

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



Université Constantine 1  
Faculté des Science 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 :

---

Étude du polymorphisme C677T de la méthylène tétrahydrofolate  
réductase (*MTHFR*) associé au  
Cancer du sein



Présenté et soutenu par : HAMOUDA Sara

Date de soutenance : 30/06/2014

DJOUADI Kahina

Jury d'évaluation :

Président du jury : *SATTA Dalila Professeur*

*Université Constantine I*

Rapporteur : *Mme BOUDAUD Khadija MC A Université Constantine3*

Examineurs : *Mlle. SEDRATI Khadidja MA.A Université Constantine I*

Année universitaire  
2013/2014

# Remerciements :

La première personne que nous tenons à remercier est notre encadreur Madame **Boudaoud Khaadidja** maitre assistante au service d'Oncologie médicale CHUC, pour l'orientation, la confiance, la patience qui ont constitués un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port qui nous a dirigé dans l'élaboration de ce mémoire.

Nos vifs remerciements vont également à Madame le professeur **Satta Dalila** responsable de la filière de la génétique moléculaire à l'université 1, nous sommes très honorées de vous avoir comme présidente du jury. Nous avons eu le grand plaisir de travailler sous votre direction, et avons trouvé auprès de vous le conseiller et le guide qui nous a reçus en toute circonstance avec sympathie, sourire et bienveillance.

On tient à remercier Mademoiselle **BellatracheMoufida** qui nous a vraiment aidé, merci infiniment pour votre gentillesse et encouragement !

Nous tenons aussi à remercier vivement Monsieur **Rezgoune Mohamed Larbi** pour son précieux aide et sa grande gentillesse tout le long de notre parcours

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à tous les professeurs qui nous ont enseigné et qui par leurs compétences nous ont soutenu dans la poursuite de nos études. Enfin, on remercie tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

## Dédicace :

*Je dédie ce modeste travail à ceux qui m'ont donnés la vie, le symbole de tendresse, qui se sont sacrifiés pour mon bonheur et ma réussite.*

*A mamère Soraya, à mon adorable mère, à celle qui est toujours présente et continue de l'être pour faire mon bonheur.*

*Je sais bien maman, les larmes on les verse tout le temps, les moments de faiblesse on en a toujours, mais toi à chaque fois que je te regarde, j'observe la femme battante. Celle qui a du courage, celle qui est dure mais celle qui tout de même toujours douce, tendre, sensuelle. J'admire ta personne.*

*Je t'aime et je t'aimerai pour toujours !*

*Merci de remplir ma vie de joie et de bonheur*

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

*Merci tout simplement d'être... mon père*

*A l'unique sœur que j'ai au monde Djihed, la prunelle de mes yeux je t'aime plus que tous !*

*A mon petit frère Ahmed Ramzi que dieu te protège, je te souhaite tout le bonheur du monde.*

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

*Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez.*

**Kahina.D**

## Dédicace :

*Je dédie ce modeste travail à mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.*

*A mes chers frères : Sofien ; Housni ; Amine et Ramzy*

*A mes chères sœurs : Nini ; Rania et Hasna.*

*A ma belle sœur : meriem*

*A mes chers neveux : Nadir ; Houcine ; Iyed et Rassim*

*A mes chères cousines : Meriem SoumiaHadjerImen*

*etYousra*

*A mes adorables amies : Yasmine Mina et Yasmine pour leur fidélité*

*A tous mes amis avec lesquels j'ai partagé mes moments de joie et de bonheur*

*A toute ma famille*

*A tous mes collègues de la promotion : Ramla RahmaIrched et Sofia*

*Merci pour m'avoir toujours supporté dans mes décisions. Merci pour tout votre amour et votre confiance, pour m'avoir aidé à ranger mon éternel désordre et pour votre énorme support pendant la rédaction de ce mémoire !Je vous aime beaucoup.*

**SARA**

# Introduction

## Introduction

---

Le cancer du sein constitue l'affection tumorale maligne la plus fréquemment rencontrée chez la femme dans le monde où elle concerne plus d'une femme sur dix. Le cancer est associé à une croissance anormale des cellules, qui présentent une dérégulation des processus de prolifération et de mort cellulaire. Les changements observés au niveau de ces cellules le résultat d'une expression anormale de gènes. Ce dérèglement peut avoir plusieurs sources : l'hérédité, l'action d'un composé mutagène, la translocation d'une partie d'un chromosome, l'amplification ou la perte d'hétérozygotie d'une région du génome. Bien que les causes exactes du cancer soient inconnues, il est bien établi qu'il s'agit de l'action conjuguée de facteurs environnementaux et génétiques.

Ainsi, la susceptibilité d'un individu à développer un cancer du sein est le résultat d'une interaction complexe de facteurs liés au style de vie, à l'histoire reproductive et aux déterminants génétiques propres à chaque individu. Jusqu'à présent, un nombre limité de gènes ont été impliqués dans une telle susceptibilité.

Selon les dernières statistiques mondiales publiées en 2013, le cancer du sein est le premier cancer de la femme en termes d'incidence [1]. Il constitue l'une des principales causes de décès par cancer dans les pays les moins développés. Le cancer du sein est rare chez l'homme moins de 1 % de tous les cancers du sein.

En Algérie, malgré l'absence de registre national de cancers, cette affection maligne représente le premier cancer de la femme en termes d'incidence selon les trois registres d'Alger, Sétif et Oran [2]. Le cancer du sein est l'un des plus importants problèmes de santé publique tant dans les pays développés que dans les pays en développement.

Ceci s'explique par sa fréquence, mais aussi sa morbidité et sa mortalité élevées.

Le mécanisme de la carcinogenèse mammaire n'est pas encore entièrement compris. Plusieurs facteurs de risque ont été impliqués dans le développement de ce cancer. Les principaux facteurs de risque du cancer du sein sont des facteurs hormonaux liés à l'imprégnation oestrogénique pré-ménopausique (premières règles précoces, faible parité), des prédispositions génétiques et des facteurs environnementaux. Toutefois, l'interaction entre les facteurs génétiques et environnementaux joue un rôle important dans ce mécanisme.

## Introduction

---

Plusieurs études épidémiologiques ont montré que la déficience en folates peut provoquer des lésions de l'ADN conduisant à une instabilité génétique et l'augmentation du risque de plusieurs cancers, notamment le cancer du sein d'où notre intérêt pour l'enzyme de la MTHFR fortement impliquées dans son métabolisme [3,4]

### Objectifs de notre travail :

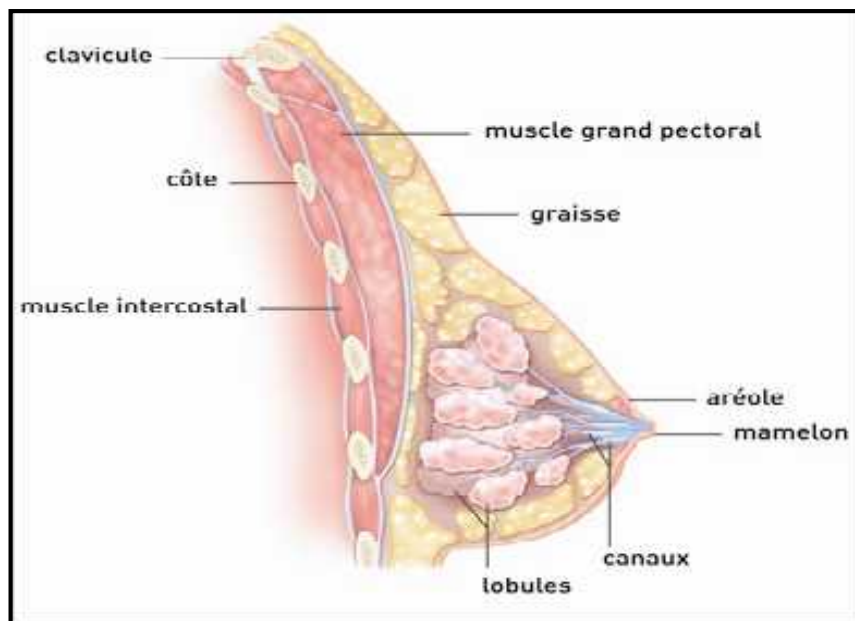
- Le but de cette étude, est d'explorer l'association possible entre le variant C677T du gène de la *MTHFR*, et le risque de cancer du sein chez les patientes présentant un cancer du sein et recrutées au service d'oncologie médicale du Centre Anticancéreux de Constantine (CAC).
- En deuxième instance nous procéderons à une analyse rétrospective par étude de dossiers de patientes pour une contribution à l'étude épidémiologique.

# Chapitre 1



## 1- Anatomie de la glande mammaire :

Le sein ou glande mammaire est constitué d'une vingtaine de lobes glandulaires entourés de tissus graisseux. Les lobes glandulaires sont responsables de la sécrétion du lait. Les canaux excréteurs de ces lobes, appelés canaux galactophores, débouchent sur le mamelon. Le mamelon est lui-même entouré d'une zone pigmentée qui est l'aréole. La peau de l'aréole est légèrement déformée par les orifices des glandes sébacées, des glandes sudoripares et des follicules pileux. Le sein repose sur le muscle pectoral. (figure 01).[5]



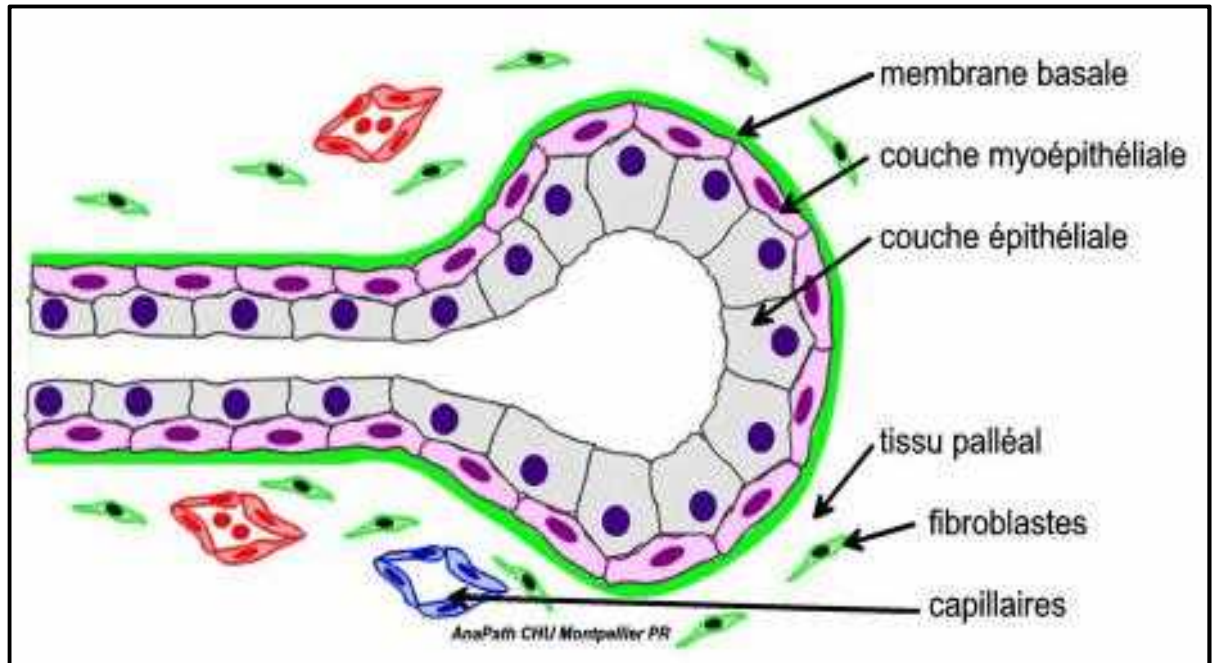
**Figure 1** : La structure du sein.[6]

## 2- Histologie :

La glande mammaire est formée :

- D'une part de tubes glandulaires ou galactophores, bordés d'une double couche cellulaire [7] ;
  - Interne : cellules épithéliales cylindriques ou cylindro-cubiques.
  - Externe : cellules myoépithéliales. Le tout est entouré de la membrane basale.
- D'autre part, de tissu conjonctif qui se différencie au moment de la puberté en deux parties :
  - Le tissu interstitiel banal qui constitue le support des lobes comportant de nombreux adipocytes.

- Le tissu conjonctif lâche intra-lobulaire ou tissu palléal La plaque aréolo-mamelonnaire est tapissée par un épiderme plus ou moins pigmenté. Le derme sous-jacent comporte des annexes cutanées, un réseau lymphatique bien développé et de nombreux faisceaux musculaires lisses(**figure 02**).



**Figure2 :** Représentation schématique de l'architecture cellulaire d'une tubulo-alvéole[8]

### 3- Physiologie :

Le développement des seins est un des signes de la puberté chez la jeune fille. Ce développement s'effectue grâce à l'action de nombreuses hormones (œstrogènes, progestérone et hormones hypophysaires).

Pendant le cycle menstruel, la glande mammaire subit des modifications et notamment augmente de volume sous l'effet des œstrogènes. Le rôle principal du sein est de fabriquer le lait. La préparation à la sécrétion lactée se fait pendant la grossesse grâce à 2 hormones, les œstrogènes et la progestérone (sécrétées par l'ovaire et le placenta) favorisant ainsi le développement des glandes mammaires. Au moment de la ménopause, suite à une diminution de la fabrication hormonale (œstrogènes), le volume des seins diminue.

# Chapitre II

## 1-Définition :

Le cancer est une prolifération rapide et anarchique de cellules anormales qui ont la capacité d'envahir et de détruire les tissus sains et de se disséminer dans l'organisme formant des métastases qui sont la principale cause de décès par cancer. Les cancers du sein se définissent comme une prolifération maligne de cellules épithéliales bordant les canaux ou les lobules du sein appelés respectivement carcinomes canauxaires ou lobulaires. S'il y a une effraction de la membrane basale, séparant l'épithélium du tissu conjonctif, ces carcinomes sont dits infiltrants. Dans le cas contraire, ils sont dits carcinome in situ ou intra-canauxaires. Ils possèdent ou non un potentiel métastatique en différents stades (classification TNM). Cette classification prend en compte la taille de la tumeur (T), l'envahissement ganglionnaire (N) et la présence de métastases à distance (M).

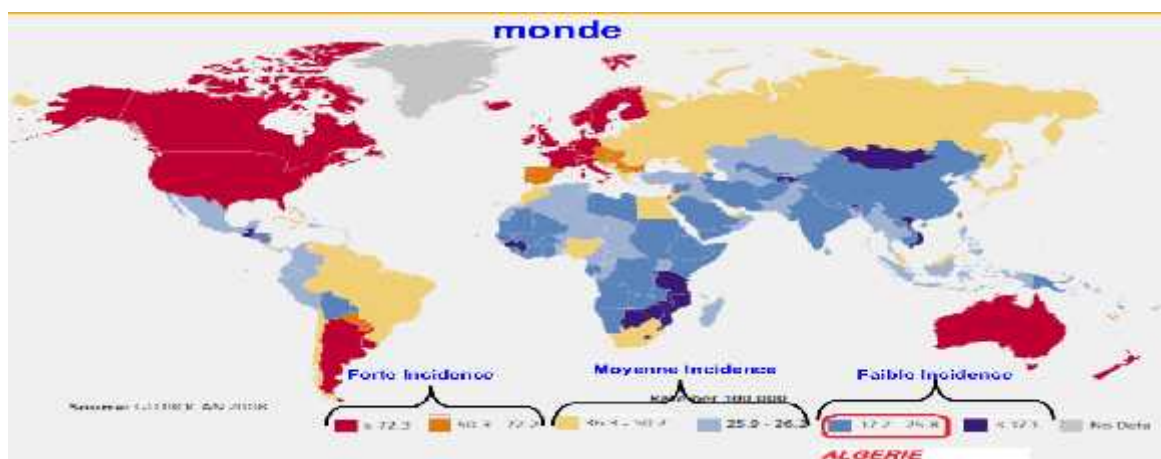
## 2- Épidémiologie:

### 2-1- Épidémiologie descriptive :

Le cancer du sein est presque exclusivement féminin, il est nettement plus fréquent dans les pays industrialisés que ceux en voie de développement ou sous-développés.

**Dans le monde :** 1,7 million de femmes ont un diagnostic de cancer du sein chaque année et en 2012, 6,3 millions de femmes vivaient avec un cancer du sein diagnostiqué au cours des cinq années précédentes. Depuis les dernières estimations (2008), l'incidence du cancer du sein a augmenté de plus de 20%, et la mortalité de 14% [1].

Le cancer du sein représente la cause la plus fréquente de décès par cancer chez les femmes (522 000 décès). Il représente un cancer sur quatre chez les femmes (OMS ; Décembre 2012)(figure 03).



**Figure 3** : Répartition du taux d'incidence standardisé du cancer du sein dans le monde [8].

**En Algérie** : Le cancer du sein représente le premier cancer de la femme (29,5% des cancers de la femme) [9], et la première cause de mortalité par cancer chez la femme.

## 2-2- Épidémiologie analytique :

Bien que les mécanismes précis de survenue du cancer du sein ne soient pas connus avec précision, un certain nombre de facteurs de risque de ce cancer ont été identifiés :

### 2.2.1. Facteurs hormonaux:

- Age précoce de la ménarche : il semble que la survenue des premières règles avant l'âge de 12 ans augmente le risque de cancer du sein. La maladie est rare chez les femmes de moins de 30 ans. Le risque augmente entre 50 et 75 ans (près des deux tiers des cancers du sein). [10]
- Ménopause tardive : Les femmes qui ont leur ménopause après 50 ans présentent un risque accru de cancer du sein, en comparaison avec celles dont les menstruations cessent précocement. Le risque de cancer du sein augmente d'environ 3 %, pour chaque année supplémentaire, à partir de l'âge présumé de la ménopause. [11,12]
- Parité : Les données épidémiologiques indiquent que le risque de cancer du sein augmente avec la nulli-parité et l'âge tardif de la première grossesse. Les femmes qui ont mené au moins une grossesse à terme avant l'âge de 30 ans présentent, en moyenne, un risque de cancer du sein diminué de 25 % par rapport aux femmes nullipares. [13]
- Allaitement : Le risque de cancer du sein diminue d'environ 4 % tous les 12 mois d'allaitement. [11]
- Contraception hormonale : La méta-analyse d'Oxford, rassemblant 54 grandes études épidémiologiques, s'accorde sur l'absence d'augmentation du risque de cancer du sein lors de la prise prolongée de la pilule.

### 2-2-2 Facteurs génétiques:

Il s'agit d'une maladie génétiquement et cliniquement hétérogène dans laquelle différents gènes de susceptibilité ainsi que des centaines de mutations ont été identifiées. Les modifications génétiques associées à cette transformation maligne sont souvent des mutations qui produisent une augmentation de la fonction du gène (oncogène) ou une perte de fonction (anti-oncogènes ou suppresseur de tumeur).

- Dans 5 à 10% des cas, le cancer du sein présente une composante héréditaire. Les formes familiales apparaissent souvent à un très jeune âge, ils sont souvent bilatéraux ou associés à d'autres tumeurs gynécologiques ou digestives, ils sont très prolifératifs, peu différenciés et de grade histo-pronostique élevé. [14]
- Les mutations germinales au niveau des gènes BReastCAnceR (*BRCA*) 1 et 2 sont responsables de la majorité des cancers du sein héréditaires. Elles sont transmises selon un mode autosomique dominant avec une forte pénétrance. [15,16]
- D'autres gènes de susceptibilité comme le gène *c-MYC*, le gène *P53* et *PTEN* sont associés à un risque de cancer du sein plus élevé que celui de la population générale.

### 2.2.3 Facteurs environnementaux, démographiques et sanitaires :

- Radiations ionisantes : chez les femmes exposées avant l'âge de 40 ans, est associé à un risque de cancer du sein multiplié par trois, pour une exposition évaluée à 1 Gray. [17]
- Lésions et maladies du sein : les maladies bénignes du sein constituent un facteur de risque de cancer du sein. Elles sont histologiquement divisées en deux groupes : les lésions prolifératives sans atypie multiplient le risque par deux et les lésions hyperplasiques avec atypie augmentent ce risque d'au moins quatre fois. [18]
- Densité mammographique : Le risque de cancer du sein est multiplié de deux à six fois chez les femmes qui ont un niveau de densité des tissus mammaires augmenté en mammographie. [19]
- Facteurs liés aux habitudes de vie et nutrition : Certaines études ont rapporté l'influence de l'obésité sur le cancer du sein. [18,20]

Par ailleurs il semble que l'activité physique diminue le risque de cancer du sein. [9]

En ce qui concerne le tabac, les données sont fortement controversées dans certaines références. [21,22], il serait un facteur de risque alors qu'il y'a un effet protecteur pour d'autres. Quant à l'alcool, il est le seul facteur de nutritionnel établi comme un facteur de cause de cancer du sein. [23] (**tableau 01**).

**Tableau 1** : Principaux facteurs de risque de cancer du sein (Liste non exhaustive).

\* niveaux de preuve. Convaincante : il y a suffisamment de preuves pour conclure qu'il existe une relation causale ; probable/possible : il y a suffisamment de preuves pour conclure qu'une relation causale est possible voire probable ; insuffisante : le niveau des preuves reste limité mais suggère l'existence d'une relation\*. [14]

Preuve	Augmentation du risque	Diminution du risque	Principaux mécanismes biologiques en cause
Convaincante	<ul style="list-style-type: none"> <li>Âge avancé</li> <li>Âge précoce des premières règles (&lt; 12 ans)</li> <li>Grande taille à l'âge adulte</li> <li>Alcool (au moins une boisson alcoolique/jour)</li> <li>Mutations génétiques (BRCA1/2)</li> <li>Radiations ionisantes (avant 40 ans)</li> <li>Densité mammographique (&gt;50%)</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>Exposition précoce et prolongée au milieu hormonal</li> <li>Nutrition durant l'enfance et l'adolescence</li> <li>Réduction de masse de la glande mammaire</li> <li>Augmentation des hormones sériques</li> <li>Augmentation de la production d'IGF</li> <li>Augmentation de l'instabilité génomique</li> <li>Dommages de l'ADN et ses constituants</li> <li>Augmentation d'IGF avant la ménopause</li> <li>Augmentation de la prolactine après la ménopause</li> </ul>
Probable/possible	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ménopause tardive (après 55 ans)</li> <li>Contraceptifs oraux</li> <li>Traitement hormonal substitutif</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Multiparité</li> <li>Allaitement (pendant au moins 25 mois)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Production prolongée des hormones ovariennes</li> <li>Augmentation de l'exposition aux œstrogènes</li> <li>Suppression de la production d'œstrodio et de progestérone</li> <li>Report des effets de la ménopause</li> <li>Accélération, différenciation des tissus mammaires</li> <li>Prolifération rapide de l'épithélium</li> <li>Réduction de la production d'œstrogènes</li> <li>Excrétion d'agents carcinogènes</li> <li>Report du rétablissement de l'ovulation</li> <li>Même environnement et style de vie, fonds génétique commun</li> </ul>
Probable/possible	<ul style="list-style-type: none"> <li>Maladies bénignes du sein</li> <li>Obésité (après la ménopause)</li> <li>Gain de poids (à partir de 18 ans)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Activité physique régulière</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Augmentation de l'hyperplasie des cellules épithéliales</li> <li>Diminution de la vitesse mitotique</li> <li>Augmentation de la concentration d'œstadiol libre sérique</li> <li>Réduction de la production d'œstrogènes</li> <li>Maintien de l'équilibre énergétique</li> </ul>
Insuffisante	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cigarette</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cigarette</li> <li>Restriction énergétique (durant l'enfance et l'adolescence)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Production de substances carcinogènes</li> <li>Diminution des œstrogènes circulants</li> <li>Recul de la date d'apparition des premières règles</li> <li>Diminution des œstrogènes et de hormone de croissance IGF-I</li> </ul>

### 3- Diagnostic:

- Le diagnostic se fait par : L'examen clinique, la mammographie, l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique), l'échographie (ultrasons), les prélèvements (aspiration et biopsie).
- Le diagnostic est confirmé par l'étude histologique  
Les différents types histopathologiques du cancer du sein sont. [24]
- **Carcinome canalaire infiltrant** : est le type le plus commun de cancer du sein qui représente 80% de toutes les tumeurs malignes. Le cancer commence dans les canaux galactophores du sein et se propage dans les tissus environnants. Il peut se propager à travers le système lymphatique ou la circulation sanguine vers d'autres parties de votre corps.
- **Carcinome lobulaire infiltrant** : C'est un carcinome invasif représentant 5 à 15 % des cancers. Les cellules sont non cohésives, de petite taille, à noyau rond à chromatine fine, et à cytoplasme abondant. Ces cellules sont isolées ou organisées en « files indiennes », dans un stroma fibreux. Les mitoses sont le plus souvent rares.
- **Carcinome tubulaire** : C'est une entité rare qui représente moins de 2% des cancers du sein .C'est un type spécial de carcinomes mammaires, qui se caractérise par un pronostic favorable. Il est composé de structures tubulaires bien différenciées, tapissées par une seule couche de cellules épithéliales.
- **Cancer médullaire** : Le carcinome médullaire représente de 1 à 7 % des cancers du sein. C'est un carcinome bien circonscrit, composé de cellules peu différenciées disposées en nappes, sans aucune structure glandulaire, un stroma peu abondant et un important infiltrat lymphoplasmocytaire.
- **Carcinome mucineux** : C'est une entité histologique rare, constituant 2 % de tous les cancers du sein. Le carcinome colloïde du sein appelé aussi mucineux ou gélatineux est défini comme un carcinome contenant de larges quantités de mucus extracellulaire dans lesquelles sont disposées des amas de cellules carcinomateuses.
- **Carcinome adénoïde kystique ou cylindrome** : C'est un carcinome très rare dont l'aspect histologique est comparable aux tumeurs de même type des



glandes salivaires. Il se distingue généralement par l'association d'un contingent de cellules basaloïdes et un contingent de cellules épithéliales.

- **Carcinome inflammatoire :** C'est une forme particulière de carcinome mammaire avec une présentation clinique secondaire à une obstruction lymphatique à partir d'un carcinome infiltrant sous-jacent. La majorité des cas présente une infiltration lymphatique dermique proéminente par la tumeur. Le carcinome inflammatoire est une forme des carcinomes mammaires avancés. L'invasion lymphatique dermique sans l'image clinique caractéristique est insuffisante pour poser le diagnostic.
- **Carcinome papillaire :** Il peut être remarquablement différencié et difficile à distinguer de l'adénome papillaire qui est souvent pluri centrique. Cependant dans ce carcinome, les arborisations conjonctives ont disparu et les cellules néoplasiques se disposent en amas pleins ; de plus le stroma est inflammatoire. Le carcinome papillaire est en général sous mamelonnaire et s'accompagne souvent d'écoulement hémorragique par le mamelon.
- **Carcinome micro papillaire :** C'est une entité histologique particulière, Variante récemment décrite, rare (2% des tumeurs du sein) et agressive, avec un risque élevé d'atteinte ganglionnaire axillaire.
- **Carcinome canalaire in situ (intra-canalaire) :** L'OMS définit le CCIS comme une lésion intra-canalaire caractérisée par une prolifération cellulaire accrue, des atypies cellulaires légères à marquées et une tendance inhérente mais non obligatoire vers un carcinome mammaire infiltrant. La classification des CCIS est actuellement principalement basée sur le grade nucléaire, la présence de nécrose, et le type architectural.
- **Carcinome lobulaire in situ :** Le CLIS est une lésion rare (1 à 3,8 % des cancers du sein), il est retrouvé dans 0,5 à 4 % des biopsies réalisées pour lésions bénignes. C'est une prolifération épithéliale développée à partir de l'épithélium des lobules. Les acini apparaissent comblés et distendus par des petites cellules rondes monotones et non cohésives.

## 4- Classification:

La classification TNM (Tumor-Node-Metastasis) de l'UICC (union internationale de lutte contre le cancer) 2003.[25](**Voir annexe 1**).

Elle s'applique uniquement aux carcinomes. En cas de tumeurs multiples dans le même sein, c'est la tumeur ayant la classification (T) la plus importante qui sera retenue. Les cancers bilatéraux simultanés seront codifiés séparément pour permettre une codification par type histologique.

## 5-Traitement :

Le traitement du cancer du sein dépend du stade de la maladie, il repose sur la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie et la thérapie ciblée. Le cancer du sein est une maladie générale qui doit bénéficier d'un traitement locorégional, et d'un traitement systémique (général).

### 5.1. Traitement loco-régional : Repose sur :

#### 5.1.1. La chirurgie:

L'exérèse chirurgicale dépend du stade et du potentiel évolutif de la tumeur. Le traitement conservateur est indiqué dans les stades précoces de la maladie, cependant le traitement radical (ablation de la totalité de la glande mammaire) est l'apanage des formes localement avancées.

#### 5.1.2. La radiothérapie :

La radiothérapie est un traitement locorégional utilisant des rayons ciblés pour détruire les cellules tumorales et ce en lésant leurs chromosomes ce qui bloque leur division et induit la mort cellulaire. Elle peut être :

- Curative après la chirurgie et la chimiothérapie pour les stades précoces
- Palliative, à visée antalgique, ou décompressive en cas des métastases osseuses ou cérébrales.

### 5.2. Traitement systémique:

#### 5. 2. 1. La chimiothérapie :

Le cancer du sein est l'un des cancers les plus chimio-sensibles. [26]

La chimiothérapie peut être utilisée avant la chirurgie (néo-adjuvante) pour réduire la taille de la tumeur et permettre ainsi un traitement chirurgical conservateur, après la chirurgie (adjuvante) et en situation métastatique.

### **5. 2. 2. Hormonothérapie :**

L'hormonothérapie est indiquée pour les tumeurs à récepteurs hormonaux positifs. Le but de l'hormonothérapie est de priver les cellules tumorales de cette influence hormonale inhibant ainsi la prolifération tumorale et/ou entraînant la mort des cellules cancéreuses.

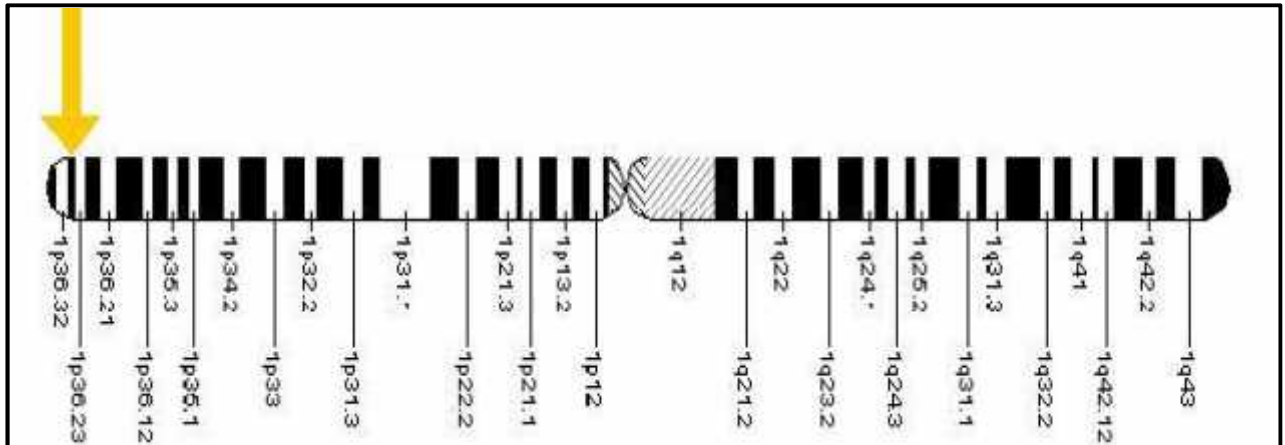
### **5. 2. 3. La thérapie ciblée :**

L'amplification du gène et donc de la surexpression du récepteur de facteur de croissance *HER2* dans certains cancers du sein a conduit au développement d'un traitement ciblé.

# Chapitre III

## 1-Le gène de la *MTHFR* :

Le gène de la *MTHFR* est localisé sur le bras court (p) du chromosome 1 en position 36.3. Plus précisément le gène est localisé dans la région des paires de bases 11.769.246 jusqu'à 11.788.568 du chromosome 1. [27](figure 6)



**Figure 4** : Localisation cytogénétique du gène de la *MTHFR*.

(US National library of medicine)

L'ADNc de ce gène fait approximativement 2.2 kilo base de longueur et est constitué de 13 exons rangés selon leur taille de 103 paires de bases jusqu'à 432 paires de bases. [28,29]. Les tailles des introns sont rangées de 250 paires de bases jusqu'à 1.5 kilo base avec une exception d'un intron de 4.2 kilo base. [29]. Le promoteur du gène ne contient pas de TATA box, mais contient des îlots CpG.

## 2-L'enzyme *MTHFR* :

La 5,10- Méthylène tétrahydrofolate réductase, *MTHFR* est une enzyme importante qui catalyse, de façon irréversible la conversion du 5,10-méthylène tétrahydrofolate en 5- méthylènetétrahydrofolate, un substrat clé donneur de folate et de carbone pour la reméthylation de l'homocystéine en méthionine .Cette enzyme est codée par le gène *MTHFR* localisé sur le bras court du chromosome 1 dans la région 1p36.3.Plus précisément, il se trouve à partir de la paire de base 11.845.786 à 11.866.159, composé de 12 exons de 102 à 432 paires de bases. Il a été cloné en 1998. [30]

### 3- Les polymorphismes du gène *MTHFR* :

Il existe deux polymorphismes courants et bien décrits du gène *MTHFR*, il s'agit du polymorphisme C677T et C1298A responsables de la synthèse d'une forme thermolabile de la protéine MTHFR. Le variant génétique C677T est associé à des maladies cardiovasculaires, à des anomalies de la coagulation et à des malformations congénitales. [29,31]

Plusieurs autres mutations rares ont été associées à une déficience sévère de l'enzyme MTHFR. [32,33]. Ces derniers polymorphismes sont moins courants que les deux premiers et leur rôle n'est pas encore bien élucidé. [30,34]

#### 3-1-Le polymorphisme C677T :

En 1988 Kang et al ont identifié un variant thermolabile du gène *MTHFR* corrélé avec des concentrations modérément élevées de l'homocystéine. [35]

En 1995 Frost et al ont démontré que ce variant est dû à la mutation C677T du gène *MTHFR*. [36].qui correspond à une conversion d'une cytosine en une thymine au niveau de l'exon 4 du gène *MTHFR*, transmise de façon autosomique récessive [28,34,33,35]. Cette mutation se traduit par une substitution d'une alanine en une valine en position 222 de la protéine *MTHFR* et se situe dans le domaine catalytique de l'enzyme au niveau du site de liaison avec le cofacteur FlavineAdénine Dinucléotide (FAD).[33]

La protéine résultante de ce polymorphisme présente une activité enzymatique réduite à 37°C et plus, pour cela la protéine est souvent appelée thermolabile. In vitro il a été démontré que la mutation C677T réduit l'activité enzymatique de la protéine MTHFR jusqu'à 70% chez les individus homozygotes (TT) et 40% chez les individus hétérozygotes (CT). [33]

#### 3-2-Le polymorphisme A1298C :

Il s'agit d'une mutation dans l'exon 7 résultant en un glutamate au lieu d'une alanine, au niveau du codon 429 (E429A) de la protéine MTHFR et se produisant dans le domaine régulateur de l'enzyme pour la S-Adénosyl-méthionine. Fonctionnellement,

la protéine résultante est caractérisée par une diminution modérée de son activité enzymatique (60%).

Contrairement aux individus avec la mutation C677T, les homozygotes et les hétérozygotes pour A1298C ne présentent pas des concentrations élevées en homocystéine, ni des concentrations basses en folates. L'association des deux variants génétiques C677T et A1298C chez les mêmes sujets présente un profil similaire à celui présent chez les homozygotes C677T avec élévation des concentrations d'homocystéine et une diminution des concentrations en folates. [28,31]

La présence simultanée des deux variants génétiques, le C677T et C1298A, est associée à des maladies cardiovasculaires, à des anomalies de la coagulation et à des malformations congénitales.[29,34]

La fréquence de l'allèle C est de (0.17 à 0.19) dans les populations asiatiques, de (0.27 à 0.36) dans l'Europe de l'ouest et 0.44 pour la population indienne. [37]

Des études menées au Canada et à la Nouvelle Zélande ont trouvés que la fréquence des homozygotes A1298C est approximativement égale à 9%. [38,39]

La prévalence de la coexistence des deux polymorphismes C677T et A1298C est de 15% au Canada et est approximativement 20% en Hollande et 17% aux USA. [28]

### **3-3-Autres polymorphismes du gène MTHFR :**

Un défaut d'activité de la protéine 5,10 MTHFR avec une activité résiduelle est dû à plusieurs autres polymorphismes, la majorité d'entre eux sont découverts chez seulement une ou deux familles, il s'agit des polymorphismes T1317C, G1793A, T1081C, A983G, G1027T, T1084C et T1711C. Certains de ces polymorphismes ont été décrits en association avec le polymorphisme C677T et ceci diminue l'activité enzymatique de la protéine MTHFR de façon remarquable, alors que d'autres n'altèrent pas la séquence des acides aminés et leur rôle n'est pas bien décrit.[31,32, 40,41]

#### **4-Le polymorphisme de la MTHFR et cancer :**

La méta-analyse de Brattstrom et al.[42]a démontré que le génotype TT, en entraînant une nette diminution de l'activité enzymatique de la MTHFR, est responsable d'une hyper-homocysteinémie, d'autant plus importante que la carence en folates éventuellement associée est marquée. Cette hyper-homocystéinémie,à l'origine d'une réduction de la quantité de SAM disponible pour les réactions de méthylation entraîne une hypométhylation globale de l'ADN.

Le risque de mutation est lié à 2 éléments clés : la disponibilité du THF (en particulier de 5,10 -méthylène-TFH), et le taux de SAM. En cas de mutation de la MTHFR et de carence nutritionnelle, ces 2 mécanismes sont altérés. La méthionine synthase est inhibée et diminue le taux de SAM qui n'a plus son rôle de rétrocontrôle négatif sur la MTHFR. Le taux de 5,10-méthylène-THF diminue aussi pour augmenter le pool inexploité de 5-méthyl-THF ce qui retentit sur la TS. Par contre, lorsque la mutation est présente mais qu'il n'y a pas de carence associée, le taux de SAM est assuré malgré la diminution de l'activité de MTHFR. Celle-ci assure alors un rétrocontrôle négatif sur l'enzyme, ce qui assure une disponibilité suffisante de 5,10-méthylène THF pour la TS



**Partie pratique**

Il s'agit d'une étude transversale de type cas témoins ; qui a duré trois mois, et a porté sur deux types de populations : une population de 10 témoins( femmes) présumées saines et une population de 10 patientes atteintes d'un cancer du sein.

## **Objectif de l'étude :**

L'objectif de notre travail est d'étudier la relation entre la MTHFR et le risque de survenue d'un cancer du sein dans l'est Algérien.

## **1-Population et méthode :**

### **1-1 Population**

. Recrutement des Sujets :

- les patientes ont été admises au service d'oncologie médicale du centre anticancéreux de Constantine
- Les témoins: population générale de référence, femmes saines (présumés en bonne santé) habitants à Constantine durant l'étude dont l'âge était compris entre 20 ans et 70 ans

Des critères d'inclusions et d'exclusion ont été établis pour les patientes et pour la population témoins.

#### **➤ Critères d'inclusion :**

- les témoins

- Femmes saines résidents à Constantine
- Age > 18 ans et moins de 70 ans.
- Sans antécédents de cancer

- les patientes

- Patientes atteintes d'un cancer du sein prouvé histologiquement.
- Age > 18 ans et moins de 70 ans.
- Bon état général (statut de performance PS < 2) selon l'échelle de L'OMS.  
(Annexe 2)

- Consentement éclairé.( annexe 3)

➤ **Critères de non inclusion :**

- les témoins

- Sujet présentant des antécédents personnels ou familiaux d'une maladie néoplasique quel que soit la localisation.

## **1-2-Méthode :**

**1-2-1-Le prélèvement sanguin :** première étape de notre étude mais ces prélèvements doivent respecter les critères suivants :

- ✓ Le prélèvement se fait sur les patientes qui répondent aux critères d'inclusions de notre étude.
- ✓ L'accord de la patiente et l'obtention de son consentement sont obligatoires.
- ✓ Le prélèvement est réalisé dans un tube EDTA (Ethylen-Diamine\_Tetra-acétiqueAcid). Il s'agit de 6 à 8 ml du sang.
- ✓ Les tubes sont conservés à une température de 4°C jusqu'au moment des manipulations.

## **1-2-2 La manipulation sur le sang total (extraction d'ADN):**

Les techniques d'extraction des acides nucléiques relativement simples, permettent d'obtenir un ADN de pureté élevée et de quantité importante.

L'ADN de chaque sujet a été extrait à partir des leucocytes du sang périphérique recueillis dans un tube EDTA, suivant la technique au NaCl. Ainsi les leucocytes sont séparés du sang total par une lyse hypotonique et traité ensuite par un détergent sodium dodécyle sulfate (SDS) et une protéinase K, et de cette manière l'ADN nucléaire est libéré dans le milieu. La pelote d'ADN est formée dans le surnageant par précipitation avec l'éthanol. L'ADN est solubilisé en phase aqueuse. (Annexe4)

### 1-2-3 Le génotypage de la MTHFR :

Pour la mise en évidence du génotype du polymorphisme C677T de la MTHFR, nous avons utilisé la technique PCR/RFLP qui consiste à la réalisation des étapes suivantes :

- Amplification par PCR (polymérase chaîne réaction).
- Une migration électrophorétique sur gel d'agarose pour le contrôle du produit PCR (s'assurer qu'il n'y a pas de contamination).
- Digestion du produit de PCR par l'enzyme de restriction HinfI.
- Une migration électro-phorétique sur gel l'agarose pour la révélation du résultat de digestion (génotypage C677T)

#### 1-2-3-1-L'amplification par PCR :

la PCR est une méthode de biologie moléculaire permettant d'amplifier des séquences d'ADN cibles en plusieurs millions d'exemplaires. cadrent. Un cycle d'amplification est composé de trois étapes : dénaturation, hybridation et élongation.

**Tableau 2: Préparation du milieu réactionnel de la PCR.**

Mix de PCR	Concentrations finales	Quantités $\mu$ l
Tampon 10X	1X	5 $\mu$ l
Mix de dNTP 2.5Mm	0.25	5 $\mu$ l
Mg Cl <sub>2</sub> 25 mM	2Mm	3 $\mu$ l
Oligo F 100 $\mu$ M	0.4 $\mu$ M	0.2 $\mu$ l
Oligo R 100 $\mu$ M	0.4 $\mu$ M	0.2 $\mu$ l
Taq polymérase 5U/ $\mu$ L	0.04 u/ $\mu$ l	0.4 $\mu$ l
Total du volume qsp	-	50 $\mu$ l

-le fournisseur du Kit de la Taq utilisé était de Biomatik.

➤ **Les oligonucléotides :**

Sens : 5' TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA 3'

Anti-sens : 5' AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG 3'

Après la préparation du mix de la PCR, nous avons pris 50 µl de ce mélange avec 2 µl d'ADN pour chaque réaction. Ensuite le déroulement des cycles de la PCR a été assuré par le thermocycleur et les conditions d'amplification étaient comme suit :

- Dénaturation initiale : 95°C pendant 5 minutes.
- **30 cycles de PCR** : chaque cycle comprend 3 étapes :
  - Dénaturation à 95°C pendant 30 secondes
  - Hybridation à 65°C pendant 30secondes
  - Elongation à 72°C pendant 40secondes.
- L'élongation finale : 72°C pendant 10 minutes.
- 

### 1-2-3-2-le contrôle des produits PCR :

Le contrôle de la PCR a été effectué par électrophorèse sur un gel d'agarose 2%

**Tableau 3 :Préparation du gel d'agarose 2%:**

Composition du gel d'agarose 2%	Quantité
Agarose	2g
TBE (1x)	100 ml
BET (bromure d'éthidium)	10 µl

### Dépôts des échantillons :

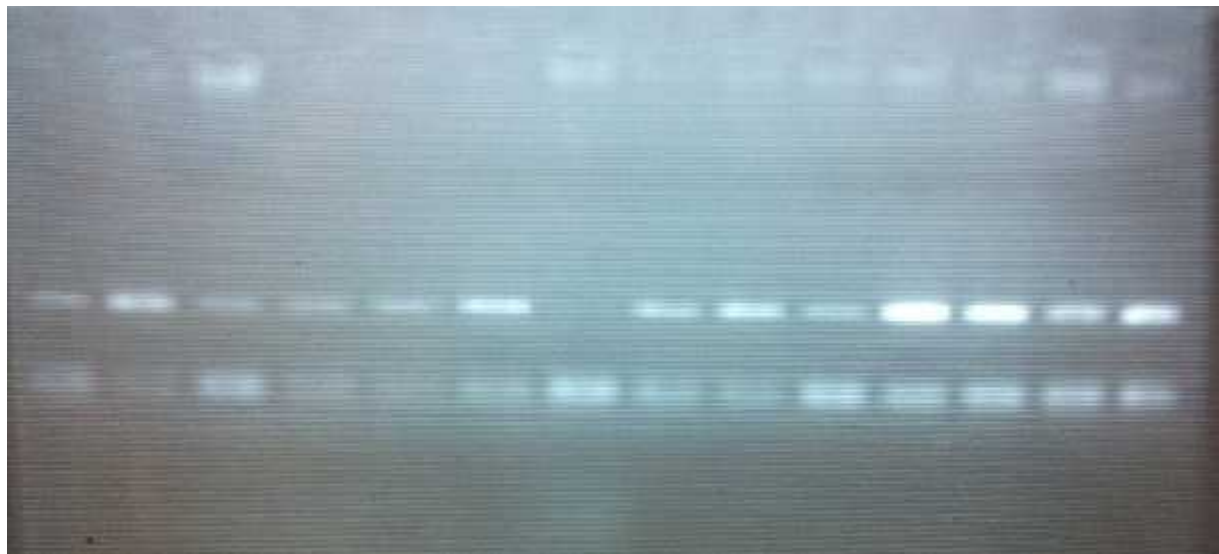
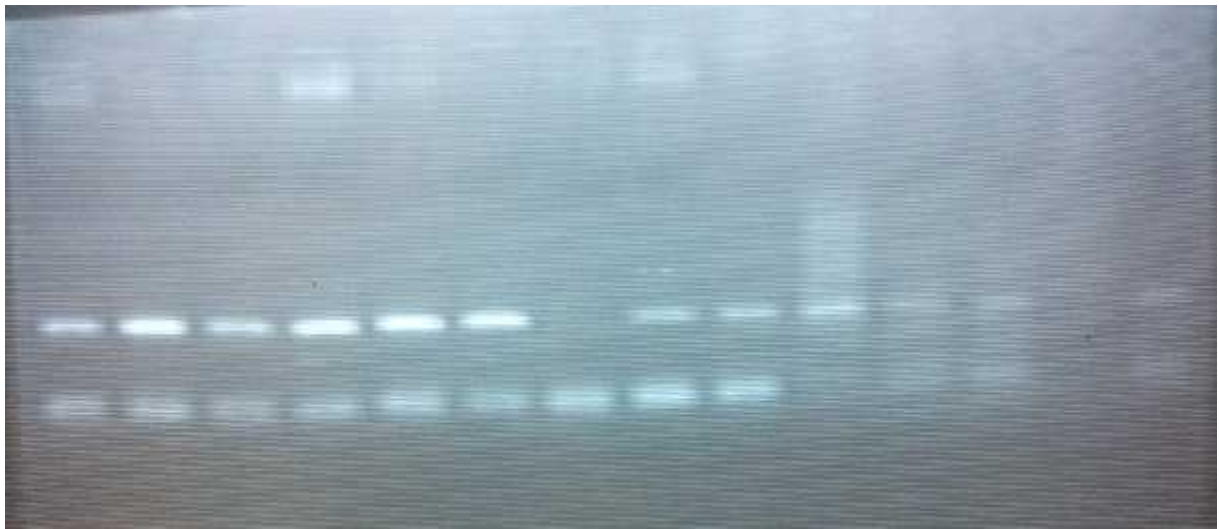
- 10 µl du produit de la PCR
- 2µl Tampon de charge .

Le gel est déposé sur une plaque d'une cuve horizontale, dans chaque puits du gel, nous déposons 10 µl de produit d'amplification en présence de 2µl de Tampon de charge qui est composé de : Bleu de Bromophénol c'est pour voir le fond de la migration, et le glycérol c'est pour alourdir l'ADN et le faire tomber au fond du puit .qui permet de densifier la totalité de l'échantillon de l'ADN au fond des puits et de suivre par la suite le fond de migration.

Parallèlement un échantillon sans ADN (blanc) est inclus dans la série à amplifier et sert de contrôle négatif. Le dépôt se fait de côté cathode (-). L'ADN étant chargé

négativement, il migre du (-) vers le (+). Le système est après soumis à une migration à un courant de 100 volts pendant une trentaine de minutes.

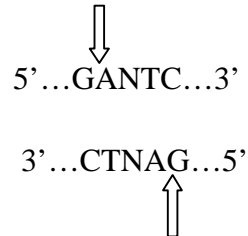
Après la migration, le gel est soumis au rayon UV, ou le BET s'intercale entre les bases nucléiques de l'ADN et émet une coloration rouge. Le gel est photographiable et permet de visualiser les fragments amplifiés sous forme de bandes fluorescentes de même taille. Dans notre PCR les bandes sont de 198 paires de base. 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.



**Photographie 01** : le contrôle de produit PCR

**1-2-3-3-La digestion des produits :**

L'enzyme HinfI reconnaît le site de restriction suivant :



Les produits de la PCR sont soumis à une digestion enzymatique par l'enzyme de restriction HinfI. Pour cela on a préparé un mélange réactionnel de digestion de l'enzyme HinfI .

Le milieu de digestion contient le tampon, l'enzyme de restriction HinfI et la BSA (Bovine Serum Albumine). Cette dernière est utilisée pour stabiliser certaines enzymes lors de la digestion de l'ADN et pour empêcher l'adhésion de l'enzyme aux tubes de réaction.

**Tableau 4 : préparation du milieu de digestion par l'enzyme HinfI**

Milieu de digestion	Concentrations finals	Quantité en $\mu\text{l}$
Tampon 10X	1X	4 $\mu\text{l}$
HinfI 10 u/ $\mu\text{l}$	0.25 u/ $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$
BSA 10 mg/ml	40 $\mu\text{l}$	0.2 $\mu\text{l}$
Produit de PCR	-	30 $\mu\text{l}$
Qsp	-	40 $\mu\text{l}$

-30  $\mu\text{l}$  du produit digéré ont été déposés par puits d'un gel de 3 %. L'électrophorèse a été effectuée sous un courant de 100volts pendant 1heure 30 minutes.

### 1-2-3-4- La révélation du résultat de la digestion :

Les fragments d'ADN digérés par l'enzyme de restriction ont été séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 3%. Les fragments d'ADN sont visualisés grâce à la présence de BET dans le gel qui est fluorescent aux UV.

Elle se fait exactement dans les mêmes conditions et la même façon que l'électrophorèse effectuée pour le contrôle de la PCR mais pendant une heure et demi à deux heures de temps.

Lors de la visualisation du gel aux UV deux bandes distinguables figurent pour chaque puits. Cela est dû à la digestion qui a induit l'apparition des petits fragments et des grands fragments.

#### -Profil RFLP obtenus :

A ce moment il est possible de définir le génotype de chaque patiente : CC, CT, TT et cela on se basant sur les informations suivantes :

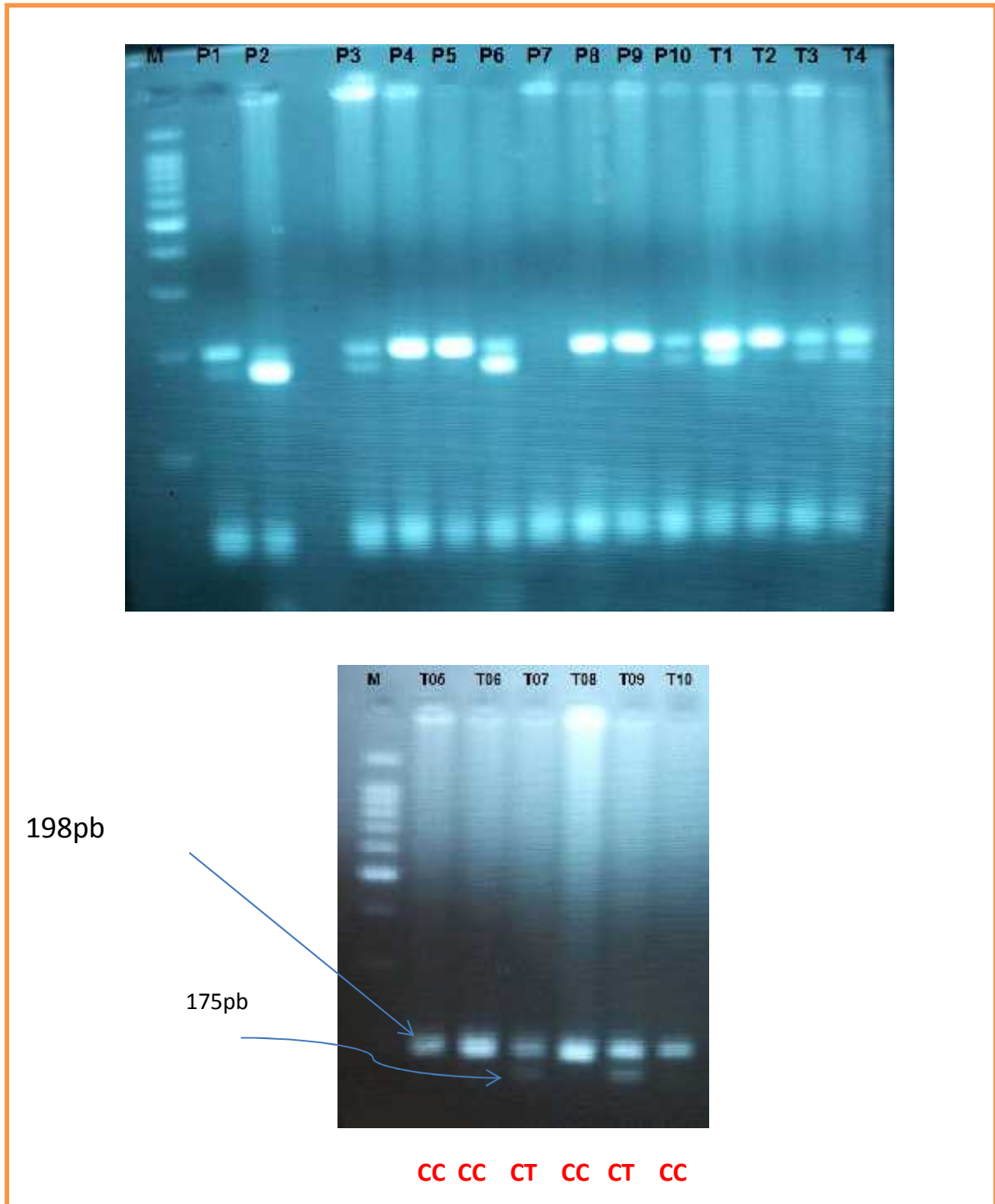
- C677C MTHFR sauvage => fragment de 198 paires de bases
- C677T MTHFR muté => fragment de 175 paires de bases (dû à un clivage par l'enzyme)

Les différents génotypes du C677T MTHFR sauvage et mutés sont comme suit :

- ❖ Homozygote sauvage (CC677) => une seule bande de 198pb
- ❖ Homozygote muté (677TT) => une seule bande de 198pb, 175pb et 23pb
- ❖ Hétérozygote (C677T) => deux bandes de 175 et 23 Pb

PS : Lors de la digestion par Hinf I, la bande de 23pb n'est pas visible sur le gel d'agarose à cause de sa petite taille et ainsi nous ne visionnons que la bande de 175pb.





**Photographie 02** : Le profil de la digestion par HinfI.

## 2-Analyse statistique :

Les résultats statistiques de tous les échantillons obtenus ainsi que tous les paramètres considérés ont été traités par le logiciel SPSS.

### 2-1-Calcul de l'odds ratio (OR) :

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.

	Cancéreux	Témoins
Exposés	a	B
Non exposés	c	D

L'intensité de l'association entre le polymorphisme est calculée comme suit :

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

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

### 2-2-Choix de la "p value ":

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

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

Notre étude a porté sur 20 sujets dont 10 patientes atteintes d'un cancer du sein prouvé histologiquement et prises en charge au niveau du service d'oncologie médicale et 10 témoins présumés sains. Ce travail a été réalisé pendant une période de 3 mois.

## 1. Paramètres épidémiologique

### 1.1. Caractéristiques épidémiologiques descriptives

#### 1.1.1- L'âge

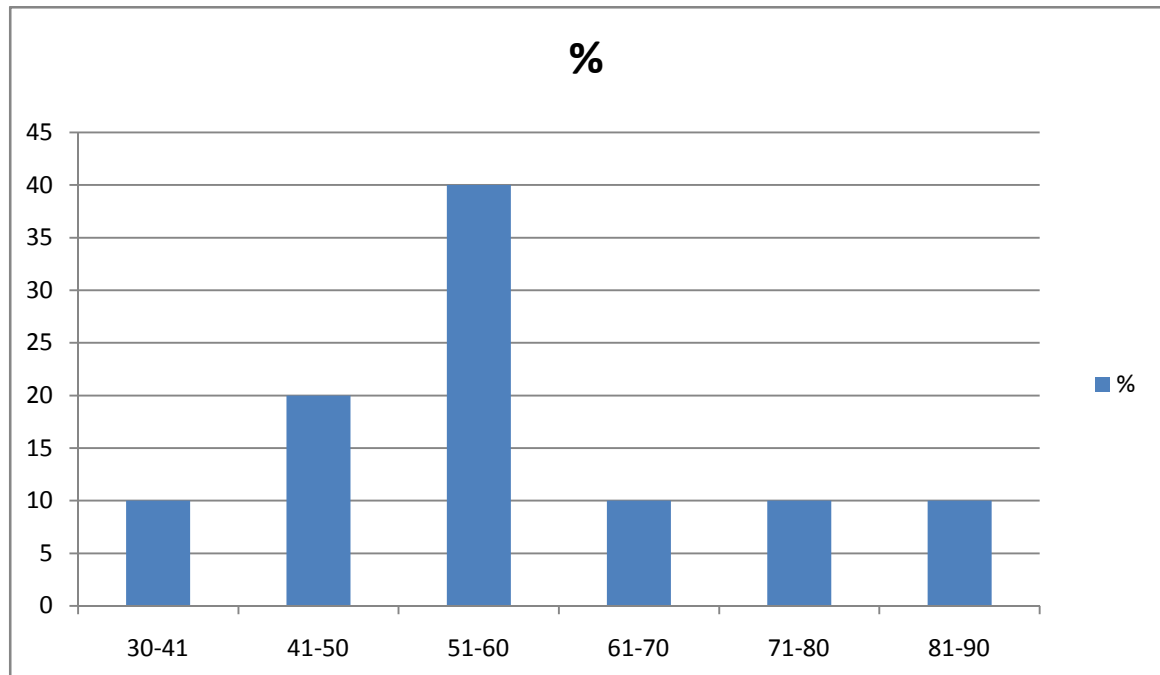
Dans notre travail la moyenne d'âge de notre population était de  $47.84 \pm 64.61$ , celle de patientes était de  $54.8 \pm 15.67$  ans avec des extrêmes de 30-90 ans (tableau 5) alors que celle des cas témoins était de  $36,1 \pm 12.16$  avec des extrêmes de 23 -59 ans. Ce qui correspond à l'âge au diagnostic dans les différents registres des différents pays occidentaux. [43,44]

Cependant cette médiane d'âge de nos patientes était supérieure à celle retrouvées dans les registres d'Alger, Sétif et Oran. [44,45]

Dans 30% des cas, le cancer s'est manifestés à un âge relativement jeune 50 ans, alors que dans les pays occidentaux seulement 10% des cancers surviennent avant 45ans.[46]

**Tableau5:** Répartition de la population(patientes, témoins) selon l'âge

<b><u>Tranches d'âge</u></b>	<b>Patientes</b>	<b>%</b>	<b>Témoins</b>	<b>%</b>
20 -30	1	10	5	50
31-40	0	0	2	20
41-50	2	20	1	10
51-60	4	40	2	<u>20</u>
61-70	1	10	0	0
71-80	1	10	0	0
81-90	1	10	0	0
Total	10	100	10	100



**Figure 5** :la répartition des patientes selon l'âge.

Dans notre étude la maladie a été plus marquée dans la tranche d'âge 51- 60 ans avec un taux de 40%.Selon le registre de Sétif (2000 /2008) ; Hamdi Cherif M et al ont montés que l'incidence la plus élevée était observée chez les femmes dans la tranche d'âge 50-54 avec un taux de 40,1% pour 105 femmes. [ref].

D'après ces résultats, le risque du cancer du sein a été plus marqué chez les femmes âgées entre 51 et 60 ans.

## 1.2. Caractéristiques épidémiologiques analytique

### 1.2.1. Age à la ménarche

L'âge moyen à la ménarche était de  $13.7 \pm 0.51$  ans pour nos patientes avec des extrêmes de 11-16 ans. Celui des témoins était de  $14,6 \pm 1.61$ ans avec des extrêmes de 12-16 ans. 5 patientes (50%)ont eu une ménarche précoce de (12 ans).La ménarchie précoce augmente le risque de survenue d'un cancer du sein [47,48]

### 1.2.2. Parité

Six des patientes (60%) ont eu plus de 3 enfants, alors que dans la population des sujets sains, 3 femmes (30%) ont eu plus de 3 enfants.

**Tableau 6 : répartition de la population (Patientes et témoins) selon la parité.**

Nombre d'enfant	Patientes	Témoins
> 3	6	3
< 3	4	7

Une multiparité 5 grossesses a été retrouvée chez 5 patientes 50% des cas.

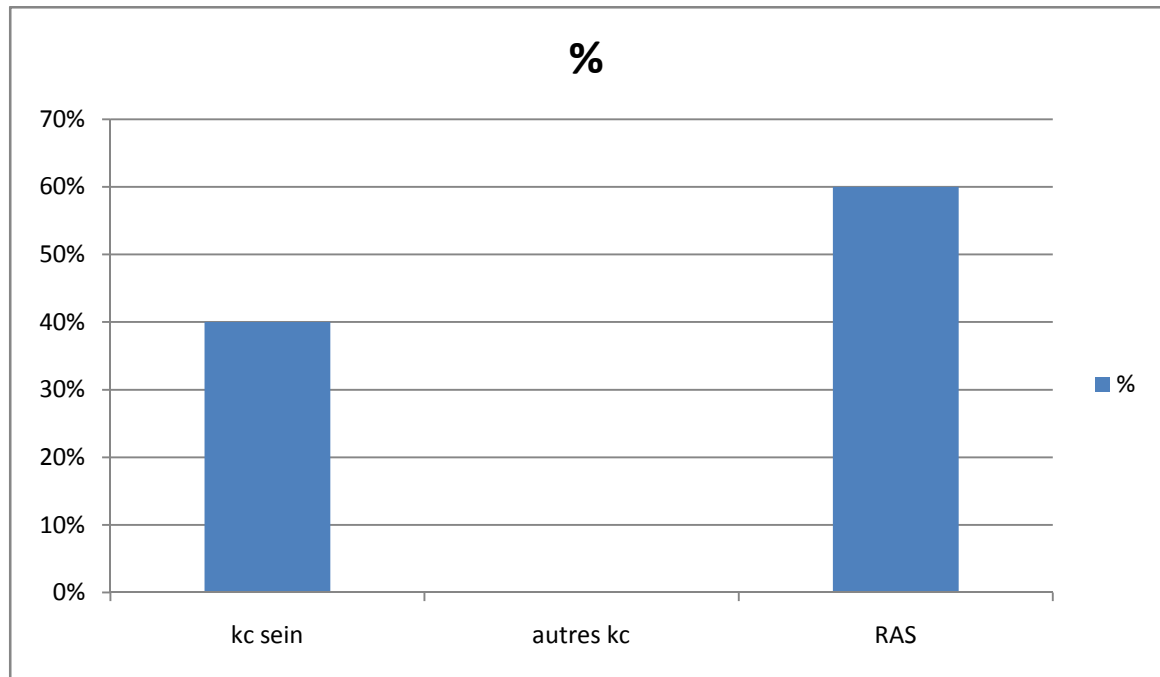
Les données épidémiologiques indiquent que le risque de cancer du sein augmente avec la multiparité et l'âge tardif de la première grossesse. Les femmes qui ont mené au moins une grossesse à terme avant l'âge de 30 ans présentent, en moyenne, un risque de cancer du sein diminué de 25 % par rapport aux femmes nullipares.[12]

### 1.2.3. Antécédents familiaux

Des antécédents familiaux de cancer du sein au premier degré ont été retrouvés dans 40% des cas (tableau 4). Ces données ne rejoignent pas ceux de la littérature où la fréquence du cancer du sein familial est de 5-10%.[49]

**Tableau 7 : Répartition des patientes selon les antécédents de cancer**

Localisation	N	%
CANCER SU SEIN	4	40
AUTRES CANCERS	0	00
RIEN A SIGNIFIER	6	60
TOTAL	10	100



**Figure 6 :** la répartition des patientes selon les antécédents de cancer

#### **I.2.4. Activité génitale**

La ménopause tardive (> 50 ans) facteur promoteur de cancer du sein, a été retrouvée chez 70% de nos patientes. [50]

### **2. Paramètres cliniques**

#### **2.1. Circonstance de découverte**

La maladie a été découverte grâce à l'autopalpation d'un nodule chez 9 patientes (90% des cas). Ces données rejoignent ceux de la littérature. [51]

#### **2.2. Le délai de traitement**

Le délai moyen de traitement entre la découverte du nodule et la consultation était  $10 \pm 7.4$  mois. Selon la littérature plus le délai entre la découverte de la maladie et le traitement est long (au delà de quatre semaines perte du bénéfice attendu). [52], plus il y a un impact négatif sur les récurrences et le décès.

### 2. 3. Le siège de la tumeur primitive

La tumeur siégeait au niveau du sein dans 50% des cas. Dans les données de la littérature la maladie prédomine au niveau du sein gauche. [53,54]

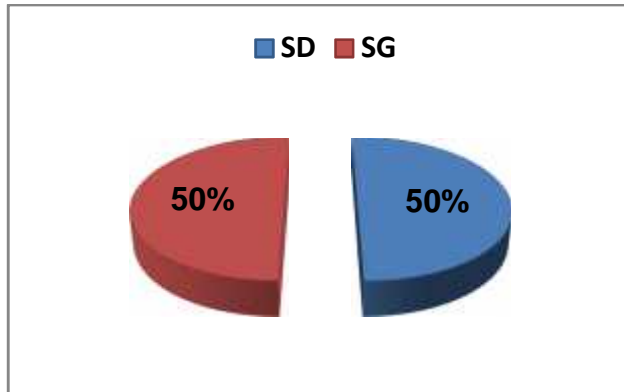


Figure 7 : Répartition selon la localisation de la tumeur

### 2.4. La classification TNM

Il existe une corrélation entre la taille tumorale et l'envahissement ganglionnaire. Dans notre travail la taille de la tumeur était de plus de 2cm chez 6 patientes (60%). On n'a pas noté une dissémination métastatique à distance chez nos patientes. [55]

## 3. Les facteurs anatomopathologiques

### 3.1. Le type histologique

Le type histologique prédominant a été représenté par le carcinome canalaire infiltrant chez 7 patientes (70% des cas). Ces résultats rejoignent ceux de la littérature.[56,57]

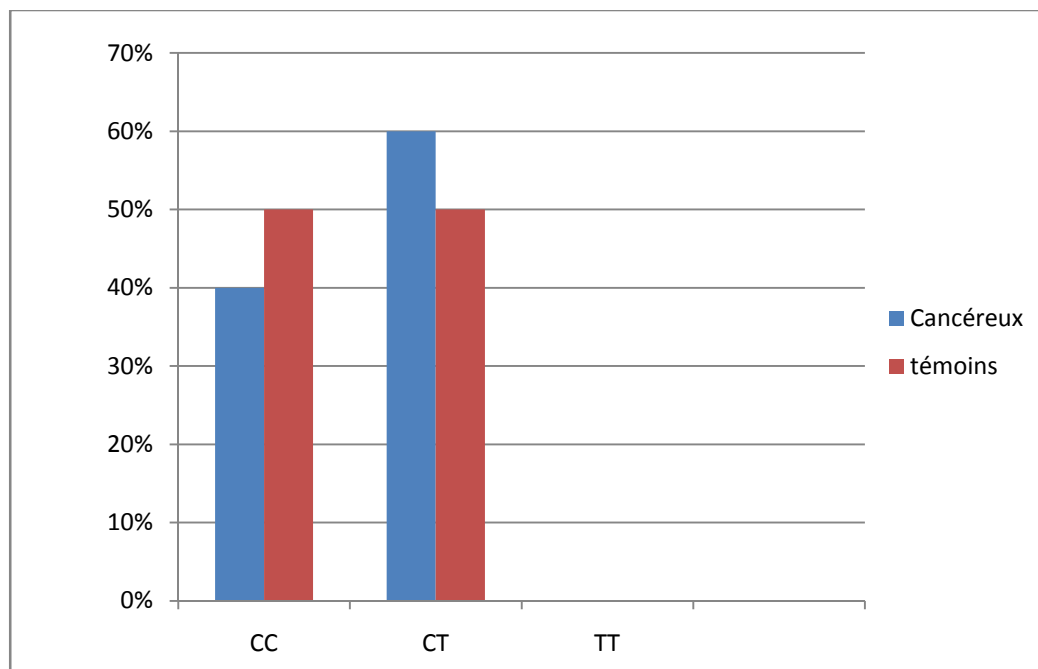
### 3.2 Le grade histologique

On note la prédominance du grade II chez 7 patientes (70%) des cas et le grade III chez 3 patientes (30%). qui sont corrélés à un risque de rechute et de décès à 10 ans plus important que pour le grade I. [58]

#### 4.Répartition des fréquences génotypiques dans les deux groupes

**Tableau 8 : fréquence génotypique du polymorphisme C677T de la MTHFR**

Témoins			Cancéreux		
	N	%		N	%
CC	5	50%	CC	4	40%
CT	5	50%	CT	06	60%
TT	00	00%	TT	00	00%
Total	10	100%	Total	17	100%



**Figure 8 :** Répartition des fréquences génotypiques dans la population des Témoins et des Cancéreux.

-le génotype Homozygote sauvage CC présente la même fréquence que le génotype Hétérozygote CT chez les témoins (50%)



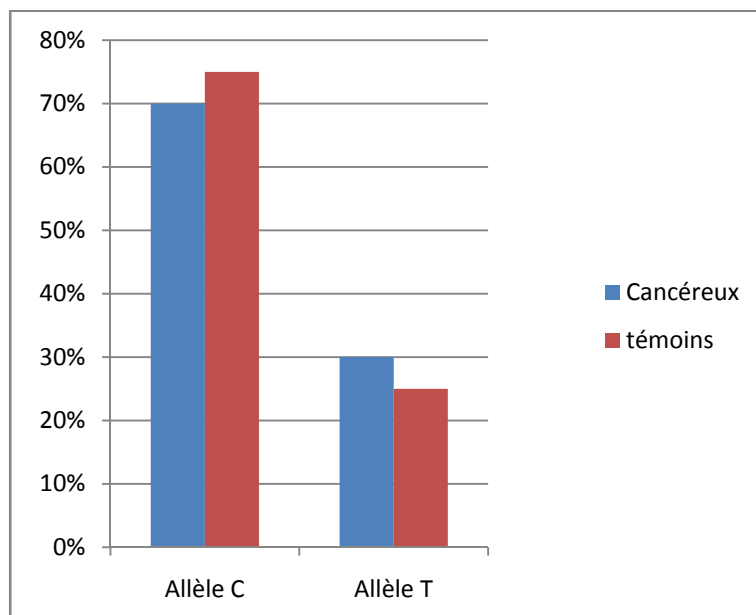
-alors que chez les cancéreux le génotype Hétérozygote CT présente une fréquence de 60% et le génotype Homozygote sauvage CC présente une proportion de 40%.

- le Génotype TT présente une fréquence de 0% dans les deux populations, c'est ce qui suggère, la non corrélation entre ce génotype et le cancer du sein.

## **5.Répartition des fréquences alléliques dans les deux groupes**

**Tableau9:**Fréquences alléliques de la MTHFR dans la population malade et témoins

	Témoins		Cancéreux	
	N	%	N	%
<b>C</b>	15	75%	14	70%
<b>T</b>	5	25%	6	30%
<b>Total</b>	20	100%	20	100%



**Figure9:**Répartition des fréquences alléliques dans la population des Témoins et des Cancéreux.

En ce qui concerne les fréquences alléliques on remarque que la fréquence de l'allèle C est plus élevée que celle de l'allèle T dans les deux populations.

L'allèle C est présent avec une proportion de 70% chez les cancéreux et il est de 75% chez les témoins, cependant l'allèle T présente une fréquence de 30% chez les cancéreux et une fréquence de 25% chez les témoins, ceci pourrait indiquer la non implication de l'allèle T dans l'apparition d'un cancer du sein. Cependant notre échantillon est de taille trop petite pour permettre de tirer des conclusions

### **6. Calcule des Odds Ratio des sujets malades ayant un allèle T par rapport aux témoins ayant un génotype CC :**

	Odds ratio	P-Value
TT vs CC	-	Ns
TT+CT vs CC	1.5	Ns

Limites de confiance à 95%

Après les calculs des Odds Ratio et du P-Value la comparaison des génotypes CC et CT a montré qu'il n'y a pas une association significative entre le génotype CT du polymorphisme C677T du gène de la MTHFR et le risque de cancer du sein.

Cela est confirmé par la comparaison de l'allèle sauvage C avec l'allèle muté T avec un OR=00 et P value=00, ceci serait en faveur de l'hypothèse de l'effet protecteur du génotype Homozygote TT.

Les résultats de notre étude suggèrent qu'il n'existe pas d'association significative entre le polymorphisme C677T du gène de la MTHFR et l'apparition du cancer du sein.

Nos résultats concordent avec ceux trouvés dans quelques recherches effectuées dans le même contexte, comme l'étude menée par Christina Justen hoven et Al, portant sur une population Allemande, leurs résultats ont indiqués qu'il n'y a pas une relation entre le polymorphisme C677T et la survenue d'un cancer du sein. [59]

En 2004 Wei-Yu Lin et al ont montrés qu'il y a une absence d'association entre le polymorphisme C677T et le risque de cancer du sein. [60]

D'un autre coté l'étude cas-témoin effectuée par Diakite B1 et al entre 2009 et 2010 sur une population marocaine a montré que le polymorphisme C677T a une relation dans l'apparition de cancer du sein. [61]

-Une autre étude menée par HongjieLiang et al portant sur la population chinoise a démontrée que la présence de la mutation de la MTHFR, chez des patients, est lié à un risque hautement significatif, de la survenue d'un cancer du sein. [62]

Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par l'influence du régime alimentaire, lorsque la mutation est présente mais qu'il n'y a pas de carence associée, le taux de SAM est assuré malgré la diminution de l'activité de MTHFR. Celle-ci assure alors un rétrocontrôle négatif sur l'enzyme, ce qui assure une disponibilité suffisante de 5,1-méthylèneTHF pour la TS.

**CONCLUSION**

## CONCLUSION

Le cancer du sein est la tumeur maligne la plus fréquente de la femme dans le monde, le cancer est considéré, depuis l'identification des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur, comme une maladie des gènes. Il apparaît donc, important d'identifier au travers des altérations moléculaires constitutionnelles et acquises des gènes impliqués, des marqueurs diagnostiques et pronostiques permettant de mieux comprendre cette pathologie pour une meilleure prise en charge thérapeutique.

Dans ce contexte nous nous sommes intéressées au polymorphisme C677T de la MTHFR dans la prédisposition génétique aux cancers du sein. L'identification des polymorphismes du gène de la MTHFR, de la méthionine synthase, et d'autres enzymes impliqués dans le cycle des folates pourrait apporter des éléments de compréhension de la carcinogénèse.

D'après notre étude, une relation entre le polymorphisme du gène de la MTHFR et le cancer du sein semble hypothétique. Seule une étude de cohorte avec un suivi prospectif permettrait d'établir une relation entre génotype et cancer..

### Perspectives

Il serait intéressant de continuer ce travail préliminaire par une analyse moléculaire sur une population plus grande et d'intégrer l'étude d'autre gène de susceptibilité, afin décrypter les mécanismes de la cancérogenèse, d'établir les corrélations génotype-phénotype, et également d'identifier les sujets à haut risque dans les familles.

## **ANNEXE 1 :**

### **CLASSIFICATION TNM DU CANCER DU SEIN, 6E EDITION, 2002, ET STADE UICC**

Le système TNM distingue le stade clinique pré-thérapeutique noté « cTNM » et le stade anatomopathologique postchirurgical noté « pTNM ».

#### **Tumeur Primaire T**

**Tx**: la tumeur primitive ne peut pas être évaluée

**T0** : la tumeur primitive n'est pas palpable

Tis : carcinome *in situ*

Tis [DCIS) : carcinome canalaire *in situ*

Tis [CLIS) : carcinome lobulaire *in situ*

Tis [Paget) : maladie de Paget du mamelon sans tumeur sous-jacente

NB : la maladie de Paget associée à une tumeur est classée en fonction de la taille de la tumeur

**T1** : tumeur ≤ 2 cm dans sa plus grande dimension

**T1mic** : micro-invasion ≤ 1 mm dans sa plus grande dimension

T1a : 1 mm < tumeur ≤ 5 mm dans sa plus grande dimension

T1b : 5 mm < tumeur ≤ 1 cm dans sa plus grande dimension

T1c : 1 cm < tumeur ≤ 2 cm dans sa plus grande dimension

**T2** : 2 cm < tumeur ≤ 5 cm dans sa plus grande dimension

**T3** : tumeur > 5 cm dans sa plus grande dimension

**T4** : tumeur, quelle que soit sa taille, avec une extension directe soit à la paroi thoracique [a), soit à la peau [b)

T4a : extension à la paroi thoracique en excluant le muscle pectoral

T4b : oedème [y compris peau d'orange) ou ulcération de la peau du sein, ou nodules de perméation situés sur la peau du même sein

T4c : T4a + T4b

T4d : cancer inflammatoire

#### **Ganglions lymphatiques régionaux pN**

**Nx**: l'envahissement des ganglions lymphatiques régionaux ne peut pas être évalué [par exemple déjà enlevés chirurgicalement ou non disponibles pour l'analyse anatomopathologique du fait de l'absence d'évidement)

**N0** : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique et absence d'examen complémentaire à la recherche de cellules tumorales isolées

**N0(i-)** : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique, étude immunohistochimique négative [IHC) 0(i+) : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique, IHC positive, avec des amas cellulaires  $\leq 0,2$ mm [considéré comme sans métastase ganglionnaire)

**N0(mol-)** : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique, biologie moléculaire négative [RTPCR: *reverse transcriptase polymerase chain reaction*)

**N0(mol+)** : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique, biologie moléculaire positive [RTPCR)

**N1mi** : micrométastases  $> 0,2$  mm et  $\leq 2$  mm

**N1** : envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires ou/et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique

**N1a** : envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires

**N1b** : envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique

**N1c** : envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique [pN1a + pN1b)

**N2** : envahissement de 4 à 9 ganglions axillaires ou envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects, en l'absence d'envahissement ganglionnaire axillaire

**N2a** : envahissement de 4 à 9 ganglions axillaires avec au moins un amas cellulaire  $>2$  mm

**N2b** : envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects, en l'absence d'envahissement ganglionnaire axillaire

**N3** : envahissement d'au moins 10 ganglions axillaires ou envahissement des ganglions sous-claviculaires

[niveau III axillaire) ou envahissement des ganglions mammaires internes

homolatéraux suspects avec envahissement ganglionnaire axillaire ou envahissement de plus de 3 ganglions axillaires et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique ou envahissement des ganglions sus-claviculaires homolatéraux

**N3a** : envahissement d'au moins 10 ganglions axillaires [avec au moins un amas cellulaire  $>2$  mm) ou envahissement des ganglions sous-claviculaires

**N3b** : envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects avec

envahissement ganglionnaire axillaire ou envahissement de plus de 3 ganglions axillaires et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique

N3c : envahissement des ganglions sus-claviculaires homolatéraux

### **Métastases à distance [M]**

Mx : renseignements insuffisants pour classer les métastases à distance

M0 : absence de métastases à distance

M1 : présence de métastase[s] à distance

## **ANNEXE 2:**

COTATION OMS = INDEX D'EVALUATION DE L'ETAT GENERAL

0 : Capable d'une activité identique à celle précédant la maladie, sans restriction

1 : Activité physique diminuée, mais malade ambulatoire et capable de travailler

2 : Ambulatoire, capable de prendre soin de soi, incapable de travailler, alité moins de 50% des heures de veille

3 : Capable seulement de quelques activités, alité ou au fauteuil de 50 à 99 % des heures de veille

4 : Incapable de prendre soin de lui-même, alité ou en chaise en permanence.

## **ANNEXE 3**

Questionnaire

N° dossier :

Date de la 1ère consultation :

Nom :

Prénom :

Sexe :



Age :

Poids et taille :

Situation familiale :

Lieu de naissance :

Adresse :

N° de téléphone :

Activité génitale :

Nbr d'enfants :

Contraception orale :

Antécédent personnel :

Antécédents familiaux :

Evolution de la maladie :

CDD de la maladie :

Examen de la tumeur :

Siège de la tumeur :

La taille :

Type histologique :

Classification TNM :

Date de la dernière consultation :

Date du prélèvement :

## **ANNEXE 4**

### **Technique d'extraction d'ADN :**

#### 1- Préparation des leucocytes :

- Dans un tube falcon de 50 ml, mettre le sang et compléter à 25 ml avec du TE 20 :5laisser 10 mn dans la glace
- Centrifuger 10 mn à 3900 rpm
- Aspirer le surnageant avec la trompe à vide
- Ajouter quelques ml de TE 20 :5 au culot et le remettre en suspension avec une pastette stérile
- Compléter à 25 ml avec du TE 20 :5 et laisser 10 mn dans la glace
- Centrifuger dans les mêmes conditions que la première fois
- Aspirer le surnageant avec la trompe à vide : obtention d'un culot leucocytaire

#### 2- Extraction de l'ADN :

- Transvaser le culot des leucocytes dans un tube falcon de 15 ml
- Ajouter 3 ml de tompon de lyse en dilacérant le culot avec une pastette stérile
- Ajouter 200 µl de SDS à 10%
- Ajouter 100µl de protéinase K à 10 mg/ml
- Agiter le tube sur une roue à 27 °C une nuit
- Le lendemain, refroidir dans la glace
- Ajouter 1 ml de NaCl 4M et agiter vigoureusement à la main
- remettre 5 mn dans la glace (précipitation des protéines)
- Centrifuger 15 mn à 2500 rpm
- Transvaser le surnageant dans un tube falcon de 50ml, ajouter deux fois son volume d'éthanol absolu préalablement refroidi (environ 8 ml) et agiter en retournant le tube plusieurs fois : la pelote d'ADN se forme
- Laisser éventuellement 30 mn à -20°C si la pelote ne se forme pas
- Récupérer la pelote d'ADN avec une pipette pasteur et la rincer deux fois dans l'éthanol à 70 %
- Mettre la pelote dans un tube nunc

#### 3- Solubilisation :

- Ajouter entre 300 et 1000 µl de TE 10 :1 selon la grosseur de la pelote et la concentration souhaitée

-Laisser une nuit sur agitateur rotateur à 37°C, puis à température ambiante jusqu'à dissolution complète (1 à 2 jour).

## **ANNEXE 5**

### **Réactif :**

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

Tris : 2.422 g/l

EDTA : 1.86 g/l

Ajuster le pH avec HCL 1 N

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

Tris : 0.606 g

EDTA : 0.1869 g pour 500 ml

Ajuster le pH avec de l'HCL 1 N

- Tompon de lyse :NaCl 400mM

EDTA 2mM

Tris 10mM

pH 8.2

- SDS 10%

- Protéinase K : Protéinase K : 10 mg/ml H<sub>2</sub>O

Conservation aliquote de 1 ml à -20°C, tube entamés à +4°C

- NaCl 4M

- Ethanol absolu

- Ethanol 70%

- Bleu de Bromophénol (BBP) : BBP 20mg

Tris 0.5M : 2ml

Glycerol : 5ml

PH 7.5

Qsp 10 ml H<sub>2</sub>O

TBE 10X: Tris 108g

Acide borique 55g

Ajuster le PH à 8.3 avec l'acide acétique glacial

EDTA 9.3g

QSP 1L H<sub>2</sub>O

### **Dilutions des solutions mères utilisées pour la PCR :**

\*dNTP solution mère (25 mM)

dNTP solution fille 2.5 mM : 10 ml de dNTP solution mère + 90 ml H<sub>2</sub>O

(dilution au 1/10 ième)

\*MgCl<sub>2</sub> solution mère 50mM

MgCl<sub>2</sub> solution fille 25mM : 1 volume MgCl<sub>2</sub> + 1 volume H<sub>2</sub>O (dilution 1/2).

## **ANNEXE6:**

### **Les mutations du gène MTHFR**

#### **· Le polymorphisme T1317C :**

Le polymorphisme identifié au niveau de la paire de base 1317 est une substitution d'une thymine en cytosine, cette substitution n'altère pas la séquence des acides aminés.

Dans un groupe de 38 femmes canadiennes, la fréquence du variant allélique T1317C est de 0.05 et elle est de 0.39 chez 9 femmes d'origine afro-américain (110).

#### **· Le polymorphisme G1793A :**

Récemment Rody et al ont démontrés une substitution d'une guanine en adénine au niveau de la paire de base 1793, résultant en une substitution d'une arginine en glutamine sur le codon 594.

Il a été trouvé que la fréquence de l'allèle A est de 0.01 chez des Juifs Ashkenazi (n=155), de 0.03 chez les afro-américain (n=97), 0.07 chez les caucasiens (n=159) et 0.06 chez les hispaniques (n=95) (110).

#### **· Le polymorphisme T1081C :**

Chez une famille de parents consanguin avec 4 enfants présentant un hyperhomocystéinémie, une hypométhionémie et spécifiquement une protéine MTHFR non détectable au niveau des globules rouges, Tonetti et al. (131) ont détecté la mutation T1081C au niveau de l'exon 6.

Il s'agit d'une conversion d'arginine en une cystéine.

#### **· Le polymorphisme A983G :**

Chez une femme d'origine grecque, Kluijmans et al. (114) ont identifiés une mutation homozygote au niveau du nucléotide 983 du gène MTHFR avec une sérine au lieu d'une asparagine en position 324 (N324S) de la protéine MTHFR. Sibani et al. (117) ont montré que cette mutation diminue l'activité enzymatique de la protéine MTHFR de 36% et que l'association de cette mutation avec le polymorphisme C677T diminue l'activité de la protéine de 50%.

· **Le polymorphisme G1027T :**

Chez un enfant d'origine turque, Kluijmans et al. (114) ont identifiés une transition homozygote de G en T en position 1027 sur le gène MTHFR. Cette mutation convertit un tryptophane non conservé en une glycine (W339G). Ce patient présentait aussi la mutation homozygote C677T (111).

· **Le polymorphisme T1084C :**

Une transition homozygote en position 1084 de C en T a été identifiée au niveau du nucléotide 1084 sur le cDNA du gène MTHFR. Cette mutation résulte en CGA (Arg) convertis en TGA (codon stop) (114).

· **Le polymorphisme T1711C :**

Une mutation homozygote est détectée en position 1711 du gène MTHFR résultant en un codon stop (TGA) au lieu d'arginine (CGA) chez une patiente de parents consanguins et d'origine turque (114).

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : La structure du sein.....	2
<b>Figure2</b> : Représentation schématique de l'architecture cellulaire d'une tubulo-alvéole .....	3
<b>Figure 3</b> : répartition du taux d'incidence standardisé du cancer du sein dans le monde.....	5
<b>Figure 4</b> : Localisation des gènes BRCA1et BRCA2.....	13
<b>Figure 5</b> : Localisation du gène P53 .....	14
<b>Figure 6</b> : localisation cytogénétique du gène de la MTHFR .....	16
<b>Figure 7</b> :la répartition des patientes selon l'âge.....	29
<b>Figure 8</b> : la répartition des patientes selon les antécédents de cancer.....	31
<b>Figure 9</b> : Répartition selon la localisation de la tumeur.....	32
<b>Figure10</b> :Répartition des fréquences génotypiques dans la population des Témoins et des Cancéreux.....	33
<b>Figure11</b> :Répartition des fréquences alléliques dans la population des Témoins et des Cancéreux.....	34

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Principaux facteurs de risque de cancer du sein .....	7
<b>Tableau2</b> : Répartition de la population(patientes, témoins) selon l'âge.....	22
<b>Tableau 3</b> : répartition de la population (Patientes et témoins) selon la parité.....	30
<b>Tableau 4</b> : répartition de la population (Patientes et témoins) selon la parité.....	30
<b>Tableau 5</b> : fréquence génotypique du polymorphisme C677T de la MTHFR.....	33
<b>Tableau 6</b> :Fréquences alléliques de la MTHFR dans la population malade et témoins.....	34

# Sommaire



**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Liste des photographies**

**Introduction** ..... 1

**Partie Bibliographique**

**Chapitre I : Le sein**

1- Anatomie de la glande mammaire.....3  
2- Histologie .....3  
3- Physiologie .....4

**Chapitre II : Cancer du sein**

1- Définition.....5  
2- Épidémiologie .....5  
    2-1 Épidémiologie descriptive.....5  
    2-2 Épidémiologie analytique.....6  
        2-2-1 Facteurs hormonaux.....6  
        2-2-2 Facteurs génétiques.....6  
        2-2-3 Facteurs environnementaux, démographiques et sanitaires.....7  
3- Diagnostic .....9  
4- Classification .....11  
5- Traitement .....11  
    5-1- Traitement locorégional .....11  
        5-1-1- La chirurgie.....11  
        5-1-2- La radiothérapie.....11  
    5-2- Traitement systémique.....11

5-2-1- La chimiothérapie.....	11
5-2-2- Hormonothérapie .....	12
5-2-3- La thérapie ciblée.....	12

### **Chapitre III : Biologie moléculaire du gène MTHFR**

1-Le gène de la <i>MTHFR</i> .....	13
2-L'enzyme MTHFR .....	13
3-Les polymorphismes du gène <i>MTHFR</i> .....	14
3-1-Le polymorphisme C677T.....	14
3-2-Le polymorphisme A1298C.....	14
3-3-Autres polymorphismes du gène MTHFR.....	15
4-Polymorphisme de la MTHFR et cancer.....	16

#### **Partie pratique :**

Objectif de l'étude .....	17
1-Population et méthode.....	17
1-1-population .....	17
1-2-méthode.....	18
1-2-1- prélèvement sanguin.....	18
1-2-2-manipulations sur le sang total.....	18
1-2-3-génotype de la MTHFR.....	19
1-2-3-1-L'amplification par PCR .....	19
1-2-3-2-le contrôle des produits PCR.....	20
1-2-3-3-La digestion des produits .....	22

1-2-3-4-La révélation du résultat de la digestion.....	23
2-Analyse statistique.....	25
2-1 calcule de l'odds ratio.....	25
2-2 choix de la P- value .....	25

## **Résultats et discussion :**

1- Paramètres épidémiologique.....	26
1-1- Caractéristiques épidémiologiques descriptives .....	26
1-1-1-L'âge.....	26
1-2- Caractéristiques épidémiologiques analytique.....	27
I-2-1- Age à la ménarche.....	27
I-2-2- Parité.....	27
1-2-3- Antécédents familiaux.....	28
1-2-4- Activité génitale.....	29
2-Paramètres cliniques.....	29
2-1- Circonstance de découverte.....	29
2-2-Le délai de traitement.....	29
2-3- Le siège de la tumeur primitive.....	30
2-4- La classification TNM.....	30
3- Les facteurs anatomopathologiques.....	30
3-1- Le type histologique.....	30
3-2-Le grade histologique.....	30
4-Répartition des fréquences génotypiques dans les deux groupes.....	31

5-Répartition des fréquences alléliques dans les deux groupes.....	32
6- Calcule des Odds Ratio des sujets malades ayant un allèle T par rapport aux témoins ayant un génotype CC.....	33
<b>Conclusion.....</b>	<b>35</b>