaux ont indiqué que les personnes ayant le génotype TT sont environ 70% à 90% plus susceptibles de développer un cancer gastrique (tous sites) et surtout l'adénocarcinome du cardia gastrique.

L'étude de **Stefania Boccia** et al. [120] a montré un risque accru pour le génotype TT de la MTHFR .

Les résultats en fonction des niveaux de folates ont montré un risque accru pour les personnes 677 TT homozygotes à faible OR (OR = 2,05, IC 95%: 1,13, 3,72) et à taux de

PARTIE PRATIQUE

folates bas par rapport à ceux 677 TT avec un OR élevé (OR = 0,95, IC 95%: 0,54, 1,67 niveaux de folate). Dans l'ensemble, ces résultats soutiennent l'hypothèse que les folates jouent un rôle dans la cancérogenèse gastrique à des taux bas et en présence d'un génotype T677T de la MTHFR.

D'autres études sur la possibilité d'un risque accru de cancer gastrique chez les sujets qui sont 677 TT homozygotes avec un niveau faible en folates sont nécessaires, cependant, si ce résultat préliminaire est confirmé, une bonne évaluation de l'utilité clinique des tests de recherche du polymorphisme C677T de la MTHFR pour identifier la prédisposition au cancer gastrique chez les populations présentant un déficit en folates, suivie par l'introduction de la supplémentation en folate spécifique, serait justifiée. Actuellement, cependant, les essais de supplémentation des populations en folates chez les sujets MTHFR C677T pour prévenir le cancer gastrique n'est pas indiqué.

La méta-analyse de Xingli Dong et al [121], a inclus 22 études et ses résultats étaient très hétérogènes. De nombreux facteurs peuvent contribuer à cette hétérogénéité, et l'ethnicité peut être l'un d'eux parce que les distributions alléliques et génotypiques du locus MTHFR C677T sont différentes dans différentes ethnies.

Dans le groupe des pays asiatiques, l'hétérogénéité disparaît, et les résultats ont montré une association significative entre le polymorphisme T677T et le cancer gastrique.

Cependant, l'hétérogénéité a été retenue dans le groupe de race blanche. Les résultats de l'analyse de sous-groupe ont montré un risque accru chez les Asiatiques, mais pas chez les Caucasiens (effet aléatoire) qui avaient un génotype T677T de la MTHFR.

L'Odds ratio chez les homozygotes (TT vs CC) est significatif chez les Asiatiques, alors que, chez les Caucasiens, il ne l'était pas.

Une autre méta-analyse réalisée en 2013 publiée en 2013 et 2014, basée sur toutes les publications disponibles sur cette association génétique a été réalisée par Wang P et al [122,123]. Dans cette étude des odds ratios avec des intervalles de confiance à 95% (IC à 95%) ont été calculés pour estimer l'effet des variants de MTHFR sur la cancérogenèse gastrique.

Au total, 25 études cas-témoins ont été incluses dans la méta-analyse. Le polymorphisme C677T MTHFR a été démontré augmenter de manière significative la susceptibilité au cancer

PARTIE PRATIQUE

gastrique (ORT vs C = 1,21, IC 95% 1,10 à 1,34; ORTT vs CC = 1,47, IC 95% 1,22 à 1,76; ORTC vs CC = 1,20, IC 1,03 à 1,40 95%; ORTT + TC vs CC = 1,27, IC 95% 1,10 à 1,47; ORTT vs CC + TC = 1,29, IC 1,15 à 1,46 95

La méta-analyse suggère que le polymorphisme de la MTHFR C677T confère un effet sur le risque de développement de cancer de l'estomac chez les Asiatiques et les Caucasiens, ce qui offre un nouvel éclairage sur la pathogenèse du cancer gastrique.

Les données publiées sur le polymorphisme C677T de la MTHFR et le risque de cancer indiquent que l'allèle T protège contre le cancer chez les sujets présentant un taux élevé de folates mais augmente le risque dans des conditions de carences en folates.

La protection peut être associée à la disponibilité abondante de purines et de pyrimidines pour la synthèse de l'ADN, conduisant à une réparation efficace de l'ADN et pratiquement l'absence d'incorporation accidentelle d'uracile dans l'ADN.

L'association d'un taux faible en folate et le génotype TT compromet la reméthylation de l'homocystéine en méthionine; ce pourrait provoquer ainsi une hypométhylation de l'ADN, qui est connue pour être impliqués dans carcinogenèse [123,124].

Plusieurs études ont suggéré que la relation entre le polymorphisme C677T et le risque de cancer peut être modifié par l'alcool ou la cigarette, qui peuvent interférer avec le métabolisme de l'acide folique [125, 126,127].

Le risque accru de cancer de l'estomac associé au génotype MTHFR 677TT suggère qu'une méthylation aberrante de l'ADN pourrait un rôle dans le développement de ces cancers. montrant que la méthylation de l'ADN génomique est significativement plus faible chez les personnes présentant le génotype TT de la MTHFR.

Les résultats obtenus dans notre étude indiquent que de nombreux facteurs peuvent contribuer à la genèse du GC, dont l'origine ethnique parce les fréquences alléliques et génotypiques du locus MTHFR C677T est différente dans différentes ethnies, de plus le nombre restreint de notre population d'étude, l'alimentation et le statut fumeur, alcoolique ou non a un grand rôle dans la pathogénie du cancer gastrique comme en témoigne de nombreuses études [125, 126,127].

CONCLUSION ET PERSPÉCTIVES

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives :

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

Plus récemment, Les données de la littérature concernant le mutant homozygote TT du gène *MTHFR* sont controversées. De nombreuses études ont montré une association significative entre ce génotype et le cancer gastrique par contre d'autres sont minoritaires à montrer un effet protecteur du génotype T/T.

Cette discordance entre les résultats observés pourrait s'expliquer par des différences ethniques et méthodologiques et que le polymorphisme de cette enzyme pourrait aussi jouer un rôle dans le pronostic du Cancer gastrique.

Nos résultats corroborent avec certaines études qui ont montré un effet protecteur du génotype T/T et sont en désaccord avec d'autres qui ont montré que les personnes qui possèdent la mutation MTHFR à l'état homozygote ont un risque significativement associé au développement du cancer gastrique.

D'autres études plus poussées tenant compte de nombreux autres facteurs sont nécessaires.

Dans la Continuité de ce travail, il serait intéressant de d'élargir l'échantillonnage de cette étude tout en tenant compte des taux de folates, de l'homocystéine, des habitudes alimentaires et des autres facteurs de risque du cancer gastrique et pourquoi pas la recherche d'autres polymorphismes de cette enzyme pour mieux évaluer l'association entre le cancer gastrique et le polymorphisme de la MTHFR C677T.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- 1-**JEMAL A, BRAY F, CENTER MM, FERLAY J, WARD et FORMAN D. (2011).** *Global Cancer Statistics* .Cancer Journal for Clinicians, **61**,69-90.
- 2-**FERLAY J, SHIN HR, BRAY F, FORMAN D, MATHERS C et PARKIN. (2012).** *Cancer Incidence and mortality worldwide*.IARC Base No.10.
- 3-**SAIF M.W, MAKRILIA N, ZALONIS A, et al. (2010).** *Gastric cancer in the elderly*. European Journal of Surgical Oncologie, **36**,709-717.
- 4-**Coleman MP, Gatta G, Verdecchia A, et al. EURO CARE-3 summary: Cancer survival in Europe at the end of the 20th century. 14(Suppl. Ann Oncol 20035):v128.**
- 5- **GJ. Tortora et S.R. Grabowski. Principes d'anatomie et de physiologie, Québec, De Boek Université, 1994,1159 p.**
- 6- **Moore et Dalley. Anatomie médicale : Aspects fondamentaux et applications cliniques, Bruxelles, De Boek Université, 2007,1154 p.**
- 7-**Sasazuki S, Sasaki S, Tsugane S. (2002) . Cigarette smoking, alcohol consumption and subsequent gastric cancer risk by subsite and histologic type. Int J Cancer,101, 560-6.**
- 8- **Serafini M, Bellocco R, Wolk A, Ekstrom AM. (2002) .Total antioxidant potential of fruit and vegetables and risk of gastric cancer. Gastroenterology,123, 985-91.**
- 9- **MUSTAPHA, Pascale. 2011 : Étude des interactions entre Helicobacter pylori et les cellules épithéliales gastriques, Thèse pour l'obtention du Grade de Docteur de l'Université de Poitiers, 111.**
- 10- **Gangloff A, Michel P. Cancer de l'estomac. EMC-Traité de Médecine Akos 2013; 8(4): 1 6[Article 4-0485].**
- 11-**DE MARTEL C, FORMAN D et PLUMMER M. (2013).** *Gastric Cancer: Epidemiology and Risk Factors*.Gastroentology Clinics of North America, **42 (2)**, 219-240.
- 12-**Bouvier A.-M.,Lepage C.,Favre J.Epidémiologie des cancer tube digestif.EMC (Elsevier Masson SAS, Paris)Gastro-entérologie,9-000-E-12,2009.**
- 13-**R. Allem. (2014). Épidémiologie des cancers digestifs dans la région de Chlef (Algérie). J. Afr. Cancer, 6,22-26.**
- 14-**M. Hamdi Cherif et coll. (2010). Registre du cancer de Sétif (Algérie) : incidence, tendance et survie, 1986–2005, J. Afr. Cancer, 2 ,245-258.**
- 15-**IARC. In : Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 1994 ; 61:177-220.**

RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- 16-Correa P, Houghton J. (2007).** *Carcinogenesis of Helicobacter pylori.* Gastroenterology, **133(2)** ,659-72.
- 17-Baillet.(2004).**Cancérologie DCEM3, faculté de médecine pierre et marie curie de l'université de parie 9
- 18-Christine Varona,ET Francis Mégraud. (2013).** *Infection à Helicobacter pylori et cancer gastrique,* REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES, **456** ,67-76.
- 19-Chaput C, Boneca IG.(2006).** *Bases moléculaires de l'interaction de Helicobacter pylori avec les cellules épithéliales gastriques.* Hepato-Gastro, **13**,379-88.
- 20- Vecchia C, Negri E, D'Avanzo B, Franceschi S. (1990).** *Electric refrigerator use and gastric cancer risk.*Br J Cancer, **62**,136–137.
- 21- Zanghieri G, Di Gregorio C, Sacchetti C, Fante R, Sassatelli R, Cannizzo G, et al. (1990).** *Familial occurrence of gastric cancer in the 2-year experience of a population-based registry.* Cancer, **66**,2047–2051.
- 22-APARICIO T, YACOUB M, KARILA-COHEN P et RENE E. (2004).** *Adénocarcinome gastrique : notions fondamentales, diagnostic et traitement .*EMC-Chirurgie, **1** ,47-66.
- 23- Caldas C, Carneiro F, Lynch HT et al.(1999).** *Familial gastric cancer overview and guidelines for management.* J Med Genet, **36**, 873-80
- 24- Huntsman DG, Carneiro F, Lewis FR et al.(2001).***Early gastric cancer in young, asymptomatic carriers of germ-line E-cadherin mutations.* N Engl J Med , **21**, 1904-9.
- 25- M. Robaszkieicz.(2012).** *Facteurs de risque et prévention du cancer gastrique.* Acta Endosc ,**42** ,232-236.
- 26- Secretan B, Straif K, Baan R, Grosse Y, El Ghissassi F, Bouvard V, et al. (2009).** *WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. A review of human carcinogens-Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish.* Lancet Oncol, **10**,1033-1034.
- 27-Kone Y.2006 :** *cancer de l'estomac : aspects épidémiologique, clinique et thérapeutiques dans le service de chirurgie « a » au centre hospital-Universitaire du point G,*Thèse de doctorat université de Bamako,101.
- 28- BOUCHE Olivier. 2005:** *Évaluation de Nouvelle Association D'Agents Anti-Néoplasiques Dans Le Traitement Des Cancers Gastriques,* thèse Doctorat De L'Université DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE ,185.
- 29- Pierre Bohanes, Arnaud D. Roth, Olivier Huber. (2009).** *Cancer gastrique, une prise en charge multidisciplinaire.* Rev Med Suisse,**5**,1569-1575.

RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- 30- **Lauren P. (1965).** *The two histological main types of gastric carcinoma.* Acta Pathol Microbiol Scand, **64**,31
- 31- **Philippe LASSER.(2002).***Tumeurs de l'estomac .LA REVUE DU PRATICIEN ,52 ,869-875 .*
- 32-**Oota K, Sobin LH.** *Histological typing of gastric and esophageal tumors, in international histological classification of tumors, WHO, Editor. WHO : Geneva, 1977.*
- 33-**Mourra N et Fléjou Jf :** *anatomie pathologique.* Encycl méd chir,Gastro-entérologie ,9-027-A-05,**2001**,9p.
- 34- **L. Mineur et al. (2010).***Cancer de l'estomac.* Cancer/Radiothérapie,**14(1)** ,84–93.
- 35- **Joaquín M. Rodríguez Santiago et al. (2011).** *TNM-7th edition 2009 (UICC/AJCC) and Japanese Classification 2010 in Gastric Cancer. Towards simplicity and standardisation in the management of gastric cancer.* CIR ESP, **89(5)** ,275–281.
- 36-**Richard HAMELIN. (2008).** *Conséquences cliniques et moléculaires de l'instabilité Des microsatellites dans les cancers humains.* Bull Cancer, **95 (1)** ,121-32.
- 37-**Siddavaram Nagin. (2012).** *Carcinoma of the stomach: A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention .*World J Gastrointest Oncol, **4(7)** ,156-169.
- 38-**Hudler P. (2012)** .*Genetic aspects of gastric cancer instability.* Scientific World Journal 2012, 761909.
- 39- **Ling ZQ, Tanaka A, Li P, Nakayama T, Fujiyama Y, Hattori T, Sugihara H. (2010).** *Microsatellite instability with promoter methylation and silencing of hMLH1 can regionally occur during progression of gastric carcinoma.* Cancer Lett, **297**, 244-251.
- 40- **Oliveira C, Seruca R, Seixas M, Sobrinho-Simões M. (1998).** *The clinicopathological features of gastric carcinomas with microsatellite instability may be mediated by mutations of different "target genes": a study of the TGFbeta RII, IGFII R,and BAX genes.* Am J Pathol, **153**,1211-1219.
- 41- **Nakatsuru S, Yanagisawa A, Ichii S, Tahara E, Kato Y, Nakamura Y, Horii A. (1992).** *Somatic mutation of the APC gene in gastric cancer: frequent mutations in very well differentiated adenocarcinoma and signet-ring cell carcinoma.* Hum Mol Genet, **1**, 559-563.
- 42-**Imai K, Yamamoto H. (2008).** *Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics.* Carcinogenesis, **29**,673-680.
- 43- **Ottini L, Falchetti M, Saieva C, De Marco M, Masala G, Zanna I, et al. (2004).** *MRE11 expression is impaired in gastric cancer with microsatellite instability.* Carcinogenesis ,**25**, 2337-2343.

RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- 44- Sugai T, Habano W, Jiao YF, Suzuki M, Takagane A, Nakamura S. (2005). *Analysis of genetic alterations associated with DNA diploidy, aneuploidy and multiploidy in gastric cancers*. *Oncology*, **68**, 548-557.
- 45-Sánchez-Pérez I, García Alonso P, Belda Iniesta C.(2009). *Clinical impact of aneuploidy on gastric cancer patients*. *Clin Transl Oncol* , **11**,493-498.
- 46- Caroline MOYRET-LALLE et al .(2008). *Génomique tumorale : l'image d'un paysage instable*. *Bull Cancer*, **95(10)**, 923-30
- 47-Suzuki K, Ohnami S, Tanabe C, Sasaki H, Yasuda J, Katai H, et al. (2003). *The genomic damage estimated by arbitrarily primed PCR DNA fingerprinting is useful for the prognosis of gastric cancer*.*Gastroenterology*, **125**,1330-1340.
- 48-Kimura Y, Noguchi T, Kawahara K, Kashima K, Daa T, Yokoyama S.(2004). *Genetic alterations in 102 primary gastric cancers by comparative genomic hybridization: gain of 20q and loss of 18q are associated with tumor progression*. *Mod Pathol*, **17**, 1328-1337.
- 49- Buffart TE, van Grieken NC, Tijssen M, Coffa J, Ylstra B, Grabsch HI, van de Velde CJ, et al. (2009). *High resolution analysis of DNA copy-number aberrations of chromosomes 8, 13, and 20 in gastric cancers*. *Virchows Arch*, **455**,213-223.
- 50-Sanz-Ortega J, Sanz-Esponera J, Caldes T, Gomez de la Concha E, Sobel ME, Merino MJ. (1996). *LOH at the APC/MCC gene (5Q21) in gastric cancer and preneoplastic lesions. Prognostic implications*. *Pathol Res Pract*,**192**,1206-1210.
- 51-Bamias AT, Bai MC, Agnantis NJ, Michael MC, Alamanos YP, Stefanaki SV, et al. (2003). *Prognostic significance of the deleted in colorectal cancer gene protein expression in high-risk resected gastric carcinoma*. *Cancer Invest*,**21** ,333-340.
- 52-Panani AD.(2008).*Cytogenetic and molecular aspects of gastric cancer: clinical implications*. *Cancer Lett*, **266**,99-115
- 53-Leggett, B and Whitehall, VL.(2010). "Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis." *Gastroenterol* ,**138(6)**,2088-2100.
- 54- 32 Ushijima T, Sasako M. (2004) .*Focus on gastric cancer*. *Cancer Cell*, **5**,121-125.
- 55- <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/Le> 23/06/2014.
- 56-Nanus DM, Kelsen DP, Mentle IR, Altorki N, Albino AP. (1990). *Infrequent point mutations of ras oncogenes in gastric cancers*.*Gastroenterology*,**98**,955–960.
- 57- Chen HC, Chen HJ, Khan MA, et al. (2011) .*Genetic mutations of p53 and k-ras in gastric carcinoma patients from Hunan, China*. *Tumour Biol*,**32** , 367-373.

RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- 58- Kihana T, Tsuda H, Hirota T, et al. (1991).** *Point mutation of c-Ki-ras oncogene in gastric adenoma and adenocarcinoma with tubular differentiation.* Jpn J Cancer Res, **82**,308–14.
- 59-Wu MS, Shun CT, Wang HP, Sheu JC, Lee WJ, Wang TH, et al. (1997).** Genetic alterations in gastric cancer: relation to histological subtypes, tumor stage, and Helicobacter pylori infection. Gastroenterology, **112**,1457–1465.
- 60-Gravalos C, Jimeno A. (2008).** *HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target.* Ann Oncol, **19**,1523-1529.
- 61-Zhang XL, Yang YS, Xu DP, Qu JH, Guo MZ, Gong Y, Huang J.(2009)** .*Comparative study on overexpression of HER2/neu and HER3 in gastric cancer.* World J Surg, **33**,2112-2118.
- 62-Yamashita K, Sakuramoto S, Watanabe M. (2011).** *Genomic and epigenetic profiles of gastric cancer: potential diagnostic and therapeutic applications.* Surg Today, **41**, 24-38.
- 63-Kuniyasu H, Yasui W, Kitadai Y, Yokozaki H, Ito H, Tahara E. (1992).** *Frequent amplification of the c-met gene in scirrhous type stomach cancer.* Biochem Biophys Res Commun,**189**, 227-232.
- 64-Tsugawa K, Yonemura Y, Hirono Y,et al. (1998)** .*Amplification of the c-met, c-erbB-2 and epidermal growth factor receptor gene in human gastric cancers: correlation to clinical features.* Oncology, **55**,475-481.
- 65-Nakajima M, Sawada H, Yamada Y, et al. (1999).** *The prognostic significance of amplification and overexpression of c-met and c-erb B-2 in human gastric carcinomas.* Cancer, **85**,1894-1902.
- 66-Huang TJ, Wang JY, Lin SR, Lian ST, Hsieh JS. (2001).** *Overexpression of the c-met protooncogene in human gastric carcinoma--correlation to clinical features.* Acta Oncol,**40**, 638-643.
- 67-Drebber U, Baldus SE, Nolden B, et al. (2008)** .*The overexpression of c-met as a prognostic indicator for gastric carcinoma compared to p53 and p21 nuclear accumulation.* Oncol Rep, **19** ,1477-1483.
- 68-Lieto E, Ferraraccio F, Orditura M, et al.(2008).** *Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and epidermal growth factor receptor (EGFR) is an independent prognostic indicator of worse outcome in gastric cancer patients.* Ann Surg Oncol, **15** ,69-79
- 69-A. Lièvre et al. (2008).** *Les antiangiogéniques en oncologie digestive.* cancers Gastroentérologie Clinique et Biologique, **32**, 504-520.

RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- 70-Kamiya K, Konno H, Tanaka T, et al. (1999).** *Antitumor effect on human gastric cancer and induction of apoptosis by vascular endothelial growth factor neutralizing antibody.* Jpn J Cancer Res, **90**, 794-800.
- 71-Matsumoto K, Konno H, Tanaka T, et al. (2000).** *Factor neutralizing antibody and mitomycin C on human gastric cancer xenograft.* Jpn J Cancer Res, **91**, 7485-2.
- 72-LACAVE R, LARSEN C, ROBERT J.** *cancérologie fondamentale, paris* John Libbey Eurotext, **2005**, 441 p.
- 73-Polkowski Rubinfeld B, Souza B, Albery I, et al. (1993).** *Association of the APC gene product with B-catenin.* Science, **262**, 1731-4.
- 74-W. Dridi et al. (2006).** *Activité dominante négative des protéines p53 mutées.* MEDECINE/SCIENCES, **22**, 301-7.
- 75-Ogasawara N, Tsukamoto T, Mizoshita T, Inada KI, Ban H, Kondo S, Takasu S, Ushijima T, Ito K, Ito Y, Ichinose M, Ogawa T, Joh T, Tatematsu M. (2009).** *RUNX3 expression correlates chief cell differentiation in human gastric cancers.* Histol Histopathol, **24**, 31-40
- 76-Lee HS, Lee HK, Kim HS, Yang HK, Kim WH. (2003).** *Tumour suppressor gene expression correlates with gastric cancer prognosis.* J Pathol, **200**, 39-46.
- 77-Nakayama H, Yasui W, Yokozaki H, Tahara E. 1993.** *Reduced expression of nm23 is associated with metastasis of human gastric carcinomas.* Jpn J Cancer Res, **84**, 184-190
- 78-Morris LE, Bloom GS, Frierson HF, Powell SM. (2005).** *Nucleotide variants within the IQGAP1 gene in diffuse-type gastric cancers.* Genes Chromosomes Cancer, **42**, 280-286
- 79-G. NARDONE. (2003).** *Review article: Molecular basis of gastric carcinogenesis.* Aliment Pharmacol Ther, **17 (2)**, 75-81.
- 80-COLLECTION recommandations et référentiels 2009.** *Chirurgie prophylactique des cancers avec prédisposition génétique Cancer gastrique diffus héréditaire. traitements, soins et innovation.* P.31-41.
- 81-Oliveira C, Seruca R, Carneiro F. (2006).** *Genetics, pathology, and clinics of familial gastric cancer.* Int J Surg Pathol, **14(1)**, 21-33.
- 82-Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. (2005).** *Global cancer statistics 2002.* CA Cancer J Clin. , **55**, 74-108
- 83-Thierry Paluku They-They et al. (2009).** *Fréquence du polymorphisme C677T du gène de la méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) dans les populations arabe et berbère du Maroc.* Antropo, **20**, 11-17.

RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- 84-Laurianne Jolissaint et al.(2011).***DOSSIER THÉMATIQUE: LE CANCER DE L'ESTOMAC Les formes héréditaires et familiales des cancers de l'estomac .Cancérodig, 3(2),101-107.*
- 85-Tran P., Leclerc D., Chan M., et al. (2002).***Multiple transcription start sites and alternative splicing in the methylenetetrahydrofolate reductase gene result in two enzyme isoforms. Mamm Genome , 13, 483-92.*
- 86-Monika GOS, Agnieszka SP (2002).** *Genetic basis of neural tube defects. II. Genes correlated with folate and methionine metabolism. J. Appl. Genet. 43(4), 511-524.*
- 87- Frosst P., Blom HJ., Milos R., et al.(1995).** *A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Nat Genet, 10,111-3*
- 89-Peyrin-Biroulet et al.(2004).** *Métabolisme des folates et cancérogenèse colorectale. Gastroenterol Clin Biol, 28,582-592.*
- 90-van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM,et al.(1998).***A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects?. Am J Hum Genet,62,1044-51*
- 91- Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R.(1998).** *A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. Mol Genet Metab,64,169-72*
- 92- DELPECH M. (1997).** *Les techniques d'extraction de l'ADN à partir d'un échantillon sanguin. Ann Bi ol Clin , 57 ,77-84.*
- 93- chabani,**Les aspects épidémiologiques des cancers au CHU HASSAN II de Fes. Thèse méd. Rabat (2005) No : 131.
- 94-Canadian Cancer Society's Steering Committee on Cancer Statistics.**Canadian Cancer *Statistics 2011.* Toronto, ON: Canadian Cancer Society; **2011.**
- 95- Sipponen P, Correa P.(2002).** *Delayed rise in incidence of gastric cancer in females results in unique sex ratio (M/F) pattern : etiologic hypothesis.Gastric Cancer,5,213-9.*
- 96- Chandanos E,Lagerren J.(2008) .***Oestrogen and the enigmatic male predominance of gastric cancer. European Journal of cancer,44 ,2397 -2403.*
- 97- BENHAMICHE A.M., FAIVRE J., MENEGOZ F., GROSCLAUDE P.(1997).** *Les cancers digestifs en France l'aube de l'an 2000. Hépatogastro, 4, 8-12.*

RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- 98- KOFFI E, KOUASSI JC. (1999).** *Le cancer gastrique : aspect épidémiologique et prise en charge en milieu tropical.* Médecine d'Afrique Noire, **46 (1)**, 52 – 55.
- 99- Benhammane hafida ,** Profil épidémiologique du cancer gastrique (à propos de 113 cas)- Service de Gastroentérologie – CHU Hassan II- Fès, Faculté de médecine et de pharmacie de Fès- Thèse N° 73/08,201
- 100- A.-M. Bouvier, C. Lepage, J.Faivre. (2009).** *Épidémiologie des cancers du tube digestif.* EMC (Elsevier Masson SAS), Gastro-entérologie, 9-000-E-12
- 101- A Verdecchia, A Mariotto, G Gatta, M.T Bustamante-Teixeira, W Ajiki.(2003).** *Comparison of stomach cancer incidence and survival in four continents.* European Journal of Cancer , **39**,1603-1609.
- 102- Jon R. Kelley, John M. Duggan,.(2003).** *Gastric cancer epidemiology and risk factors.* Journal of Clinical Epidemiology, **56**, 1-9.
- 103- Ferrand J.(2009).** *Helicobacter pylori dans un modèle de carcinogenèse gastrique impliquant les cellules souches mésenchymateuses,* Biologie Cellulaire et Physiologie, These de doctorat université de pourdeaux, **2**,223.
- 104- D. Lamarque.(2008).** *Épidémiologie de l'adénocarcinome de l'estomac.* Hépto-Gastro, **15(2)** ,101-110.
- 105-A.Togo et al. (2011).** *Cancer gastrique au CHU Gabriel-Touré : aspects épidémiologique et diagnostique .* J. Afr. Cancer , **3**,227-231.
- 106-Iodice S, Maisonneuve P, Botteri E, et al.(2010).** *ABO blood group and cancer.* European Journal of Cancer, **36**,3345-3350.
- 107-Wang Z, liu L, Ji J, Zhang J et al. (2012).** *ABO Blood Group System and Gastric Cancer :A Case-control Study and Meta-Analysis.* International Journal of Molecular Sciences, **13**,1308-13321.
- 108- Aspholm-Hurtig M, Dailide G, Lahman M, et al.(2004).** *Functional adaptation of BabA ,The H.pylori ABO blood groupe antigen binding adhesin.* Science , **305** ,519-522.
- 109-Yamaoka Y.(2008).** *Helicobacter pylori :Molecular genetics and cellular biology,* Edition Caister Academic.257.

RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- 110- Rad R, et al.(2002).*The Helicobacter pylori blood group antigen-binding adhesin facilitates Bacterial colonisation and augments a nonspecific Immune response.*The Journal of Immunology,**106** ,3033-3041
- 111- Wanebo HJ, Kennedy BJ, Chmiel J, Steele Jr G, Winchester D, Osteen R.(1993).*Cancer of the stomach. A patient care study by the American College of Surgeons.* Ann Surg,**218**,583–592.
- 112- J.B. MOUSSAVOU-KOMBILA et al.(1999).*Les cancers de l'estomac au Gabon. A propos de 79 cas observés en 10 ans .Acta Endoscopica* , **29 (4)**,499-503.
- 113- Austin H, Hooper WC, Dilley A, Drews C, RenshawM, Ellingsen D, et al. (1997).*The prevalence of two genetic traits related to venous thrombosis in whites and African-Americans.* Thromb Res,**86**,409-15.
- 114- Franco RF,AraujoAG, Guerreiro JF, Elion J, Zago MA. (1998). *Analysis of the 677 C→T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in different ethnic groups.* Thromb Haemost,**79**,119.
- 115- Mc Andrew PE, Brandt JT, Pearl DK, Prior TW.(1996). *The incidence of the gene for thermolabile methylene tetrahydrofolate reductase in African Americans.*Thromb Res,**83**,195-8.
- 116- Stevenson RE, Schwartz CE, Du YZ, Adams MJ, Jr.(1997).*Differences in methylenetetrahydrofolate reductase genotype frequencies, between Whites and Blacks.* Am J Hum Genet,**60**,229-30.
- 117- Adjalla CE, Amouzou EK, Sanni A, Abdelmouttaleb I, Chabi NW, Namour F, et al.(2003). *Low frequency of mutated methylenetetrahydrofolate reductase 677C →T and 1298A →C genetics single nucleotide polymorphisms (SNPs) in Sub-Saharan populations.* Clin Chem Lab Med,**41**,1028-32.
- 118- Kang SS, Wong PW, Zhou JM, Sora J, Lessick M, Ruggie N, et al.(1988). *Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in patients with coronary artery disease.* Metabolism,**37**,611-3.
- 119- SUSANNA C. LARSSON, EDWARD GIOVANNUCCI, and ALICJA WOLK. (2006).*Folate Intake, MTHFR Polymorphisms, and Risk of Esophageal, Gastric, and*

RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUE

Pancreatic Cancer: A Meta-analysis. *GASTROENTEROLOGY*, **131**, 1271–1283.

120-Stefania Boccia, Rayjean Hung, Gualtiero Ricciardi, et al. (2008). *Meta- and Pooled Analyses of the Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T and A1298C Polymorphisms and Gastric Cancer Risk: A Huge-GSEC Review.* *American Journal of Epidemiology*, **167(5)**, 505-516.

121 - Xingli Dong , Jianing Wu, Peng Liang, Jihong Li, Lijie Yuan, and Xinghan Liua. (2010). Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T and A1298C Polymorphisms and Gastric Cancer: A Meta-analysis *Archives of Medical Research*, **41**, 125-133

122- Wang P, Sun B, Chen G.(2013). *The polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase C677T but not A1298C contributes to gastric cancer.* *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, **35(1)**, 227-37.

123-Chen, J. et al. (1999). *MTHFR polymorphism, methyl-replete diets and the risk of colorectal carcinoma and adenoma among U.S. men and women: an example of gene environment interactions in colorectal tumorigenesis.* *J. Nutr*, **129**, 560S–564S.

124- Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H and Vollset SE. (2001). *Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism.* *Pharmacological Sciences*, **22(4)**, 195-201.

125- Hillman RS, Steinberg SE.(1982). *The effects of alcohol on folate metabolism.* *Annu Rev Med*, **33**, 345–354.

126- Bailey LB. *Folate status assessment.* *J Nutr* 1990, 120

127- Halsted CH, Villanueva JA, Devlin AM, Chandler CJ.(2002). *Metabolic interactions of alcohol and folate.* *J Nutr*, **132**, 2367S– 2372S.

128-<http://univers-connaissances.blogspot.com/2014/01/vascularisation-de-lestomac.html>.le 16/06/2014

ANNEXES

Annexe 1 :

Questionnaire

I) Données relatives au patient:

N° Dossier:..... Service :

Nom & prénom:

Age: Sexe: F M

Date et lieu de naissance :

Adresse :..... N° Tel :.....

Etat civil : Nombre d'enfants :

Fonction : Groupe sanguin :.....

Poids : taille :

II) Habitudes personnelles :

Régime alimentaire :

Viande : Non Oui Nbre / semaine :

Poisson : Non Oui Nbre / semaine :

Sucrerie : Non Oui Nbre / semaine :

Végétaux : Non Oui Nbre / semaine :

Tabac : Non Oui Nbre / jour :

Café : Non Oui Chique : Non Oui

Alcool : Non Oui

Les antécédents :

A./ Personnels :.....

Ulcère Gastrique : Non Oui

Gastrite chronique prouvée par fibroscopie : Non Oui

Année de la gastrectomie :...../___/___/___/___/___/___/

B/ Familiaux :

Antécédents familiaux de cancer de l'estomac ou l'œsophage :

- 1 : Père . 2 : Non 3 : Indéterminé 4 : Mère 5 : Fratrie
6 : Cousinage

Antécédents de cancers dans la famille :

III) Renseignements cliniques :

Diagnostic de la maladie :

Age au moment de diagnostic :

Analyse biologique : 1 .CA19.9 2.ACE 3.Autre

Examen clinique : 1.Endoscopie 2.Echo/Scanner

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

- 1 : Inférieur a 1 mois 2 : 1 a 6 mois
3 : 6 mois a 1 an 4 : Supérieur a 1 an 5 : Autres á préciser

Histologie de la biopsie :

Localisation anatomique de la tumeur :

Localisation anatomique á la fibroscopie :

- 1 : cardia 2 : fundo-cardiale 3 : fundique 4 : Fundo antrale
5 : antrale 6 : Antropylorique 7 : Pylorique 8 : Autres a préciser

Examen anatomopathologique:

Type de tumeur : 1 : Carcinoepimideoide 4 : Lymphome 3 : Sarcome
2 : Adénocarcinome 5 : Autres a préciser

Thérapie :

1. Chirurgie seule 2.Chirurgie plus chimiothérapie
3. Chirurgie plus chimiothérapie plus radiothérapie

Annexe 2

Les étapes de l'extraction de l'ADN :

1- Préparation des leucocytes

- Dans un tube Falcon de 50 ml ; mettre le sang total (7-10 ml) et compléter à 45ml avec du TE 20:5. Laisser 10 min dans la glace.
- Centrifuger 15 min à 3900 g (3900 rpm).
- Déverser le surnageant prudemment afin de garder le culot leucocytaire précipité au fond de tube.
- Rajouter le TE 20:5 au culot jusqu'à 25-30 ml, agiter pour le remettre en suspension et laisser 10 min dans la glace.
- Centrifuger dans les mêmes conditions précédentes.
- Déverser le surnageant : obtention d'un culot de leucocytes (Si on s'arrête à ce niveau, les mettre dans un tube nunc de 15 ml avec du TE10:1 et les conserver à -20°C dans un congélateur).

2- Extraction de l'ADN

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

- Récupérer la pelote d'ADN par une pipette pasteur et la rincer 2 fois dans l'éthanol à 70% dans un tube nunc (eppendorf) stérile.

3-Solubilisation de l'ADN :

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

Annexe 3

Tableau 21: Préparation du milieu réactionnel du PCR pour MTHFR

PCR	MIX	X Nombre D'échantillons(ADN)	Quantité µl
H2O	35,2µl		
Tampon 10 X sans mg cl2	5µl		
Dntp 2mM	5µl		
MgCl2 25 mM (1,5 mM)	3µl		
Oligo F (100 pmol/ µl)	0,2µl		
Oligo R (100pmol/µl)	0,2µl		
Taq polymérase	0,4µl		

Dans l'épendorft: 2µl ADN + 49 µl Mix

Le blanc : 2µl d'eau distillée + 49 µl Mix

Puis dans le **thermocycleur** et programme appliquer le programme de l'MTHFR :

Oligo nucléotides utilisés :

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

Oligo R (reverse primer) : 5'-AGG ACG GTG CGGTGA GAGTG-3'

Tableau 22: Déroulement des cycles de la PCR dans le thermocycleur

Nombre de cycles	Étape	Température (°C)	Durée
X1	Dénaturation	94 °C	5min
X 30	Dénaturation	94 °C	30s
	Hybridation	65 °C	30s
	Elongation	72 °C	40s
		72 °C	10min

Annexe 4

Tableau 23: préparation du milieu de digestion par l'enzyme Hinf I

Milieu de digestion	Quantité en µl
H2O	4
Tampon 10x	5
Hinf	1
BSA (Bovine sérum albumine)	0.2

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

Préparation d'un gel d'agarose 3% :

3 g d'agarose + 100 ml TBE 1X + 10 ml BET (Bromure d'ethidium)

Résumé :

La 5,10 méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) dirige le cycle des folates vers la méthylation de l'ADN et agit directement sur le niveau de synthèse de l'ADN. Cette activité varie selon les polymorphismes de l'enzyme, l'apport alimentaire en folates et le polymorphisme C 677T du gène de la MTHFR.

Le polymorphisme C677T du gène MTHFR est celui qui a fait l'objet du grand nombre d'étude dans le cadre du cancer.

Dans le présent travail, nous nous sommes fixé l'objectif de déterminer les fréquences alléliques et génotypiques du polymorphisme C677T de la MTHFR dans une population de patients présentant un cancer gastrique et chez des témoins, tous de l'est Algérien.

Ont participé à cette étude 18 patients présentant un GC et 63 témoins. Ce polymorphisme a été recherché par PCR/RFLP. La comparaison des fréquences alléliques chez les témoins et les patients présentant un CG a montré que 61.11% de nos patients ont présenté le génotype C/C, 11.11% le génotype TT et 27.78 % le génotype C/T. Les fréquences des allèles C et T sont respectivement de 75 % et 25 %.

Des odds ratio avec un intervalle de confiance ont été calculés à fin de déterminer un lien possible entre le polymorphisme C677T de la MTHFR et le cancer gastrique. Un odds ratio de **TT vs CC : OR= 1.05 p = ns** a été retrouvé chez nos patients présentant un GC montrant que les porteurs du Génotype T/T 677 ne présentent pas d'association significative avec le GC suggérant que les sujets ayants un génotype T/T vs C/C ne sont prédisposés à développer un GC par rapport aux sujets porteurs du génotype C/C.

Nos résultats corroborent avec les résultats de certaines études et sont en désaccord avec d'autres qui disent que le génotype T/T est associé au cancer gastrique.

Mots clés :

Cancer gastrique, MTHFR, Mutation C677T, PCR/RFLP

Summary:

The 5,10 méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) directs the cycle of the folates toward the méthylation of the DNA and acts directly on the level of the DNA synthesis. This activity varies according to the polymorphisms of the enzyme and the food contribution in folates and the polymorphism C 677T of the MTHFR gene.

Polymorphism C677T MTHFR gene is one that has been the subject of many studies in the context of cancer.

In the present work, we set the objective to determine the allelic and genotypic frequencies of the C677T polymorphism of MTHFR in a population of patients presenting a gastric cancer and among controls, all from the East Algerian.

Participated in this study 18 patients with GC and 63 witnesses. This polymorphism was investigated by PCR / RFLP. Comparison of allele frequencies among witnesses and patients presenting a CG showed that 61.11% of our patients presented the C/C genotype, 11.11% the TT genotype and 27.78% the C/T genotype. The frequencies of the alleles C and T are respectively 75% and 25%.

Odds ratios with confidence intervals were calculated in aim to determine a possible link between the C677T polymorphism of the MTHFR and gastric cancer. An odds ratio of TT vs. CC: OR = 1.05 p = ns was found in our patients with GC showing that carriers of the genotype T/T 677 show no significant association with GC suggesting that subject have genotype T/T vs C/C are not predisposed to develop a GC compared to carriers of the genotype C/C.

Our results are consistent with the results of some studies and disagree with others who say that the genotype T / T is associated with gastric cancer.

Keywords :

Gastric cancer, MTHFR, Mutation C677T, PCR / RFLP

ملخص:

5، 10 الميثيلين رباعي هيدروفولات الاختزالي (MTHFR) يوجه دورة حمض الفوليك نحو مثيلة الحمض النووي ويعمل مباشرة على مستوى بناء الحمض النووي. هذا النشاط يختلف حسب تعدد أشكال الإنزيم ,و حسب كمية حمض الفوليك الغذائية والتعدد C677T من الجين MTHFR .

التعدد C677T للجين MTHFR هو الذي كان موضوع العديد من الدراسات في سياق السرطان.

في العمل الحالي، وضعنا هدفا لتحديد الترددات الأليلية و الوراثة من التعدد C677T للجين MTHFR في مجموعة من المرضى الذين يعانون من سرطان المعدة و أخرى سليمة كشاهد حيث انه كلهم من الشرق الجزائري.

شارك في هذه الدراسة 18 مريضاً (سرطان المعدة) و 63 شهود، وكان التحقيق في هذا التعدد عن طريق PCR / RFLP وأظهرت المقارنة بين الترددات الأليلية عند الشهود و المرضى أن 61.11% من مرضانا يظهرن النمط الجيني C / C , و 11.11% يظهرن النمط الجيني T / T و 27.78% يظهرن النمط الجيني T / C , ترددات الأليلات C و T هي على التوالي 75% و 25%.

تم حساب نسب الأرجحية مع مجالات الثقة بهدف تحديد احتمال وجود صلة بين تعدد الأشكال C677T من جين MTHFR وسرطان المعدة. نسبة احتمالات TT مقابل CC ($OR= 1.05$ p = ns) حيث تم العثور عليها في مرضانا، تبين أن حاملي النمط الوراثي T / T لا يظهرن أي ارتباط مهم مع سرطان المعدة مما يدل على أن حاملي النمط الوراثي T / T مقابل C / C ليس لديهم استعداد لتطور سرطان المعدة مقارنة مع حاملي النمط الوراثي C / C .

نتائجنا تتفق مع نتائج بعض الدراسات ونختلف مع الآخرين الذين يقولون أن النمط الجيني T / T ويرتبط مع سرطان المعدة.

الكلمات المفتاحية :

سرطان المعدة، MTHFR، الطفرة C677T ، PCR / RFLP

Nom : BOUDRAA
Prénom : Hicham

Année Universitaire : 2013/2014

Le polymorphisme C677T de la méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) et risque de cancer gastrique

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en génétique moléculaire.

Résumé :

La 5,10 méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) dirige le cycle des folates vers la méthylation de l'ADN et agit directement sur le niveau de synthèse de l'ADN. Cette activité varie selon les polymorphismes de l'enzyme et l'apport alimentaire en folates et le polymorphisme C 677T du gène de la MTHFR.

Le polymorphisme C677T du gène MTHFR est celui qui a fait l'objet du grand nombre d'étude dans le cadre du cancer.

Dans le présent travail, nous nous sommes fixé l'objectif de déterminer les fréquences alléliques et génotypiques du polymorphisme C677T de la MTHFR dans une population de patients présentant un cancer gastrique et chez des témoins, tous de l'est Algérien.

Ont participé à cette étude 18 patients présentant un GC et 63 témoins. Ce polymorphisme a été recherché par PCR/RFLP. La comparaison des fréquences alléliques chez les témoins et les patients présentant un CG a montré que 61.11% de nos patients ont présenté le génotype C/C, 11.11% le génotype TT et 27.78 % le génotype C/T. Les fréquences des allèles C et T sont respectivement de 75 % et 25 %.

Des odds ratio avec un intervalle de confiance ont été calculés à fin de déterminer un lien possible entre le polymorphisme C677T de la MTHFR et le cancer gastrique. Un odds ratio de **TT vs CC : OR= 1.05 p = ns** a été retrouvé chez nos patients présentant un GC montrant que les porteurs du Génotype T/T 677 ne présentent pas d'association significative avec le GC suggérant que les sujets ayants un génotype T/T vs C/C ne sont pas prédisposés à développer un GC par rapport aux sujets porteurs du génotype C/C.

Nos résultats corroborent avec les résultats de certaines études et sont en désaccord avec d'autres qui disent que le génotype T/T est associé au cancer gastrique.

Mots clés : Cancer gastrique, MTHFR, Mutation C677T, PCR/RFLP

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Biologie et de Génétique Moléculaire faculté de médecine université 3 Constantine, CHU de Constantine.

Jury d'évaluation :

Président du jury : D.SATTA (Professeur-Université Constantine 1)

Rapporteur : K.SIFI (MCA-Faculté de médecine de Constantine 3)

Examineurs : S.ZEKRI (MAA-Faculté de médecine de Constantine 3)

D.REZGOUNE- CHELLAT (MCB-Université Constantine 1)

Date de soutenance : Le 30/06/2014