UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

.....

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE, DE LA SANTE ET DE L'ENVIRONNEMENT (ED-SEV)

.....

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

Année : 2016 **N° d'ordre : 193**

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Génétique des Populations

Présentée par : **Daniel DOUPA**

CARACTERISATION DES MUTATIONS MITOCHONDRIALES DANS LA DIVERSITE ET L'EVOLUTION DES TUMEURS BENIGNES DU SEIN AU SENEGAL

Soutenue le : 10/02/2016

Membres du Jury

Président : M. Mbacké SEMBENE	Professeur Titulaire	FST/UCAD
Rapporteurs : M. Omar FAYE	Professeur Agrégé	FMPO/UCAD
M. Denis François	Directeur de Recherche	INRA/Montpellier
M. Malick FALL	Chargé d'Enseignements	FST/UCAD
Examinateur : Mme Rokhaya NDiaye DIALLO	Maître de Conférences Agrégée	FMPO/UCAD
Directeur de thèse : M. Ahmadou DEM	Professeur Titulaire	FMFO/UCAD

DEDICACES

Je dédie ce travail:

- A feu père ***Barthélémy NIOUKY*** et feu père ***Albinou SIMEDOU***. Merci pour votre amour infini et total. Par vos sacrifices, déterminations, encouragements et vos prières, vous avez contribué à ce travail. Vous auriez été les plus heureux en ce jour où mon rêve devient enfin réalité. Je vous dédie très affectueusement ce travail. Que Dieu vous accueille dans son paradis.
- ✓ A mon très cher défunt ***Père Pierre DOUPA***, qui pour assurer notre scolarité, vous n'hésitiez pas à mettre tout en œuvre pour que je réalise mon rêve. Aujourd'hui vous n'êtes plus, mais laisse moi te dire "Vous êtes un combattant courageux, un homme qui ne baisse jamais les bras et un très bon père". Mon souhait le plus grand est de pouvoir vous ressembler. Puisse Dieu le tout puissant vous accueille dans son paradis et qu'il vous accorde le repos éternel;
- A mes mamans : (***Thérèse MALACK, Thérèse MALOU, Béatrice MANCORE et Germaine NAHOUKANE***) de vraies guerrières, mères protectrices, aimantes et aimées. Merci chères mamans pour tout ;
- A ma petite Amie ***Olga Murelle KANFOM.*** Ma bien aimée, le Seigneur m'a fait la grâce de te rencontrer. Tu apportes tant de bonheur à ma vie. Je te remercie infiniment pour ton soutien et tes conseils. Puisse Dieu nous aider à avoir un foyer toujours heureux.

REMERCIEMENTS

Au « DIEU », le Tout Puissant pour m'avoir permis de mener à terme ce travail.

Je remercie mes directeurs de thèse, **Monsieur le professeur *Ahmadou DEM*** et **Monsieur le professeur *Mbacké SEMBENE*** pour tous les efforts qu'ils ont fournis dans ma formation depuis le Master II jusqu'au Doctorat. Je tiens à les remercier de m'avoir proposé ce sujet passionnant. Leur disponibilité, leur rigueur, leur efficacité dans le travail, leur gentillesse, leur honnêteté m'ont été d'un grand secours tout au long de mon parcours doctoral. Je voudrais aussi leur manifester toutes ma reconnaissance pour m'avoir guidé et orienté dans la recherche.

Je remercie le ***professeur SEMBENE*** pour sa patience, sa générosité son aide dans le travail et pour plein d'autres choses. Si vraiment je suis arrivé à continuer mes études jusque-là c'est grâce à vous. Je vous remercie de m'avoir fait confiance jusqu'au point d'accepter que je combine ma formation doctorale à la formation de la FASTEF pendant ma troisième année de formation doctorale, ce qui m'a permis aujourd'hui de devenir un professeur de SVT dans le secondaire et d'être en mesure de rembourser tout l'argent qui sortait de votre poche pour financer les travaux. Encore et toujours Merci, Merci infiniment ;

J'exprime mes multitudes gratitudes aux membres de jury :

M. **Pape Mbacké SEMBENE** Professeur titulaire à l'Université Cheikh Anta Diop, Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de présider le jury de cette thèse, veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect ;

Je voudrais remercier sincèrement **M. Ahmadou DEM** Professeur titulaire FMFO/UCAD, le Directeur de mémoire de Master et de Thèse, pour votre soutien, vos précieux conseils et votre disponibilité remarquable tout au long de cette formation, Merci ;

Je remercie **M. Omar FAYE** Professeur Agrégé à FMPO/UCAD, pour toute son aide mais aussi pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail ;

Je tiens également à remercier **M. Malick FALL** Docteur, Chargé d'Enseignement à la FST à l'Université Cheikh Anta Diop, pour sa collaboration, son encouragement, ses conseils et qui avait aimablement accepté de juger mon travail de master mais aussi pour avoir accepté d'être rapporteur ;

Je remercie **Mme Rokhaya NDiaye DIALLO** Maître de Conférences Agrégée à la FMPO/UCAD de l'Université Cheikh Anta Diop, d'avait aimablement accepté d'être examinateur dans cette thèse ;

Un grand merci à **M. Denis François** Directeur de Recherche, pour sa collaboration et pour avoir accepté d'évaluer également ce travail.

Je remercie également l'Institut Joliot Curie de l'hôpital Aristide Le Dantec qui nous a fourni les échantillons et les données épidémiologiques pour ce travail de thèse.

Je remercie également le laboratoire CBGP (Centre de Biologie pour la Gestion des Populations) dirigé auparavant par Laurent GRANJON. Merci à Laurent pour ses encouragements constants et son aide.

Une mention spéciale aux ***M. Henry archiviste, Docteur KA*** et ***Docteur DIAFA*** de l'institut Julliot Curie qui m'ont fourni les données et informations pour la partie épidémiologie de ce travail. Merci pour votre aide et vos encouragements.

Je tiens également à remercier mon oncle ***Jean NZALE***, mes frères ***Marcel DOUPA***, ***Dominique DOUPA***, ***Antoine DOUPA*** qui ont pris le relai en prenant en charge mes études depuis ma première année à l'université. Merci vraiment pour vos soutiens financiers moraux et vos générosités.

Mes remerciements les plus sincères vont à ***Awa NDIAYE*** et à ***Khadim KEBE*** qui sont nos ainés au laboratoire et qui m'ont beaucoup appris sur l'extraction d'ADN, l'amplification par PCR mais aussi dans la réalisation de ce travail.

Merci à Dr ***Fatima MBAYE et Dr Toféne DIOME*** pour leur contribution dans l'analyse des données génétiques. Vous êtes pour moi des parents et non des collègues ou amis.

Je remercie tout le personnel du CBGP, ***Mamadou KANE***, ***Aliou SOW, Nathalie SARR***, ***DIALLO***, ***BALDE***, ***Khalilou BA***, ***Omar BA***, vraiment je n'ai pas senti l'absence de ma famille au laboratoire. Vous me considérez comme votre fils, vous avez toujours priez pour moi. ***M. Kane***, merci vraiment pour la collaboration au labo de Biologie moléculaire, merci pour vos bonnes humeurs votre aide et vos encouragements.

Je tiens à remercier tous les stagiaires du CBGP de l'IRD, les doctorants et étudiants de la Génétique des populations: Dr ***Assane NDONG***, Dr ***Toféne DIOME***, Dr ***Fatima MBAYE*** (merci pour votre compagnie, vous êtes plus que des amis pour moi, merci pour la

collaboration), ***Ndèye Penda NDIAYE***, ***Abdou Khadre***, ***Mama Rakhy NDIAYE***, ***Jean Luc FAYE***, ***Marc Noel BADJI,*** pour votre collaboration au CBGP et au sein de la spécialité.

J'adresse mes vifs remerciements à toute ma famille sans exception: ***Papa***, mes ***Mamans***, les ***Frères***, les ***Sœurs***, les ***Cousins***, les ***Cousines***, les ***Tantes***, les ***Neveux***, ***Nièces***, les ***Oncles***. Merci infiniment pour votre soutien sur tous les plans ;

Je tiens aussi à remercier ***Dr SALL*** et ***M. SAGNA*** des Professeurs de lettres au lycée de Bala pour leurs contributions dans la qualité de la rédaction de ce travail. Merci mes chers collègues pour tout.

Mention spéciale à tous les agents de la cellule informatique du building communal de Dakar en particulier ***Boris KALY, Abybe*** ; pour tous les services qu'ils mon rendus, merci.

Je remercie ***Papa Moussa DIALLO***, ***Sidy DIAKHATE*** qui m'ont manifesté leur soutien dans le travail et prodigué des encouragements. Merci pour vos passionnantes discussions.

Je tiens à remercier ***Seckou MANE***, ***Omar SARR*** et ***Pape NDIAYE*** qui sont mes aidés financiers. Merci vraiment pour vos soutiens financiers, moraux et vos générosités.

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR
ECOLE DOCTORALE : SCIENCES DE LA VIE, DE LA SANTE ET DE L'"ENVIRONNEMENT
FACULTE : SCIENCES ET TECHNIQUES
THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Génétique des Populations

Nom et prénom du Candidat : DOUPA Daniel

Titre de la thèse :" **Caractérisation des mutations génétiques dans la diversité et l'évolution des tumeurs bénignes du sein au Sénégal"**

Date et lieu de soutenance : le 10 Février 2016 à l'UCAD, Dakar

Jury

Président : M. Mbacké SEMBENE	Professeur Titulaire	FST/UCAD
Rapporteurs : M. Omar FAYE	Professeur Agrégé	FMPO/UCAD
M. Denis François	Directeur de Recherche	INRA/Montpellier
M. Malick FALL	Chargé d'Enseignements	FST/UCAD
Examinateur : Mme Rokhaya NDiaye DIALLO	Maître de Conférences Agrégée	FMPO/UCAD
Directeur de thèse : M. Ahmadou DEM	Professeur Titulaire	FMFO/UCAD

RESUME :

Au Sénégal, comme dans la plupart des pays d'Afrique, même si les tumeurs bénignes du sein ne sont pas la première cause d'hospitalisation comme dans les pays développés du monde, elles occupent une place importante dans les patologies mammaires. Même si l'étiologie de ces tumeurs bénignes du seins sont généralement mal connue, mais il semble que la plupart d'entre elles peuvent être imputables à des causes multiples ou sont associées à de mutiples facteurs de risques. Aujourd'hui, l'un des facteurs des risques soupçonnés dans ces pathologies mammaires bénignes est une prédisposition génétique. L'un des enjeux majeurs devient alors l'identification de nouveaux biomarqueurs permettant d'améliorer la précocité des diagnostics et d'anticiper l'agressivité de ces maladies. C'est dans ce contexte, que s'inscrit cette thèse qui a pour objectif de mieux cerner et d'évaluer l'implication des mutations somatiques et l'expression génique des différentes protéines présentes dans un tissu sain et/ou pathologique dans les tumeurs bénignes du sein chez la femme Sénégalaise. Après le premier chapitre **revue de la litérature,** cette thèse comporte un autre chapitre intitulé **caractérisation des mutations génétiques dans la diversité et l'évolution des tumeurs bénignes du sein au Sénégal**. Ce dernier chapitre évalue d'une part l'implication des altérations génétiques du *Cyt b* dans l'évolution des tumeurs bénignes du sein et d'autre part comprendre l'impact de la diversité et l'évolution génétique de la *D-Loop* dans les lésions bénignes du sein chez les femmes sénégalaises. Avec le *Cyt* b, l'analyse des profils de mutations des tissus bénins a permis de voir que 50% de celles-ci ont conduit à un changement d'acides aminés et 12,5% à un décalage dans le cadre de lecture. Par ailleurs, l'analyse de signature de sélection indique que ces mutations étaient soumises à une sélection positive. Les résultats ont également révélé que la population de cellules bénignes était en croissance rapide à partir d'une population ancestrale à faible effectif. Donc on conclue que les mutations du *Cyt b* seraient impliquées dans l'évolution des tumeurs bénignes du sein chez les femmes sénégalaises. Pour la *D-Loop*, les résultats ont révélé une présence significative de variants spécifiques aux tissus bénins du sein et tissus témoins. La mutation C150T a été associée à une protection à la présence de tumeurs bénignes du sein et la mutation G247A impliquée à une augmentation du risque. Les patientes d'haplogroupe mitochondrial L seraient significativement les plus susceptibles de contracter ces lésions bénignes du sein. Malgré la grande diversité haplotypique notée pour l'ensemble des individus étudiés, un rapprochement génétique des tumeurs bénignes du sein a été observé. L'étude de l'évolution génétique des tumeurs bénignes mammaires a révélé que la *D-Loop* n'est pas sous sélection. En outre, une multiplication des cellules tumorales bénignes plus rapide par rapport au témoin a été remarquée. Enfin, une corrélation significative est associée aux haplotypes C309CC et témoin de la *D310*, constituant respectivement des facteurs à risque accru et susceptible à la contraction de lésions bénignes du sein.

Mots-clés : Sein, biomarqueurs, tumeur bénigne, mutation, *D-Loop*, diversité génétique, évolution, différentiation génétique, variation, *Cytochrome b*, Sénégal.

ABSTRACT:

In Senegal, as in most African countries, even if the benign breast tumors are the leading cause of hospitalization as well as developed countries of the world, they play an important role in breast pathologies. Although the etiology of these benign tumors of the breast are generally poorly known, but it seems that most of them may be due to multiple causes, or are associated with mutiples risk factors. Today, one of the risk factors suspected in these benign breast disease is a genetic predisposition. One of the major challenges then becomes identifying new biomarkers to improve the early diagnosis and anticipate the aggressiveness of these diseases. It is in this context that fits the thesis that aims to better understand and evaluate the involvement of somatic mutations and gene expression of the different proteins present in healthy tissue and / or disease in tumors benign breast in the Senegalese woman. After the first chapter review of the literature, this thesis has another chapter characterization of genetic mutations in the diversity and evolution of benign breast tumors in Senegal. This chapter assesses the one hand, the involvement of the Cyt b genetic alterations in the development of benign breast tumors and also understand the impact of genetic diversity and evolution of the D-loop in benign breast lesions among Senegalese women. With the Cyt b, profile analysis of mutations in benign tissue allowed to see that 50% of them have led to a change in amino acid and 12.5% to a shift in the reading frame. Furthermore, the selection of signature analysis indicates that these mutations were subjected to positive selection. The results also revealed that the population of benign cells was growing fast from a low effective ancestral population. So we concluded that mutations of Cyt b would be involved in the development of benign breast tumors in Senegalese women. For the D-Loop, the results revealed a significant presence of specific variants for breast benign tissue and control tissue. The C150T mutation has been associated with protection in the presence of benign breast tumors and the G247A mutation implicated in an increased risk. Patients with mitochondrial haplogroup L are significantly more susceptible to these benign breast lesions. Despite the great diversity haplotype noted for all individuals studied, a genetic approximation of benign breast tumors was observed. The study of the genetic evolution of breast benign tumors revealed that the D-loop is not under selection. In addition, a multiplication of benign tumor cells faster compared to control was noted. Finally, a significant correlation is associated with haplotype C309CC and control of the D310, respectively constituting factors to increased risk and susceptible to the contraction of benign breast lesions.

Keywords: Breast, benign tumors, mutation, *Cytochrome b*, genetic diversity, evolution, genetic differentiation, variability, *D-loop*, bio-marker.

LISTE DES ABREVIATIONS ET SIGLES

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNmt : ADN mitochondrial

ADNn: ADN nucléaire

AFLP : Amplified Fragment Lenght Polymorphism (polymorphisme de longueur de fragments amplifiés)

Arg: Arginine

ARN: Acide Ribonucléique

ARNr : ARN ribosomique

ARNt : ARN de transfert

Asn: Asparagine

Asp: Acide Aspartique

ATP: Adénosine Triphosphate

CBGP : Centre de Biologie pour la Gestion des Populations

Cys: Cystéine

***Cyt b*:** *Cytochrome b*

Cyto-Echo: Cytoponction combinée à l'Echographie

ddATP: Didésoxyadénosine Triphosphate

ddCTP: Didésoxycytidine Triphosphate

ddGTP: Didésoxyguanidine Triphosphate

ddNTP: Didéoxynucléotides Triphosphates

ddTTP: Didésoxythimidine Triphosphate

D-Loop: Displacement-Loop

dNTP: Déoxynucléotides Triphosphates

ERO: Espèces Réactives à l'Oxygène

FST : Faculté des Sciences et Techniques

Fst : Indice de différenciation génétique

Gln: Glutamine

Glu: Acide Glutamique

Gly: Glycine

His: Histidine

HV: Hypervariable (région)

MgCL2 : dichlorure de magnésium

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

PCR : Réaction de Polymérosation en chaine

RFLP : Restricted Fragment Length Polymorphism (polymorphisme de longueur des fragments de pestriction)

ROS: Reactive Oxygen Species

Taq : *Thermus aquaticus*

TB : Tissus Bénins (Tumeurs Bénignes)

TS : Tissus Sains

UCAD: Université Cheikh Anta Diop

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Histologie du sein 3
Figure 2: Coupe histologique du sein (D'après Histologie humaine fascicule 7 de Poirier 1971) 4
Figure 3: Extrémité d'un acinus (Image adaptée du site Anapath CHU Montpellier) 5
Figure 4: Différentes tumeurs bénignes du sein 7
Figure 5: Les différents types de remaniement chromosomique (Gauthier, 2010) 11
Figure 6 : Les différents types de mutations ponctuelles (http://www.academie-medecine.fr/Upload/tubiana_rapp_cancer_13sept_073.pdf) 12
Figure 7: De la mutation génétique au cancer (http://www.academie-medecine.fr/Upload/tubiana_rapp_cancer_13sept_073.pdf 14
Figure 8: Différents papillomes du sein 15
Figure 9: Fibroadénome du sein (http://www.google.fr/imgres?imgurl) 17
Figure 10: Maladies fibro-kystiques du sein 18
Figure 11: Tumeur phylode du sein 19
Figure 12: Hyperplasie épithéliale mammaire 20
Figure 13: Mammographie et son principe 28
Figure 14: La salle d'échographie 29
Figure 15: Les différents types d'IRM utilisés dans le diagnostic du cancer 29
Figure 16: Matériels et micro et macrobiopsies pour l'examen anatomopathologique (http://www.chu-besancon.fr/3c/Ksein_4fev09.pdf) 30
Figure 17: Hormonothérapie (http://lecancerdusein.canalblog.com/archives/2013/01/08/26099159.html) 35
Figure 18: Courbes de mismatch distribution de la D-Loop des tissus bénins sous l'hypothèse 75

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Mutations du Cytochrome b au niveau des tissus mammaires.....51
Tableau II: Haplogroupes associés aux différentes mutations.....53
Tableau III: Polymorphisme intra-tissulaire.....53
Tableau IV: Indices de diversité et de divergence.....54
Tableau V: Distances génétiques et indice de différenciation (Fst).....54
Tableau VI: Fréquences d'acides aminés.....55
Tableau VII: Comparaison des mutations des acides aminés entre les tissus sains et tissus bénins.....56
Tableau VIII: Tests de neutralité au niveau des tissus bénins.....57
Tableau IX: Positions et fréquences des variants de la *D-Loop* dans les tissus bénins appariés aux tissus témoins.....65
Tableau X: Fréquences et diversité des haplogroupes et sous-haplogroupes retrouvés chez les femmes sénégalaises.....71
Tableau XI: Paramètre de diversité des tissus sains et des tissus bénins.....72
Tableau XII: Fréquences nucléotidiques des séquences.....72
Tableau XIII: Distances génétiques des populations et groupes de populations.....73
Tableau XIV: Valeurs de la différentiation génétique (Fst) entre les populations et groupes de populations.....73
Tableau XV: Diversités haplotypique (Hd) et nucléotidique (Pi) des tissus sains et tissus.....74
Tableau XVI: Test de neutralité.....74
Tableau XVII: Comparaison entre haplogroupes de la *D-loop*, âge des patientes et type des tumeurs bénignes.....75
Tableau XVIII: Comparaison entre haplotypes du microsatellite mitochondrial 303-316 (*D310)*.....76

TABLE DE MATIERES

DEDICACES I
REMERCIEMENTS II
RESUME : V
LISTE DES FIGURES IX
LISTE DES TABLEAUX X
TABLE DE MATIERES XI
INTRODUCTION 1
CHAPITRE I:
REVUE DE LA LITTERATURE 3
I.1 LE SEIN NORMALE 3
I.1.1 ANATOMIE 3
I.1.2 HISTOLOGIE 4
I.1.3 PHYSIOLOGIE 5
I.2 SEIN MALADE : PHYSIOLOGIE DES TUMEURS MAMMAIRES 6
I.3 HISTORIQUE DE LA RECHERCHE SUR LES TUMEURS BENIGNES DU SEIN. 7
I.4 QUELQUES DEFINITIONS 8
I.4.1 TUMEUR 8
I.4.2 TUMEURS BENIGNES 9
I.4.3 MUTATIONS 10
I.5 CONSEQUENCES D'UNE MUTATION GENETIQUE 12
I.6 TYPOLOGIE DES TUMEURS BENIGNES DU SEIN 14
I.6.1 LE PAPILLOME 14
I.6.2 L'ADENOME PAPILLAIRE DU MAMELON 15
I.6.3 L'ADENOME SYRINGOMATEUX DU MAMELON 15
I.6.4 FIBROADENOME 15
I.6.5 LA MALADIE FIBRO-KYSTIQUE DU SEIN 17
I.6.6 POLYADENOMATOSE 18
I.6.7 TUMEUR PHYLLODE 18
I.6.8 ADENOMES 19
I.6.9 HAMARTOME 19
I.6.10 HYPERPLASIE EPITHELIALE 19
I.6.11 MALADIE DE MONDOR 20

I.6.12 LES INFLAMMATIONS CHRONIQUES 20
I.7 EPIDEMIOLOGIE 20
I.7.1 EPIDEMIOLOGIE DESCRIPTIVE 20
I.7.1.1 L'Adénofibrome ou fibroadénome 21
I.7.1.2 MALADIE FIROKYSTIQUE 22
I.7.1.3 TUMEUR PHYLLODE 22
I.7.1.4 LIPOME 22
I.7.1.5 HAMARTOME 22
I.7.1.6 PAPILLOME ET PAPILLOMATOSE 22
I.7.2 EPIDEMIOLOGIE ANALYTIQUE : LES FACTEURS DE RISQUES 22
I.7.3 EPIDEMIOLOGIE INTERVENTIONNELLE (Espié et Tournant. 2001 ; Morvan et Gompel. 2004) 25
I.8 DIAGNOSTIC DES TUMEURS BENIGNES DU SEIN 26
I.8.1 DIAGNOSTIC DES LESIONS BENIGNES 26
I.8.2 DIAGNOSTIC CLINIQUE 26
I.8.2.1 CIRCONSTANCES DE DECOUVERTE DES TUMEURS BENIGNES 26
I.8.2.2 L'ANAMNESE 27
I.8.2.3 EXAMEN CLINIQUE 27
I.8.2.4 L'EXAMEN PHYSIQUE : L'INSPECTION ET LA PALPATION 27
I.8.2.5 EXAMENS COMPLEMENTAIRES 27
I.8.2.5.1 EXAMENS D'IMAGERIE 27
I.8.2.5.1.1 LA MAMMOGRAPHIE 27
I.8.2.5.1.2 ECHOGRAPHIE 28
I.8.2.5.1.3 IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) 29
I.8.2.5.1.4 GALACTOGRAPHIE 30
I.8.2.5.2 EXAMENS ANATOMOPATHOLOGIQUES 30
I.8.2.5.2.1 A PARTIR DES PRELEVEMENTS DE LA BIOPSIE 30
I.8.2.5.2.2 A PARTIR DES PRELEVEMENTS DE LA CYTOPONCTION .31
I.8.2.5.2.3 APPORT DE LA GENETIQUE DANS LE DIAGNOSTIC DES TUMEURS DU SEIN 31
I.9 TRAITEMENT 33
I.9.1 CHIRURGIE 33
I.9.1.1 L'EXERESE DU NODULE 33
I.9.1.2 LA MASTECTOMIE PARTIELLE 34

I.9.1.3 LA MASTECTOMIE TOTALE....34
I.9.2 L'HORMONOTHERAPIE....34
I.9.3 MOYENS NOS MEDICAMENTEUX....35
I.9.4 QUELQUES INDICATIONS SUR LE TRAITEMENT DE TUMEURS BENIGNES....35
I.9.4.1 LE FIBROADENOME....35
I.9.4.2 TUMEUR PHYLLODE DU SEIN....36
I.9.4.3 LIPOME ET HARMATOME....36
I.9.4.4 PAPILLOME....36
I.9.4.5 MASTODYNIE....36
I.9.4.6 AUTRES TRAITEMENTS....37
I.10 HISTORIQUE DE L'IMPLICATION DE LA COMPOSANTE GENETIQUE ET EPIGENETIQUE DANS LES PATOLOGIES DU SEIN....37
CHAPITRE II:
IMPLICATION DES MUTATIONS GENETIQUES DES GENES CYTOCHROME B ET DE LA D-LOOP DANS LA DIVERSITE ET L'EVOLUTION DES TUMEURS BENIGNES DU SEIN....40
II.1 MATERIELS ET METHODE....42
II.1.1 MATERIELS....42
II.1.2 METHODE....42
II.1.2.1 COLLECTE D'ECHANTILLONS....42
II.1.2.2 TRAVAIL AU LABORATOIRE....43
II.1.2.2.1. EXTRACTION DE L'ADN....43
II.1.2.2.2. La PCR....44
II.1.2.2.3. SEQUENÇAGE (Méthode enzymatique au di-déoxynucléotides de Sanger)....45
II.1.2.3 ANALYSES BIOINFORMATIQUES....45
II.1.2.3.1. TRAITEMENT DES DONNEES DE SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES....45
II.1.2.3.2. RECHERCHE DE MUTATIONS D'INTERET....46
II.1.2.3.3. ÉVALUATION DE LA DIVERSITE GENETIQUE....47
II.1.2.3.4. ANALYSE DE LA DIFFERENCIATION GENETIQUE....47
II.1.2.3.5. DETECTION DE SIGNATURE MOLECULAIRE DE SELECTION....48
II.1.2.3.6. MISE EN EVIDENCE DES VARIATIONS D'ACIDES AMINES....48

II.2 RESULTATS ET DISCUSSION DE L'IMPLICATION DES MUTATIONS DU *CYT B* DANS L'EVOLUTION DES TUMEURS BENIGNES DU SEIN CHEZ LES FEMMES SENEGALAISES. 50
II.2.1 RESULTATS 50
II.2.1.1 PROFILS DE MUTATIONS DU *CYTOCHROME B* 50
II.2.1.2 DIVERSITE GENETIQUE INTER-TISSULAIRE 53
II.2.1.3 DIFFERENCIATION GENETIQUE INTER-TISSULAIRE 54
II.2.1.4 VARIATIONS D'ACIDES AMINES 54
II.2.1.4.1. CHEZ L'ENSEMBLE DES PATIENTES 54
II.2.1.4.2. CHEZ LES PATIENTES AVEC LES TISSUS TEMOINS 55
II.2.1.5 SIGNATURE MOLECULAIRE DE LA SELECTION NATURELLE 57
II.2.2 DISCUSSION 58
II.3 RESULTATS ET DISCUSSION DE L'IMPACT DE LA DIVERSITE ET DE L'EVOLUTION GENETIQUE DE LA D-LOOP DES TUMEURS BENIGNES CHEZ LES FEMMES SENEGALAISES 64
II.3.1 RESULTATS 64
II.3.1.1 SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES OBTENUES 64
II.3.1.2 VARIABILITE ET STRUCTURATION DE LA *D-LOOP* 64
II.3.1.2.1 MUTATIONS DE LA *D-LOOP* 64
II.3.1.2.2 HAPLOGROUPES DE LA *D-LOOP* 69
II.3.1.2.3 DIVERSITE DES SEQUENCES D'ADN DES TUMEURS BENIGNES DU SEIN ET STRUCTURE GENETIQUE DES POPULATIONS 72
II.3.1.2.3.1 DIVERSITE GENETIQUE 72
II.3.1.2.3.2 DIFFERENCIATION ET STRUCTURE GENETIQUE DES POPULATIONS 73
II.3.1.2.3.3 EVOLUTION DE LA D-LOOP 74
II.3.1.2.3.4 ETUDE SUR L'INCIDENCE DES TUMEURS BENIGNES 75
II.3.2 DISCUSSION 77
CONCLUSION ET PERSPECTIVES 78
CONCLUSION 82
PERSPECTIVES 84
REFERENCES 84
ANNEXES 101

INTRODUCTION

Constituées d'un ensemble de pathologies ubiquitaires, les tumeurs bénignes du sein sont des néoformations bénignes développées dans la glande mammaire. Elles se caractérisent par un développent local, une croissance lente, une absence de récidive après ablation chirurgicale si l'exérèse est complète. Elles peuvent atteindre un volume et un poids importants. Dans certains cas, elles peuvent être la cause de complications graves.

Les tumeurs du sein sont fréquentes. Elles ont une distribution planétaire. Parmi elles, les tumeurs bénignes sont les plus fréquemment rencontrées. Leur fréquence varie entre 57 et 70% (Lansac et Lecomte, 1994). Selon Nielsen *et al* (1984) une femme sur deux environ développe au cours de sa vie une dystophie fibrokystique et une femme sur cinq un adénofibrome.

Particulièrement fréquentes chez les jeunes femmes et les adolescentes (Diallo *et al*., 1996), elles constituent une source d'inquiétude importante car elles posent des problèmes particuliers de diagnostic et de traitement.

Même si les tumeurs bénignes du sein ne sont pas des cancers, la détection ou l'annonce de cette anomalie mammaire plonge, au même titre que le diagnostic du cancer, la patiente et ses proches dans une situation toujours inquiétante à cause de la hantise du cancer.

C'est précisément cette hantise du cancer, exigeant une vigilance oncologique sans relâche, qui contribue à conférer à la pathologie tumorale bénigne du sein toute l'importance qu'elle revêt actuellement.

Etant donné que l'étiologie des tumeurs bénigne est généralement mal connue, la plupart d'entre elles peuvent être imputables à des causes multiples ou associées à de multiples facteurs de risque ; ce qui pose de sérieuses difficultés au diagnostic et au traitement de ces tumeurs bénignes du sein.

Pour isoler les risques spécifiques de tumeurs bénignes liés aux mutations génétiques, il faut donc vérifier un grand nombre de variables qui sont de nature à obscurcir le problème. Puisqu'il s'agit de pathologies multifactorielles, il est donc important de connaître les mécanismes de transformation de cellules mammaires de l'état normal à l'état bénin.

L'avancée dans la recherche de solutions, orientée aujourd'hui vers la détection au stade précoce voit l'apport considérable de la génétique car elle a permis la localisation et l'identification de certains gènes de prédisposition proposée comme facteur de causalité dans les troubles mammaires bénignes (Santen *et al*., 2005). Exemple sur les mutations sur le gène Prlr qui sont liées à l'apparition de tumeur bénigne du sein avec un potentiel de prolifération cellulaire élevé tout en empêchant la mort cellulaire (Roman *et al*., 2008).

Un certains nombres de facteurs étiologiques polygéniques résultant des effets combinés de nombreux loci à faible pénétrance, sont de plus en plus soupçonnés de contribuer au développement des tumeurs bénignes et du cancer du sein (Antoniou *et al*., 2002) et pourraient expliquer le restant des cas non encore inexpliqués. Ce qui nous pousse à orienter notre attention vers la recherche de ces autres facteurs génétiques de risques non encore identifiés. Deux gènes mitochondriaux sont ainsi ciblés : le *Cyt b* et la *D-Loop.* Cette étude ne s'intéresse qu'à l'influence de la sélection naturelle sur la diversité génétique du *Cyt b* et de la *D-Loop* dans l'évolution des tumeurs bénignes du sein.

Ainsi, partant du postulat que l'évolution des tumeurs est, en dernière analyse, celle de leur patrimoine génétique, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les mutations seraient impliquées dans l'évolution des tumeurs bénignes du sein.

L'objectif de cette recherche est de voir l'implication des mutations du *Cyt b* et de la *D-Loop* dans la diversité et l'évolution des tumeurs bénignes du sein en cherchant à comprendre le développement de ces tumeurs et en identifiant des mutations qui déterminent les propriétés essentielles des cellules tumorales . Cet objectif général a été décliné en deux objectifs spécifiques : le premier consiste à évaluer l'Implication des mutations génétiques du gène *Cyt* dans l'évolution les tumeurs bénignes du sein chez la femme sénégalaise et le deuxième vise à estimer l'impact de la diversité et de l'évolution génétique de la *D-Loop* dans les tumeurs bénigne du sein chez les femmes sénégalaises.

Cette étude faite sur les patientes de l'Institut Joliot Curie de l'hôpital Aristide Le Dantec de Dakar est organisée en trois chapitres: un premier chapitre nous permettra de faire le point sur la question grâce à la revue de la littérature; enfin un deuxième chapitre abordant l'Implication des mutations génétiques du *Cyt b* et de la *D-Loop* dans la diversité et l'évolution génétique dans des tumeurs bénignes du sein chez les femmes sénégalaises qui sera suivi par une conclusion et des perspectives.

CHAPITRE I:

REVUE DE LA LITTERATURE

I.1 LE SEIN NORMALE

Le sein est un organe du corps qui a pour fonction primaire la synthèse, la sécrétion et l'éjection du lait.

I.1.1 ANATOMIE

Les glandes mammaires sont situées dans la partie antéro-supérieure du thorax, de chaque côté du sternum et en avant des muscles pectoraux, en regard de l'espace compris entre la 3ème et la 7ème côte.

Le sein présente une forme sémi-ovoïde chez la jeune fille mais celle-ci se rapproche d'une demi sphère en décubitus dorsal. Quelque soit leur forme les seins sont souvent asymétriques.

Les seins mesurent en moyenne 10 à l1cm de haut sur 12 à 13cm de large et ceci en dehors de tout état gestatif. A la ménopause, ce volume se réduit progressivement et considérablement.

Le sein pèse ISO à 200g chez la jeune fille et de 400 à 500g chez la nourrice; cependant il peut atteindre chez certaines femmes 800 à 900g

La configuration externe du sein donne un aspect Convexe ou arrondie à la surface externe du thorax qui présente trois zones : une zone périphérique, une zone moyenne circulaire et pigmentée ou "aréole" et une zone centrale ou "mamelon".

Par contre la configuration interne nous pousse à considérer le sein comme une volumineuse glande cutanée en grappe, développée dans l'hypoderme. Une coupe sagittale (fig 1) permet de reconnaître de la superficie vers la profondeur : une enveloppe cutanée, les canaux galactophores (15 à 25) occupant l'axe du mamelon, une capsule recouvrant la glande mammaire proprement dite, une couche cellulo-adipeuse dite rétro-mammaire. A ces éléments il faut ajouter la présence de vaisseaux sanguins et lymphatiques, de nerfs et de ligaments suspenseurs du sein.

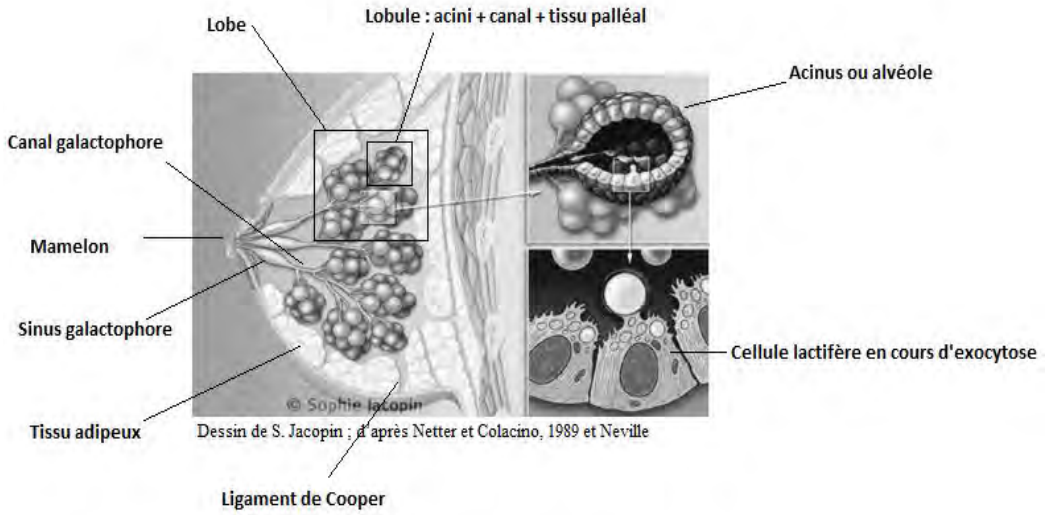


Figure 1: Histologie du sein

I.1.2 HISTOLOGIE

La glande mammaire est une masse fibro-adipeuse, gris jaunâtre parsemée de lobules qui donnent à la palpation du sein une sensation grenue.

A l'état de repos, le corps mammaire est divisé par les travées conjonctives riches en cellules adipeuses en plusieurs territoires qui sont de "lobule". Chaque lobule est formé d'un groupe d'acini pédiculisé chacun par un " canal intra-lobulaire". La réunion de plusieurs canaux inter lobulaires forme un conduit lactifère. L'ensemble des lobules drainés par un conduit lactifère constitue un "tube". On en compte environ 15 à 20 par corps mammaire.

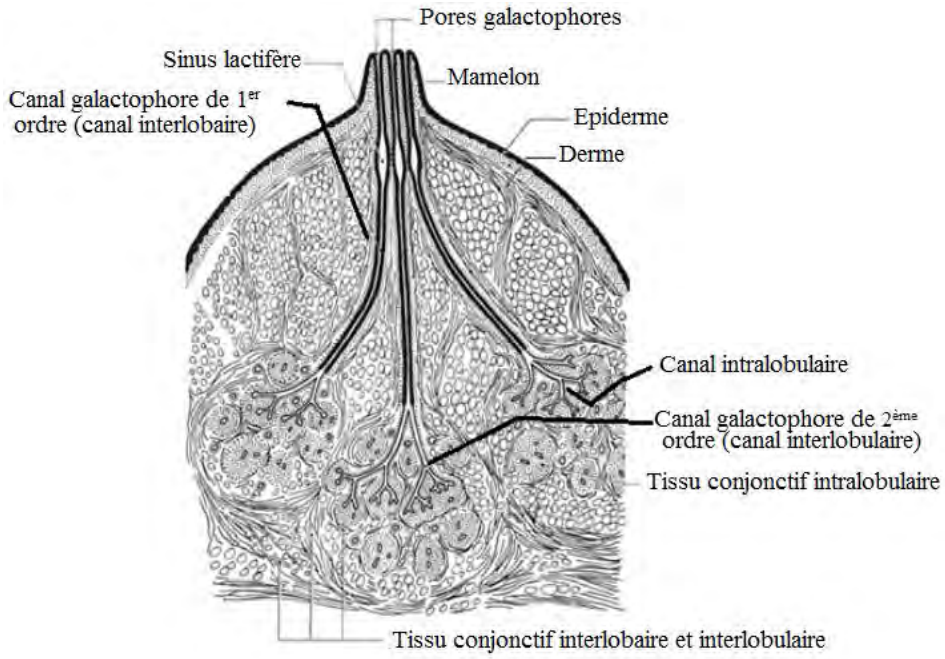


Figure 2: Coupe histologique du sein (D'après Histologie humaine fascicule 7 de Poirier 1971)

L'acinus ou élément sécréteur fig.3 comporte une cavité bordée de dedans en dehors par:

- ✓ une couche de cellules cubiques à noyau volumineux riche en chromatine ;
- ✓ puis une couche de cellules myoépithéliales. Ce sont de cellules plates, étoilées, à noyau petit et sombre, à cytoplasme parcouru de myofibrilles ;
- ✓ enfin une membrane basale ou vitrée.

Les canaux excréteurs présentent de dehors en dedans:

- ✓ une vitrée qui se renforce progressivement d'une gaine conjonctivo-élastique
- ✓ des cellules myoépithéliales qui prennent la direction longitudinale des canaux.
- ✓ une couche de cellules épithéliales-cubiques disposées en deux couches au niveau des conduits lactifères,
- ✓ la lumière des canaux lactifères présente une dilatation ampulaire, le sinus lactifère ou galactophore, situé à la base du mamelon.

Le tissu conjonctif interstitiel est assez dense dans les regtons inter-lobulaires où s'acheminent les vaisseaux et les nerfs. Mais il devient délicat dans les lobules au contact des alvéoles. Là, les fibrilles collagènes sont fines, la substance fondamentale est abondante, et les histiocytes nombreux. C'est le "manteau" alvéolaire dont l'évolution semble être également sous commande hormonale.

Le mamelon et l'aréole renferment dans leur tissu conjonctif fibroélastique un muscle peaucier qui disposé circulairement au niveau du mamelon s'élargit au niveau de l'aréole en un cône; sa contraction rétrécit l'aréole tout en projetant et durcissant le mamelon.

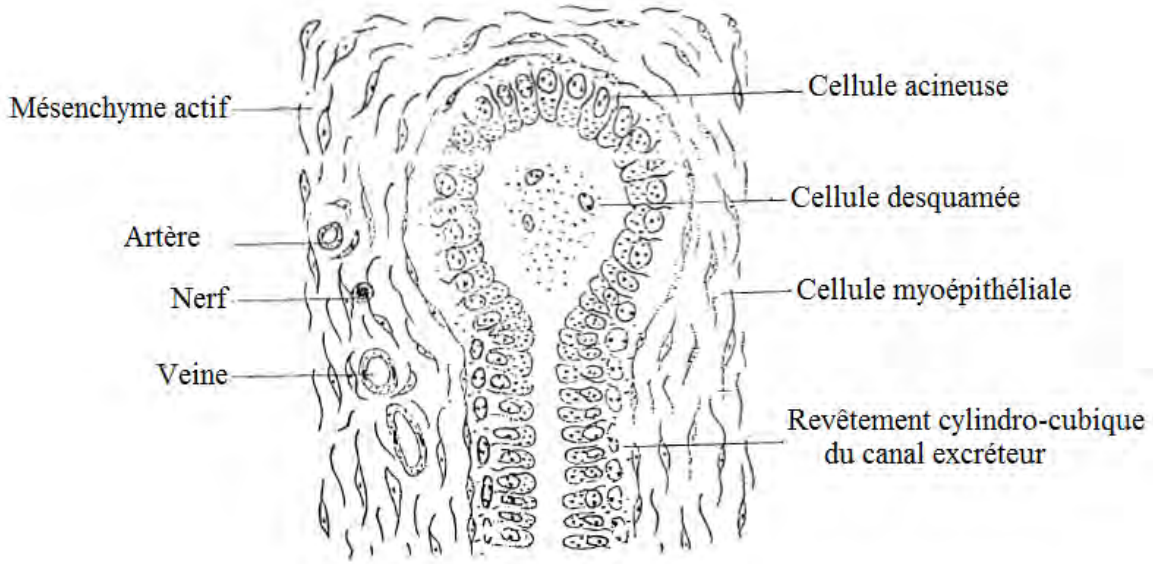


Figure 3: Extrémité d'un acinus (Image adaptée du site Anapath CHU Montpellier)

I.1.3 PHYSIOLOGIE

Le sein est une glande hormono-dépendante et les changements physiologiques s'y produisant sont sous le contrôle du complexe neuroendocrinien qui gouverne le système reproducteur.

Les hormones majeures de la physiologie mammaire se composent: des œstrogènes, de la progestérone, de la prolactine et de l'ocytocine.

Donc le tissu mammaire renferme des récepteurs hormonaux dont ceux des œstrogènes (ER) et de la progestérone (PR) concentrés en particulier dans la zone glandulaire et dont le nombre varie avec l'âge (Villeneuve, 2011).

Cependant d'autres hormones semblent enfin agir sur la glande mammaire, tout au moins in vitro. Ce sont l'insuline, l'aldostérone, l'hormone de croissance, les androgènes, les glucocorticoïdes, les hormones thyroïdiennes stimulant la croissance galactophorique. L'aldostérone et l'insuline auraient un rôle facilitant la différenciation lobulaire.

Le développement de la glande mammaire est particulier puisqu'il se fait tardivement, et que celle-ci subit un remodelage au cours de la vie. La glande mammaire est rudimentaire à la naissance. C'est à la puberté que s'effectue une grande part de son développement. L'action de la testostérone en inhibe le développement chez l'homme, alors que chez la femme, l'action des hormones ovariennes le stimule. On observe alors une accumulation de tissus adipeux et fibreux, qui occupe 80% ou plus du volume du sein chez une femme adulte n'allaitant pas. Au cours des cycles menstruels subséquents, on observe une phase de prolifération légèrement accrue lors de la phase lutéale du cycle, avec une augmentation du volume du sein qui peut atteindre jusqu'à 15% (Potten, 1988). C'est au moment de la première grossesse menée à terme que la différenciation la plus poussée se produit. À ce moment, les changements hormonaux associés à la grossesse produisent une croissance et une prolifération intenses, et induisent la formation des acini sécrétoires, une augmentation de la quantité de tissu adipeux et une augmentation du flux sanguin.

I.2 SEIN MALADE : PHYSIOLOGIE DES TUMEURS MAMMAIRES

Aucune étiologie précise n'est connue aux tumeurs bénignes du sein. Brinton (*et al*., 1981) pense que l'obésité protège contre le fibroadénome du sein ; quant à l'âge, la parité et l'allaitement, ne jouent aucun rôle véritable (Foko. 2004)

Cependant de façon générale, les tumeurs peuvent être de cause : Inconnue, Héréditaire, Infectieuse (Virus), Physique : (les rayonnements), Chimique : (Substances contenues dans le tabac, issues de l'industrie) (Darboux *et al*., 1994).

La genèse d'une tumeur mammaire suit les lois d'un continuum évolutif spatiotemporel (Guinebretière, 2007) faisant appel à une combinaison de mécanismes génétiques et épigénétiques dans la glande mammaire ainsi que des modifications dans le microenvironnement tumoral adjacent et des interactions cellules/milieux favorables (ARC, 2013). En effet, la tumorogenèse est un processus complexe, dicté par l'accumulation progressive d'altérations génétiques et épigénétiques affectant des facteurs contrôlant la différenciation, la division et la mort cellulaire (Eisinger, 2005; Moyret-Lalle *et al*., 2008). Il s'agit d'un phénomène dynamique qui, à l'image de la théorie de l'évolution des espèces selon Darwin, repose sur une succession de phases de sélections et d'expansions clonales, chacune d'entre elles faisant suite à l'acquisition par une cellule d'un avantage de survie et de prolifération (Nkondjock *et al*., 2005).

L'initiation tumorale serait selon Preston-Martin *et al.* (1990) le résultat d'une prolifération cellulaire incontrôlée et /ou d'un processus apoptotique aberrant, qui seraient la conséquence

d'une accumulation d'altérations génétiques entraînant l'activation de proto-oncogènes et l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur. Parallèlement à l'accumulation de ces altérations génétiques, l'épithélium mammaire normal progresserait vers des lésions prolifératives bénignes et atypiques, puis vers le carcinome in situ, pour aboutir enfin à une tumeur invasive (Burstein *et al*., 2004).

Dans la transformation de la glande mammaire, plusieurs étapes se succèdent, les unes responsables du développement de clones cellulaires aberrants et dégénérés, étapes de carcinogenèse et les autres responsables du développement d'une structure autonome et fonctionnant en autarcie, étapes appartenant au processus de tumorogenèse. Ainsi un certain nombre de tumeurs bénignes est localisé sur la glande mammaire (voire fig 4)

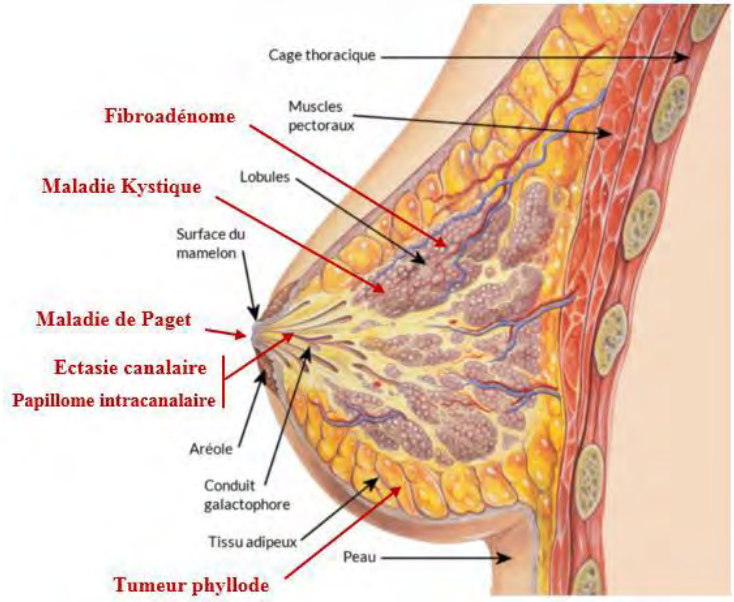


Figure 4: Différentes tumeurs bénignes du sein

I.3 HISTORIQUE DE LA RECHERCHE SUR LES TUMEURS BENIGNES DU SEIN

Les tumeurs bénignes sont des entités anciennes placées au second rang derrière le cancer, une entité beaucoup plus cadrée. L'un des premiers hommes à s'intéresser à des pathologies mammaires bénignes est le chirurgien Sir Astley Cooper dans « Illustrations of Diseases of the Breast » en 1829. Il distingue 2 groupes de patientes avec mastodynies avec ou sans tumeur palpable. Dans cet article, il décrit les bases de l'anatomie macroscopique du sein. Il faudra attendre 64 ans plus tard pour voir un autre article sur les tumeurs bénignes d'un chirurgien français Reclus intitulé « Maladie kystique de la mamelle »,1893 dans lequel il fait la description clinique et histologique de la maladie kystique (kystes multiples et bilatéraux).

Après lui d'autres auteurs se sont illustrés dans cette pathologie mammaire en essayant de la définir. Il s'agit de Brisaud en 1884, Schimmelbush en 1890 et Konig en 1893. C'est pour cette raison qu'elle a porté le nom de maladie de Reclus ou de Schimmelbusch. Cependant c'est avec Konig que l'éponyme de "mastopathie fibrokystique " est introduit dans la littérature définissant ainsi un groupe de lésions dues au cercle vicieux des sécrétions et irritations.

En 1920 d'autres personnages du milieu médical s'illustrent dans la description d'autres pathologies mammaires bénignes. Il faut citer : Semb, chirurgien norvégien qui décrit une nouvelle tumeur bénigne du sein qu'il nomme "fibroadénomatose" à ne pas confondre avec "fibroadénome" et Cheatle et Cutler du Royaume Uni qui décrivent une tumeur qu'ils nomment « mazoplasia ». Jusque-là, la majorité de ces auteurs décrit le problème clinique de la maladie fibrokystique. Mais d'autres auteurs ont donné des descriptions détaillées des autres pathologies bénignes. C'est le cas de la contribution de ces deux premières cliniques : Atkins à Londres et Geschickter aux USA qui ont apporté des contributions à la compréhension de la pathologie mammaire bénigne. En 1961, Oberman et French décrivent le concept de continuum entre la normalité et les pathologies bénignes en considérant que : l'adénofibromes, la maladie fibrokystique, le papillome intraductal ne sont pas des entités distinctes mais des variantes de la normale, ayant pour base une anomalie de la réponse stromale et de l'épithélium du sein à un stimulus hormonal.

Jusqu'en 1970, les études sont essentiellement orientées vers l'évaluation de la relation avec le cancer ultérieur plutôt que de chercher à comprendre les procédés qui sous tendent les transformations bénignes. Il faudra attendre 1976 pour que le cancérologue Peter Nowell avance l'idée que les tumeurs suivent les lois de l'évolution découvertes par Darwin. Ce qui marque le début du tournant de la recherche vers un autre champ. Aujourd'hui l'implication de la composante génétique dans les pathologies bénignes du sein est de plus en plus confirmée.

I.4 QUELQUES DEFINITIONS

I.4.1 TUMEUR

Le terme « tumeur » désignait autrefois toute augmentation de volume localisée déformant un organe ou une partie du corps. Elle réunissait des lésions différentes, notamment: des collections liquidiennes collectées dans une cavité préformée, des tuméfactions d'origine inflammatoire, des hypertrophies tissulaires d'origine dystrophique (goitre) et des lésions liées à des désordres d'origine embryologique (dysembryoplasies).

La définition actuelle est plus restrictive et repose sur la notion d'homéostasie des tissus. Le développement et la croissance d'un tissu ou d'un organe sont conditionnés par des processus complexes permettant la régulation des différentes étapes de la vie d'une cellule: la prolifération, la différenciation, la sénescence et la mort cellulaire programmée. Tous ces phénomènes sont aussi mis en jeu lors du renouvellement des cellules dont la durée de vie est limitée. Au sein d'un tissu, l'équilibre entre ces processus est à l'origine de l'homéostasie tissulaire. Les anomalies de cette homéostasie, par augmentation de la prolifération et/ou diminution de la mort cellulaire, sont à l'origine de l'accumulation des cellules aboutissant à la formation d'une tumeur macroscopiquement visible.

Le terme de tumeur (synonyme: « néoplasme » ou « néoplasie ») désigne actuellement une prolifération cellulaire excessive aboutissant à une masse tissulaire ressemblant plus ou moins au tissu normal homologue (adulte ou embryonnaire), ayant tendance à persister et à croître, témoignant de son autonomie biologique.

I.4.2 TUMEURS BENIGNES

Elles se développent localement et restent cantonnées au tissu dans lequel elles ont pris naissance. Leur croissance est lente. Toutefois, elles peuvent atteindre un volume et un poids importants. Elles ne récidivent pas après ablation chirurgicale, à condition que l'exérèse soit complète. Ces tumeurs ne métastasent jamais. Leur évolution est généralement favorable. Toutefois, dans certains cas, elles peuvent être la cause de complications graves voire mortelle**s,** en raison du désordre métabolique.

Ce sont des tumeurs circonscrites, bien limitées, nettement séparées des tissus avoisinants, parfois même entourées par une capsule. Cette limitation explique la facilité de l'exérèse chirurgicale et la possibilité d'une exérèse limitée à la seule tumeur.

Du point de vue histologique, le tissu tumoral reproduit de très près la structure du tissu initial (tumeur différenciée). Les cellules ont une morphologie normale et ne présentent aucun caractère de malignité.

Les tumeurs bénignes et les mastopathies complexes correspondent à un ensemble des lésions très vaste auquel le pathologiste se trouve souvent confronté dans sa pratique quotidienne et soulevant divers problèmes de classification, de définition histologiques, de diagnostic différentiel avec le cancer in situ ou infiltrant, de potentialité évolutive et de filiation entre ces lésions (Tranbaloc, 2006). Leur risque est modulé selon le caractère prolifératif de ces lésions conduisant à une classification en trois catégories : les lésions non prolifératives (cellules qui se divisent très lentement), les lésions prolifératives sans atypie (cellules se divisant

rapidement) et les lésions prolifératives avec atypie (cellules anormales se divisant rapidement). Les lésions non prolifératives et prolifératives sans atypie sont associées à un faible sur-risque de cancer du sein, alors que les lésions prolifératives avec atypie multiplient le risque par quatre environ (Dupont et Page, 1987 ; Key *et al*., 2001). La compréhension de ces lésions bénignes est donc essentielle, étant donné qu'il a été démontré que le développement de certaines d'entre elles constitue un facteur de risque de développer un cancer du sein (Desjardins, 2010).

I.4.3 MUTATIONS

Les organismes ne peuvent survivre que si leur ADN est soigneusement répliqué et protégé des altérations chimiques et physiques qui pourraient changer ses propriétés codantes. La vie et la biodiversité qui résultent de la balance subtile entre mutations et réparations reste toujours la préoccupation des généticiens. Les mutations introduisent une variabilité génétique. La conséquence de toute mutation dépend de son effet fonctionnel, qui peut être neutre, conduisant alors à l'amélioration d'une fonction (diversité, évolution) ou à l'altération d'une fonction (effet pathogène) et engendrer des maladies génétiques, mono-géniques ou des prédispositions génétiques aux maladies poly-factorielles, exemple : le cas du cancer. Donc le terme « mutation » désigne alors n'importe quel changement intervenu dans la séquence de l'ADN, sans préjuger de sa pathogénicité à l'échelle du gène ou du chromosome. On parle aussi de « variants ». Il est important de souligner d'emblée qu'on attribue souvent à tort une connotation pathologique à ce terme de « mutation ». Mais les variations non pathogènes de l'ADN (appelées « polymorphismes ») sont par définition également des mutations.

Selon l'encyclopédie le Grand Larousse, la mutation est définie comme une variation discontinue qui, dès son apparition, s'inscrit dans le patrimoine héréditaire par modification du gène. Ce terme est utilisé pour désigner le changement d'état d'un gène, de même que la variation héréditaire qui est la manifestation visible de ce changement. Dans son sens actuel, deux auteurs qui sont les premiers à l'utiliser sont Adanso (1763) et l'horticulteur Duchesne (1766) à la suite de l'apparition d'un fraisier monophylle[1]. Les mutations ne se présentent pas sous le même aspect chez tous les individus car leurs expressions varient et ne sont caractéristiques que du type de mutation.

Plusieurs types de mutations peuvent être notés :

D'une part les mutations qui affectent le gène. Elles sont appelées mutations génétiques, ou encore génovariation. Elles sont à l'origine de la modification de la nature du gène

[1] : (http://www.academie-sciences.fr/activite/archive/dossiers/Adanson/Adanson_pdf/Chevalier_CR.pdf)

(modification chimique ou physique), faisant apparaître soit un caractère qui est dominant, soit un caractère récessif ou soit un caractère co-dominant ;

D'autre part les mutations du chromosome ou mutations chromosomiques, comme son nom l'indique, affectent une portion du chromosome. Elles remanient la structure du chromosome en déplaçant les gènes sans les modifier. Elles résultent de la rupture des chromosomes et de la soudure des fragments dans un nouvel ordre. Selon les cas on parle de transversion, de translocation ou d'inversion ;

À côté de ces types cités, il y a les mutations du génome qui se traduisent par une multiplication de la garniture chromosomique. Ces mutations produisent la polyploïdie. Exemple : la garniture diploïde (2n chromosome passe à 3n, 4n, 6n)

Que ce soient les mutations qui affectent le gène, le chromosome ou les mutations génomiques, elles résultent toutes de deux sources importantes: soit elles sont dues aux erreurs lors de la réplication de l'ADN, soit à des erreurs provoquées par les agents environnementaux. Ces mutations opérées sur l'ADN peuvent être classées suivant l'étendue de la lésion de l'ADN. Et dans ce cas, on a soit des macrolésions soit des microlésions.

Pour les macrolésions, ils concernent des altérations de zones plus ou moins importantes des chromosomes. On peut distinguer: les **insertions** qui sont des additions de matériel génétique d'amplitude variable, les **délétions,** qui sont des suppressions de matériel génétique d'amplitude variable, les **translocations** (échange réciproque de matériel génétique), les **fusions** (accolement de 2 chromosomes) et les **inversions** (changement d'orientation d'un segment d'ADN).

Ces différents types de mutations constituent ce qu'on appelle remaniement chromosomique. (Gauthier, 2010)

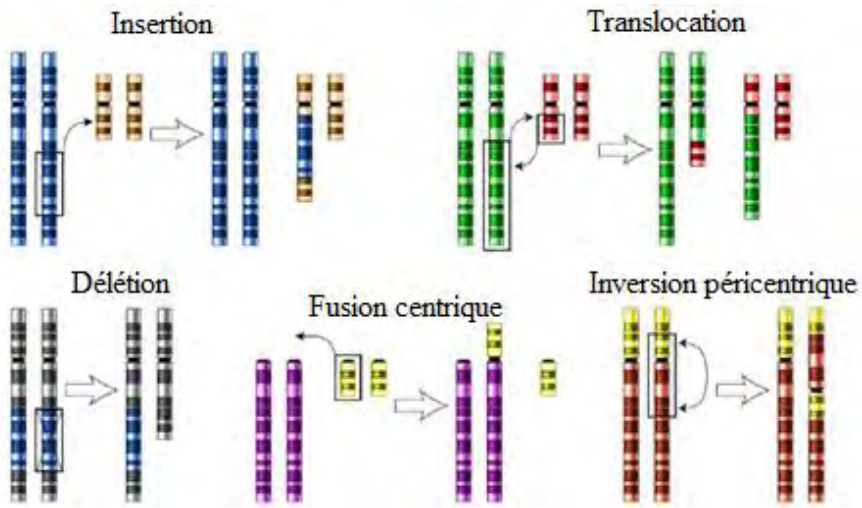


Figure 5: Les différents types de remaniement chromosomique (Gauthier, 2010)

En plus des remaniements chromosomiques, il y a des mutations ponctuelles ou microlésions qui affectent aussi les gènes et qui concernent une portion très limitée du gène affecté (voir figure 2). Elles peuvent être:

Soit une **substitution** quand on assiste à un remplacement d'une base par une autre. Cette substitution peut modifier la nature de l'acide aminé codé et trois cas sont possibles : d'abord on peut avoir une **mutation silencieuse ou synonyme** quand le nouveau codon code pour l'acide aminé et que la protéine synthétisée et son activité ne sont pas modifiées, ensuite une **mutation faux-sens** quand le nouveau codon code pour un acide aminé différent pouvant modifier la protéine synthétisée et son activité (voir la rendre inactive) et enfin une **mutation non-sens** quand le nouveau codon code pour un codon stop, dans ce cas on a une protéine tronquée souvent inactive ;

Soit une **insertion** ou addition quand une nouvelle base s'ajoute à la séquence initiale ;

Et enfin une **délétion** quand, sur la séquence initiale, une paire de base disparait ;

Dans ces deux derniers cas (les insertions comme les délétions), la première conséquence est le décalage du cadre de lecture et on peut se retrouver dans le cas d'une mutation faux-sens ou d'une mutation non-sens.

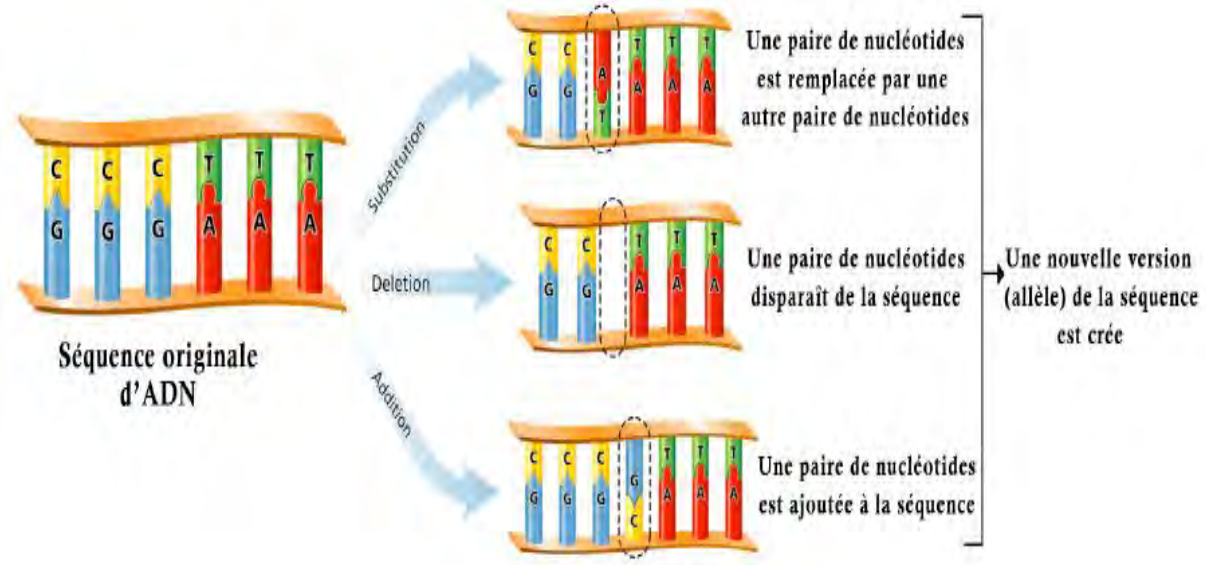


Figure 6 : Les différents types de mutations ponctuelles (http://www.academie-medecine.fr/Upload/tubiana_rapp_cancer_13sept_073.pdf)

I.5 CONSEQUENCES D'UNE MUTATION GENETIQUE

Les mutations sont classées selon leurs conséquences phénotypiques. Elles sont dites dynamiques lorsqu'elles correspondent à l'augmentation du nombre de certains triplets sur

plusieurs générations. Par contre, elles sont dites ponctuelles lorsqu'il s'agit de la modification d'un nucléotide.

Certaines mutations ponctuelles se traduisent par la substitution d'un nucléotide par un autre. Lorsqu'une mutation apparaît dans la séquence codante d'un gène, elle va générer un nouvel allèle. Parfois, à cause de la redondance du code génétique, le nouveau codon code le même acide aminé que le codon original. La séquence protéique n'est donc pas modifiée (on parle alors de mutation synonyme ou silencieuse).

Dans certains cas, les mutations ponctuelles entraînent une modification de l'acide aminé codé (mutation faux-sens). Le changement d'un acide aminé peut avoir des répercussions quant à la fonction de la protéine. Ainsi, une mutation ponctuelle qui provoque le remplacement d'un codon spécifiant un acide aminé donné par un codon stop (mutation non-sens) résulte en la production d'une protéine tronquée. Certaines mutations sont dites, décalantes car l'addition ou la suppression de nucléotides non multiple de trois provoque un changement dans le cadre de lecture (insertions ou délétions).

Donc l'apparition de mutations chez un organisme peut être avantageuse ou fatale. Dans le dernier cas, elles sont à l'origine de plusieurs maladies génétiques dont certaines tumeurs que souffrent aujourd'hui à travers le monde entier de nombreuses personnes. Exemple : les tumeurs malignes du sein: sur les gènes BRCA1 et BRCA2 on trouve plusieurs mutations chez les individus malades (King *et al.*, 2001). Ces mutations désavantageuses sont héréditaires ou non.

Une mutation qui n'engendre pas la mort de la cellule, elle est transmise lors de la division cellulaire aux cellules filles pour donner des clones de cellules mutées. Deux cas peuvent se produire: Premièrement une mutation des cellules somatiques (mutation des cellules de l'ensemble du corps), elle n'a que de conséquence que chez l'organisme porteur de cette mutation. Exemple : le cancer de la peau ou mélanome qui ne concerne que l'individu malade chez qui on voit son état de santé se dégrader quand il y a absence de traitement ou s'améliorer quand il le traite. Et deuxièmement une mutation des cellules germinales (mutation des cellules souches qui peuvent donner les ovules et spermatozoïdes), quant à elle, peut se retrouver portée par la cellule œuf à l'origine d'un nouvel individu. Cette mutation va donc se transmettre de génération en génération dans la société.

Si une mutation dans le génome d'un individu ou d'un organisme de manière générale peut être avantageuse ou désavantageuse, il serait trop dire que Mutation est synonyme du cancer. Mais il existe une étroite relation entre mutation et cancer. (Voir figure)

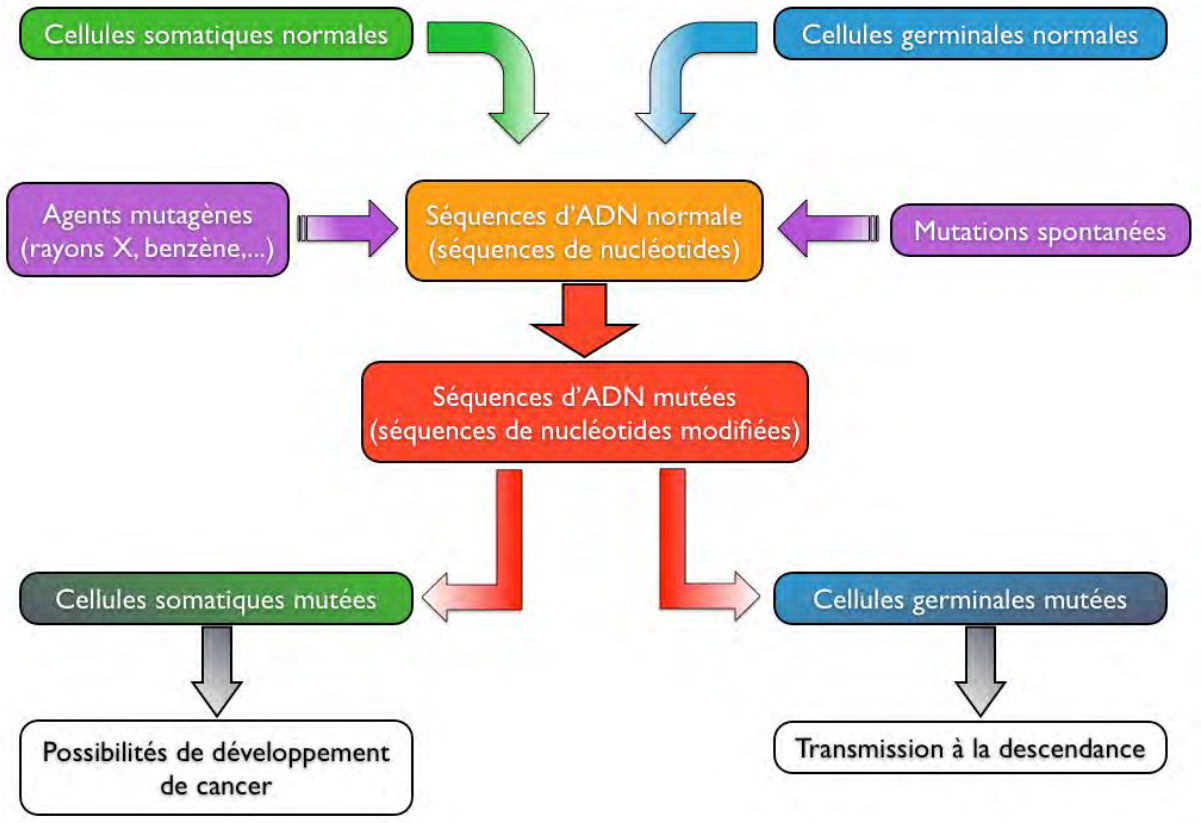


Figure 7: De la mutation génétique au cancer (http://www.academie-medecine.fr/Upload/tubiana_rapp_cancer_13sept_073.pdf

I.6 TYPOLOGIE DES TUMEURS BENIGNES DU SEIN

Selon la classification de l'OMS (1981) on distingue des tumeurs épithéliales des tumeurs mixtes fibro épithéliales et des tumeurs mésenchymateuses. Aujourd'hui d'autres classifications ont permis de définir cette multitude de tumeurs bénignes du sein connue. Parmi les tumeurs bénignes, il y a celles sans relation avec le cancer du sein (gynécomastie, maladie fibreuse) et les mastopathies bénignes pouvant être associées au cancer (Picard, 2003).

I.6.1 LE PAPILLOME

Ce sont des néoplasmes épithéliaux bénins (Picard, 2003), apparaissant sous la forme d'une lésion arborescente (papillaire) qui prolifère à l'intérieur d'un ou de plusieurs galactophores voisins, le plus souvent rétro-aréolaires (Bonnier *et al*., 2005). Il faut distinguer le papillome solitaire rétro-mamelonnaire des papillomes multiples appelés papillomatoses. Ces dernières sont plus petites et plus périphériques, (Deschildre *et al*., 2006) et les patientes atteintes présentent souvent une histoire familiale positive de néoplasie mammaire, et sont plus à risque de développer un cancer du sein (Bodian *et al*., 1993 ; Page *et al*.,1996 ; Boisvert, 2013). Leur architecture est mixte. On peut y noter des remaniements tels que la sclérose et la

métaplasie malpighienne. Une association intracanalaire est possible. A ce papillome multiple est associé un sous-groupe qui est le papillome multiple juvénile, il se rencontre chez des jeunes et a un caractère localisé et unilatéral. L'aspect histologique essentiellement kystique et apocrine papillaire avec des zones d'hyperplasie épithéliale atypique et des foyers nécrose (Sitruk-Ware *et al*., 1987 ; Silbernagl et Despopoulos, 2001). Quant aux premiers, l'architecture papillaire est dominante mais peut être aussi adénomateuse ou massive. On peut y noter des remaniements tels que : la fibrose, la calcification, la métaplasie apocrine, l'infarctus et l'hémorragie.

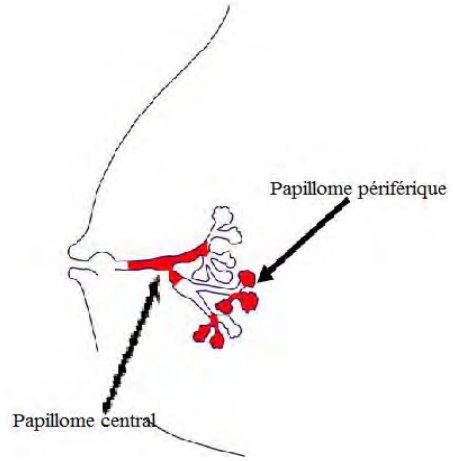


Figure 8: Différents papillomes du sein

I.6.2 L'ADENOME PAPILLAIRE DU MAMELON

Il se voit à tout âge, il est pris souvent pour la maladie de PAGET. Deux stades évolutifs sont possibles : le stade pré érosif (épaississement du mamelon, petit bombement, rougeur) et le stade érosif (lésion pseudo-granulomateuse extériorisée à la surface du mamelon). Il s'agit d'une lésion mixte adénomateuse et papillaire dépassant les parois du canal et infiltrant le stroma mamelonnaire (Bazzochi *et al*., 1986, Sitruk-Ware *et al*., 1987 ; Tavassoli, 1999).

I.6.3 L'ADENOME SYRINGOMATEUX DU MAMELON

Sa genèse est discutée : entre une tumeur des glandes sudorales du mamelon ou une forme fibrosée d'adénome papillaire du mamelon (Trojani, 1988 ; Mones *et al*., 1989 ; Thiam, 2002)

I.6.4 FIBROADENOME

C'est la plus fréquente des tumeurs solides bénignes du sein touchant préférentiellement les jeunes patientes âgées de 20 à 40 ans (Boisvert, 2013). Il est dû à une prolifération mixte canalaire épithéliale et fibroblastique stromale. Le fibroadénome est dépendant de l'imprégnation hormonale et est involutif à la ménopause. Cliniquement, il correspond à un nodule ferme, souple, régulier et mobile (Bonnier *et al*., 2005 ; Chauvet, 2006). On peut distinguer : une forme simple et une forme complexe.

Dans 50 % des cas, il s'agit d'une forme simple et qui n'entraine pas l'augmentation de risque de cancer du sein. L'organisation mondiale de la santé définit cette forme fibroadénome simple comme une tumeur bénigne développée au dépend de la glande mammaire formée d'une prolifération de l'épithélium et du tissu conjonctif (World Health Organization 1981). Elle se situe dans la classification ANDI proposée dans annexe1 comme une simple « variante » ou « aberration » de la normale (voir annexe 1).

Pour les 50 % autres cas, il peut s'agir d'une forme complexe (Guray, 2006), définie par la présence de lésions de type adénose sclérosante, métaplasie apocrine, ectasie canalaire, fibrose floride, etc. Dans ce cas, le risque de cancer semble légèrement augmenté avec un risque relatif estimé aux alentours de 1,02 % (Hartmann, 2005).

NB : D'autres formes particulières d'adénofibromes sont parfois diagnostiquées. Il s'agit d'adénofibrome géant et d'adénifibrome juvénile.

Le fibroadénome géant est une forme particulière de fibroadénome, définie simplement par une taille supérieure à 5 cm de diamètre. Son mécanisme physiopathologique est mal connu, il serait la conséquence d'une réponse locale inadaptée à la stimulation ostrogénique (Greydanus 2006). Le fibroadénome géant augmente de taille rapidement et peut atteindre jusqu'à 10 à 15 cm de diamètre. Il est majoritairement unilatéral, unique. Son aspect peut être parfois inquiétant avec une peau en regard inflammatoire et une dilatation du réseau veineux, du fait même de sa grande taille et de sa croissance rapide.

Le terme de fibroadénome juvénile n'est pas clairement défini. Ashikari (1971) le définit comme « un fibroadénome survenant à l'adolescence, à croissance rapide, de stroma abondant et cellulaire ». Cette définition qui ferait du fibroadénome juvénile un groupe histologique à part n'est pas acceptée unanimement. Il n'y aurait pas d'intérêt à utiliser ce terme, il est préférable de parler de fibroadénome géant de l'adolescente (Hugues *et al*., 2009). Il s'agit d'une forme particulière de fibroadénome survenant chez la très jeune fille (10-18 ans) et pouvant être de taille importante (au-delà de 5 cm).

Figure 9: Fibroadénome du sein (http://www.google.fr/imgres?imgurl)

I.6.5 LA MALADIE FIBRO-KYSTIQUE DU SEIN

Les premières définitions furent données par: Reclus en 1883, Brisaud en 1884, Schimmelbush en 1890 et Konig en 1893. C'est pour cette raison qu'elle a porté le nom de maladie de Reclus ou de Schimmelbusch. Cependant c'est avec Konig que l'éponyme de "mastopathie fibrokystique " fut introduit dans la littérature définissant ainsi un groupe de lésions dues au cercle vicieux des sécrétions et irritations.

C'est la plus fréquente des mastopathies bénignes, elle est également appelée dystrophie fibrokystique. C'est l'affection mammaire la plus commune et qui concerne surtout les femmes avant la ménopause, de 40 à 50 ans, atteintes de dysovulation avec insuffisance lutéale et quasi constamment bénigne (Bonnier *et al*., 2005). Le terme de maladie fibro ou scléro-kystique longtemps employé, apparait en fait mal approprié. Il englobe des lésions à potentiel évolutif très variable, allant de modifications à minima, quasi physiologiques et très répandues, jusqu'à des lésions moins répandues, proliférantes et qui sont de véritables facteurs de risques de cancer.

Les kystes sont très fréquents entre 35 et 50 ans et sont dus à une prolifération épithéliale pouvant être isolés ou plus souvent disséminés dans un ou deux seins (Picard, 2003) et sont des anomalies liquides ou semi-liquides. Sur la mammographie, ils se manifestent par une opacité ronde, ovalaire ou polycyclique à contours réguliers, de densité hydrique (Lucidarme, 2001). Les contours peuvent être masqués par la densité du parenchyme avoisinant et, dans les seins denses, ils sont fréquemment non visibles. Le diagnostic est facile lorsque les parois se calcifient, réalisant des calcifications en coquille d'oeufs (Deschildre *et al*., 2006). L'échographie est cependant nécessaire pour prouver la nature liquidienne de la structure (Boisvert, 2013).

La fibrose est associée à l'involution graiseuse, une fibrose fibrillaire puis hyaline apparaît avec l'âge dans le cas de dégénérescences constantes et paraphysiologiques. Elle peut intéresser le tissu conjonctif interstitiel commun ou le tissu conjonctif spécialisé palléal. Elle s'accompagne variablement d'une élastrose et de la formation de microcalsifications. L'adénose correspond à une hyperplasie des lobules portant sur tout ou une partie de leurs constituants. Il résulte d'une croissance en taille et en nombre des lobules par prolifération des canalicules intralobulaires, des cellules épithéliales et myoépithéliales des acini et ou de tissu conjonctif palléal. Ici on peut parler d'adénose simple ou banale quand les cellules conservent un aspect normal, de métapasie cylindrique et d'adénose sclérosante.

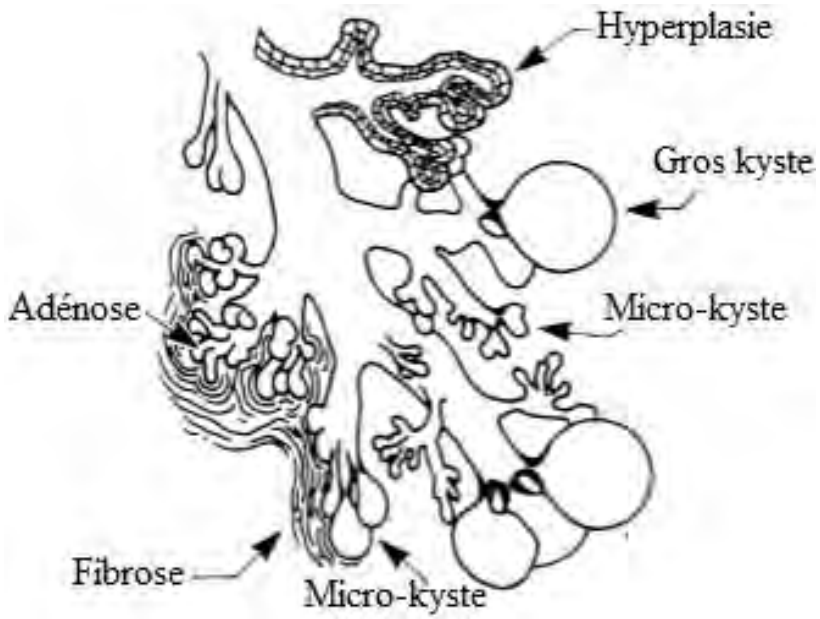


Figure 10: Maladies fibro-kystiques du sein

I.6.6 POLYADENOMATOSE

La polyadénomatose mammaire est une situation rare et pathologique qui correspond à la présence d'au moins 3 fibroadénomes dans un même sein. Le développement des fibroadénomes dans la polyadénomatose mammaire est rapide.

I.6.7 TUMEUR PHYLLODE

Il s'agit d'une tumeur fibro-épithéliale constituée d'une double composante épithéliale et conjonctive. Ce type de tumeurs représente 0,3 % à 0,9 % des tumeurs mammaires chez la femme et 2 à 3 % des tumeurs mammaires fibro-épithéliales (Chauvet, 2006). Pour certains pathologistes, les phyllodes peuvent aussi avoir des formes malignes au départ du tissu conjonctif : les grades II et III (Picard, 2003). Ces tumeurs phyllodes présentent les mêmes caractéristiques mammographiques, échographiques et histologiques que les fibroadénomes. Ce sont des lésions palpables plus profondes et généralement plus volumineuses, ce qui

demande une biopsie. Une exérèse chirurgicale complète est toujours recommandée devant un diagnostic de phyllode en raison d'un potentiel de malignité, avec des métastases rapportées dans 6 à 22% des cas (Boisvert, 2013).

Figure 11: Tumeur phylode du sein

I.6.8 ADENOMES

Ils Sont rares. Ce sont des tumeurs bien délimitées. On note ici l'absence d'hémorragie et de nécrose mais parfois la présence des écoulements. Le diamètre varie de 1 à 4 Cm. Ils sont composés de structures épithéliales bénignes avec un stroma très pauvre contrairement au fibroadénome qui possède une composante stromale. Ils ne sont pas encapsulés. La lésion est constituée de nombreux tubules réguliers ressemblant aux canalicules d'un lobule quiescent (non secrétant). Ils ont été décrits par plusieurs auteurs tels que Gander et Hertel. Ce dernier les a définis depuis 1970. L'âge d'apparition et l'aspect clinique identiques à ceux des fibroadénomes, évoquent souvent une tumeur maligne (Bonnier *et al*., 2005). Et l'imagerie ne permet pas de faire la distinction entre adénome et adénofibrome (Lucidarme, 2001).

I.6.9 HAMARTOME

L'hamartome correspond à une lésion bénigne rare. Il s'agit d'une tumeur cliniquement souple et bien limitée. L'image mammographique typique, retrouvée dans un tiers des cas, correspond à une opacité ronde limitée par un liseré clair traduisant l'expression de "sein dans le sein" (Chauvet, 2006), parfois très volumineuses et pouvant alors déformer le sein (Bonnier et al., 2005).

I.6.10 HYPERPLASIE EPITHELIALE

Hyperplasie épithéliale qui désigne une prolifération non papillaire de l'épithélium peut siéger à tous les niveaux du système galactophore. Elles sont soit du type canalaire encore appelée hyperplasie canalaire simple soit du type lobulaire. Le type canalaire simple est caractérisé par un agencement cellulaire désordonné avec chevauchement des cellules les unes par rapport aux autres. On les classe en fonction du degré de prolifération cellulaire. Ainsi on parle d'hyperplasie épithéliale légère quand la prolifération cellulaire atteint 3à 4 couches,

d'hyperplasie épithéliale modérée quand on atteint 5 à 10 couches et enfin d'hyperplasie épithéliale floride quand la prolifération cellulaire dépasse 10 couches. A côté de ces proliférations épithéliales simples on distingue les lésions d'hyperplasie canalaire et lobulaire atypiques qui présentent certains critères architecturaux des carcinomes canalaires et lobulaire in situ.

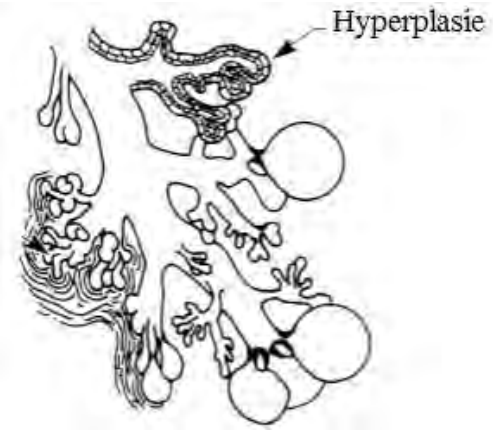


Figure 12: Hyperplasie épithéliale mammaire

I.6.11 MALADIE DE MONDOR

La maladie de Mondor est une thrombophlébite superficielle thoracoépigastrique. La cause est le plus souvent inconnue. L'influence d'une traumatise ou d'un processus inflammatoire a été évoquée.

I.6.12 LES INFLAMMATIONS CHRONIQUES

Encore appelé tuberculose mammaire, cette inflammation chronique est décrite pour la première fois par Sir Astley Cooper en 1829. L'étude histologique conclue à une granulomatose épithéliogigantocellulaire centrée par du caséum.

I.7 EPIDEMIOLOGIE

I.7.1 EPIDEMIOLOGIE DESCRIPTIVE

Les tumeurs du sein sont fréquentes, elles ont une distribution planétaire. Parmi elles, les tumeurs bénignes sont les plus fréquemment rencontrées, leur fréquence varie entre 57 et 70% (Lansac et Lecomte, 1994, Diallo *et al*., 1996 ; Dangou *et al*., 2002). Dans le monde, les tumeurs bénignes du sein sont une importante cause d'hospitalisation dans les pays développés. Vessey et al en 1976 ont signalé un taux d'hospitalisation pour fibroadénome seule de 0,7 pour 1000 par an parmi les femmes âgées de 25 à 29 ans contre 0,4 parmi les femmes de 40 à 44 ans et de 0,2 parmi celles de 45 à 49 ans. Quant à Ory *et al*, la même année ont trouvé un des taux qui augmentent avec l'âge dans le cas des maladies

fibrokystiques (0,7 pour 1000 par an pour les femmes âgées de 25 à 29 ans, et 4 pour 1000 par an chez celles âgées de 40 ans et plus).

La maladie fibrokystique du sein toucherait une femme sur deux entre 45 et 50 ans, mais ne serait confirmée que dans 10 à 20 % des cas (Seror J.-Y.)[2]. Quant à Espie, elle estime qu'une femme sur cinq (1/5) ferait un adénofibrome au cours de sa vie (Espie *et al*., 2002).

En ce qui concerne l'hamartome, son incidence dans la littérature varie de 0,1 à 0,7% de l'ensemble des tumeurs bénignes du sein (Tse *et al*.,2002).

En Afrique certains auteurs ont montré la place qu'occupent les tumeurs bénignes dans les pathologies mammaires bénignes. Ainsi en Guinée Conakry, une étude réalisée dans les services de chirurgie de l'hôpital Ignace Deen a trouvé 63,2 % de tumeurs bénignes du sein et avec un taux des hospitalisations de 0,76 % contre 36,8 % de formes malignes (Diallo et al., 1996). Au Bénin, les tumeurs bénignes du sein représentent 75 % de l'ensemble des tumeurs du sein et le fibroadénome 59 % des tumeurs bénignes (Darboux et al., 1994). Au Mali, une étude réalisée de mai 2001 à juin 2002 sur 91 nodules du sein a trouvé 36 cas de tumeurs bénignes soit 39,6%, 18 tumeurs malignes soit 19,8%, et 37 lésions dystrophiques et inflammatoires soit 43,7 % (Diarra, 2002). Une autre étude réalisée de 1998 à 2003 sur 611 prélèvements de tumeurs du sein a relevé que 186 prélèvenents étaient des tumeurs bénignes, 178 étaient malignes, 247 étaient des lésions dystrophiques et hyperplasiques (Foko, 2004). Au Sénégal en réalité on trouve rarement des études faites sur les tumeurs bénignes. La seule trouvée dans la littérature a été réalisée à l'Institut Joliot Curie Aristide Le Dantec de Dakar du 1er Avril 2010 au 1er Avril 2011. Elle a porté sur 130 patientes toutes soufrant de tumeur bénigne du sein avec la prédominance des adénofibrome (70 % des cas) (Houssaimi, 2012).

I.7.1.1 L'Adénofibrome ou fibroadénome

Le fibroadénome simple est la tumeur bénigne la plus fréquente chez les jeunes filles de moins de 25 ans. Il apparaît en général pendant les premières années après la ménarche. C'est une pathologie très fréquente depuis la période pubertaire jusqu'à la trentaine (30/100 000) avec un pic d'incidence entre 21 et 25 ans. Il est bilatéral dans 10 à 15 % des cas et multiples dans 20% des cas (Seror J.-Y.). Cette pathologie semble plus fréquente dans la population africaine et indienne (Oluwole et Freeman, 1979). Son risque de dégénérescence ou l'association à un cancer est rare (0.1% des FA), certaines régresseraient spontanément, d'autres pouvant se transformer en tumeur phyllode.

[2] J-Y. Seror. Apport de l'imagerie dans la pathologie bénigne du sein. http://www.lesjta.com/author.php?pe_id=307.

I.7.1.2 MALADIE FIROKYSTIQUE

C'est la lésion bénigne du sein la plus courante en touchant une femme su deux entre 45 et 50 ans (OMS, 1978 ; J.Y Seror).

I.7.1.3 TUMEUR PHYLLODE

Elle représente 0.3-4% des tumeurs du sein de la femme. Les ¾ des cas surviennent entre 40 et 50 ans (Bousquet *et al*., 2005) ; mais il n'y a pas d'âge préférentiel. Elle est exceptionnelle avant vingt ans. Elle est rarement associée au cancer. L'âge moyen de survenue se situe entre 35 et 55 ans. La taille moyenne, tous types histologiques confondus, varie selon les series de 4 a 8 cm, avec des extremes allant de 0,8 cm a 40 cm. Le risque de récidive après intervention est fréquent et est de 16-30% dans les trois ans après l'intervention. 6-17% des Tumeurs Phyllodes peuvent dégénérer en sarcome.

I.7.1.4 LIPOME

L'âge moyen d'apparition de cette tumeur bénigne du sein est de 45 ans chez la femme.

I.7.1.5 HAMARTOME

L'hamartome mammaire est une lésion bénigne rare qui peut survenir à tout âge à partir de la puberté. Dans la majorité des cas, il se voit chez la femme âgée de plus de 35 ans, avec des extrêmes allant de 16 à 59 ans (Oueslati *et al*., 2007)

I.7.1.6 PAPILLOME ET PAPILLOMATOSE

L'âge moyen de survenu est de 50-54 ans. Il est soit unique (papillome solitaire) : 70-90% des cas, soit multiple (papillomatose) : 10-30% des cas (Simsir *et al*., 2003 ; Masood *et al*., 2003 ; Plantade *et al*., 2005 ; Mercado *et al*., 2006 ; Liberman *et al*., 2006).

I.7.2 EPIDEMIOLOGIE ANALYTIQUE : LES FACTEURS DE RISQUES

Les facteurs de risque liés aux tumeurs bénignes du sein sont d'une importance capitale dans la compréhension et la définition des stratégies de prévention. L'étiologie des tumeurs bénignes est généralement mal connue, mais il semble que la plupart d'entre elles peuvent être imputables à des causes multiples ou sont associées à de multiples facteurs de risques. De nos jours, un certain nombre de facteurs de risques sont associés à l'étiopathologénie des tumeurs bénignes du sein. La plupart de ces facteurs de risques sont associés soit à l'adénofibrome soit à la maladie fibrokystique soit aux deux. Ainsi on peut trouver :

- Un taux d'incidence le plus élevé est rencontré chez les femmes souffrantes d'adénofibrome entre 35 et 45 ans, mais chez celles souffrantes de maladies fibro-kystiques ce sont les plus jeunes qui présentent un taux le plus élevé comprise 18 et 24 ans (voire annexe 6).

- Une faible parité est associée à un risque accru de maladie fibrokystique pendant les périodes préménopausiques et périménopausiques, mais non au-delà. Hislop *et al* dans une étude prospective en 1990 de même que Kelsey *et al*., en 1974 dans une étude de cas témoins ont prouvé un risque plus élevé chez les nullipares que chez les multipares. D'autres auteurs ont même estimé ce risque relatif. C'est le cas de Hsieh *et al* (1984) qui ont trouvé ce risque égal à 0,5 pour une parité supérieure ou égale à 5 contre une ou deux naissances ; Ory el al (1976) ont constaté que les taux d'hospitalisation normalisés d'âge par 1000 année-femmes est de 5,1 pour les nullipares contre 2,4 pour les femmes avec parité supérieure à 5. Cole *et al* en 1978 ont trouvé un risque relatif de 1,4 pour les femmes ménopausiques entre 49 et 51 ans et 3,0 pour celles ménopausiques après 52 ans.
- Dans le cas d'antécédents familiaux de cancer du sein observé chez la mère ou la sœur, Pastides *et al* (1985) ont trouvé le risque relatif de 2,8 de développer une maladie fibrokystique du sein. Ce même auteur a trouvé un risque de maladie fibrokystique de 1,7 pour chaque augmentation de 5 ans de l'âge à la première naissance parmi des femmes de moins de 45 ans.
- Le niveau socioéconomique fait partie des facteurs de risque à la fois associé à l'adénofibrome (Fleming *et al*., 1982) et à la maladie fibrokystique. Pour l'adénofibrome, Brinton *et al* (1981) ont estimé le risque relatif à 0,82 pour le niveau socioéconomique le plus élevé contre 0,47 pour le niveau socioéconomique le plus bas.
- L'obésité et la prise de poids constituent des facteurs de risque de développement de tumeurs bénignes du sein particulièrement pour l'adénofibrome et la maladie fibrokystique. Mais il faut signaler que l'obésité présente un effet protecteur (Brinton *et al*., 1981 ; Cole *et al*., 1978 ; Soini *et al*., 1981 ; Ravnihar *et al*., 1979 ; Pastides *et al*., 1985 ; Simard *et al*., 1990). L'indice de masse corporelle supérieur à 25 Kg/m^2 divise le risque de développer un adénofibrome par deux quand les cas ont été comparés avec des études de la population ou avec des études biopsiques (Yu *et al*., 1992). Ces mêmes études ont montré que les patientes porteuses de maladie fibrokystique du sein avaient un indice de masse corporelle inférieur. (voir annexe 2).
- Sur l'influence de l'utilisation des contraceptifs oraux sur le risque de tumeur bénigne du sein, cinq études de cas avec témoins sur six et trois études de cohortes ont signalé que l'utilisation de contraceptifs oraux était liée à une nette diminution de risque de tumeurs bénignes du sein. Ce n'est que dans deux des études de cas avec témoins (Ory

et al., 1976 ; Startwell *et al*., 1973) et dans l'étude de cohortes faites à Boston, Ma, Etats-Unis d'Amérique, par Ory et al que cette association a été examinée séparément pour la maladie fibrokystique et pour le fibroadénome. Selon l'une des études des cas avec témoins (Kelsey *et al*., 1974) et l'étude de la cohorte faite à Boston (Ory *et al*., 1976), cette association serait la même pour les deux maladies ; la deuxième étude de cas avec témoins (Kelsey *et al*., 1974) à signalé une association pour la maladie fibrokystique seulement. Une forte relation entre maladie fibrokystique du sein et la durée d'utilisation de contraceptifs oraux a été trouvée dans la plupart des études de cas avec témoins et de cohortes (Pastdes *et al*., 1983 ; Brinton *et al*., 1981 ; Hsieh *et al.,* 1984). Cette relation est plutôt favorable à la diminution de risques de développer une maladie fibrokystique d'autant que la durée d'utilisation de contraceptifs oraux est plus longue, mais elle est beaucoup plus faible quand le contraceptif est utilisé pendant une courte durée. (Voire tableau annexe 3) ces mêmes résultats ont été trouvés dans le cas des adénofibrome du sein, c'est-à-dire, une durée plus longue d'utilisation de contraceptifs oraux possède un effet protecteur contre l'adénofibrome du sein (Brinton *et al*., 1981 ; Canny et al., 1988 ; Ory et al., 1976). D'autres auteurs sont partis jusqu'à confirmer que les contraceptifs oraux peuvent réduire les symptômes des pathologies bénignes du sein. Ce que confirme Hsieh en 1984. Mais le risque de tumeur bénigne du sein parmi les utilisateurs de contraceptifs oraux semble être en relation inverse avec la teneur en progestatifs des préparations utilisées. D'après l'étude faite par le Royal College of Général Practitioners de Londre en Angleterre (Royal College of General Practitioners, 1977), le taux de tumeurs bénignes du sein étaient de 7,2 ; 4,3 et 3,6 pour 1000 années-femme parmi les utilisatrices de contraceptifs oraux contenant 50 µg d'éthinylestradiol et 1 mg, 3 mg et 4 mg d'acétate de noréthistérone respectivement.

Dans le cas de thérapeutique de substitution d'œstrogène, l'exposition prolongée augmente le risque de la maladie fibrokystique du sein. Dans les études de cohortes (Jick et al., 1986 ; Trapido et al., 1984) et de contrôle de cas (Berkowitz et al., 1984 ; Berkowitz et al., 1985 ; Pastides *et al*., 1987) signalent que l'utilisation prolongée de thérapeutique de substitution d'œstrogène double le risque de développer une maladie fibrokystique du sein. D'une part, Jick affirme que la durée d'utilisation de thérapeutique de substitution d'œstrogène a été systématiquement associée à la maladie fibrokystique du sein lorsqu'elle est supérieure à 5 ans avec un risque relatif de 3,7. D'autres étude ont confirmé ce risque accru plus la durée d'utilisation de thérapeutique de substitution est longue chez les femmes en ménopause

(Berkowitz et al., 1984 ; Berkowitz et al., 1985 ; Pastides *et al*., 1987 et Trapido et al., 1984). Ils l'ont estimé à 4,3 pour un traitement qui dure plus de 10 ans. Quant à Prudent et al, ils ont trouvé pour l'adénofibrome un risque relatif de 3,1 chez les femmes âgées de plus de 45 ans pour une utilisation prolongée de thérapeutique de substitution d'œstrogène (Canny *et al*., 1988). D'autres résultats importants sont récapitulés dans le tableau annexe 4.

I.7.3 EPIDEMIOLOGIE INTERVENTIONNELLE (Espié et Tournant. 2001 ; Morvan et Gompel. 2004)

Actuellement le meilleur moyen de contrôler des manifestations locales et générales des tumeurs bénignes du sein est la détection et la prise en charge précoce. Un examen régulier des seins vous permettra de repérer le plus tôt possible tous les changements éventuels. En cas d'une grosseur trouvée, vous devez la faire examiner par un médecin dès que possible. Les méthodes qui sont le plus souvent utilisées dans la détection sont l'autopalpation par la patiente, l'examen clinique par le praticien pour détecter des tumeurs supérieures à 1cm. En plus de ces méthodes il faut ajouter la cytoponction des tumeurs confrontée aux données de l'imagerie par échographie, par mammographie et de l'examen histologique qui représentent les méthodes de référence pour le dépistage des tumeurs bénignes du sein. Chez les patientes jeunes l'autopalpation et l'examen clinique auxquels on associe l'échographie sont conseillés. Par contre, chez les femmes plus âgées, un dépistage régulier est très important car il permettra de détecter tout changement, même mineur, avant que d'autres signes ou symptômes n'apparaissent. Les femmes âgées de 50 à 70 ans sont automatiquement invitées à faire une mammographie tous les trois ans. Si vous avez plus de 70 ans, il est conseillé de continuer à faire une mammographie tous les trois ans. De manière générale, ce schéma ci-dessous pourrait être proposé aux femmes :

- ✓ a partir de 20 ans, une autopalpation des seins tous les mois ;
- ✓ de 20 à 39 ans, un examen clinique du sein par un spécialiste tous les 3 ans;
- ✓ de 50 à 74 ans, faire une mammographie de dépistage tous les deux ans.

Dans certains cas, la mammographie de dépistage doit être associée à des clichés localisés et agrandis. L'analyse de ces clichés doit se faire selon le référentiel BI-RADS de l'American College of Radiology (ACR) qui classe les anomalies radiologiques en six catégories de 0 à 5 (voire table de l'annexe 5). Ce qui permet de déterminer la conduite à tenir devant une image anormale. En cas de facteurs de risque, le dépistage à l'échelon individuel débutera plus tôt. Ainsi les femmes ayant une prédisposition génétique ou porteuses de mutation, doivent être

suivies par surveillance clinique tous les six mois dès l'âge de 20 ans et par mammographie annuelle dès l'âge de 30 ans.

I.8 DIAGNOSTIC DES TUMEURS BENIGNES DU SEIN

I.8.1 DIAGNOSTIC DES LESIONS BENIGNES

Par « Diagnostic » l'on désigne la démarche destinée à identifier la maladie à l'origine d'un symptôme ou d'un signe d'appel clinique qu'il faudra savoir interpréter sans le banaliser car il sera déterminant pour la consultation médicale. (Journées de la SFSPM, 2010).

La gravité des tumeurs, qu'elles soient « bénignes » ou « malignes », n'est pas toujours strictement liée à leur nature histologique. Les tumeurs bénignes sont bien différenciées, grossissent peu, évoluent lentement, envahissent peu ou n'envahissent pas les tissus voisins (Larousse, 2014). Cependant, elles peuvent avoir une évolution plus grave si elles altèrent le fonctionnement d'un organe, si elles sont diagnostiquées tardivement ou encore si leurs situations rendent l'ablation chirurgicale difficile.

C'est seulement quand la tumeur est suffisamment grosse qu'elle devient palpable. La présence de la tumeur est souvent accompagnée de plusieurs symptômes: la peau change d'aspect: peau d'orange, peau rétractée, ridée ou d'allure inflammatoire ; le mamelon peut aussi être déformé, être le siège d'un écoulement de sang, avoir un aspect croûteux ce qui contribuât au diagnostic. Donc la détection tôt de la tumeur bénigne du sein permet une prise en charge précoce réduisant ainsi la gravité de la maladie et d'accroître les chances de guérir le malade. C'est ainsi que son pronostic a changé durant ces 20 dernières années grâce aux diagnostics de plus en plus précoces.

Les approches diagnostiques ont bien évolué pendant ces dernières décennies pour satisfaire la nécessité de détecter des tumeurs bénignes de plus en plus petites. Ce qui permet d'améliorer la prise en charge des femmes souffrantes de tumeurs bénignes du sein. Ce diagnostic repose principalement sur la base des résultats des techniques suivantes: les circonstances de découverte de la tumeur, l'examen clinique (anamnèse, inspection et palpation), la Mammographie, l'Echographie, l'IRM, la Biopsie (ponction à l'aguille fine ; micro-biopsie; macro-biopsie; biopsie chirurgicale) et l'identification par des techniques de la biologie moléculaire des gènes ou de facteurs génétiques responsables de la pathologie.

I.8.2 DIAGNOSTIC CLINIQUE

I.8.2.1 CIRCONSTANCES DE DECOUVERTE DES TUMEURS BENIGNES

La découverte d'une tumeur bénigne du sein est : soit fortuite et dans ce cas la concerné participe à un dépistage ou elle découvre la tumeur hors d'un examen de routine, soit à

travers les symptômes qui peuvent être une douleur ou une sensation d'une masse au niveau du sein ou un écoulement sanglant par un pore mamelonnaire ou prurit… soit lors d'une complication.

I.8.2.2 L'ANAMNESE

Elle vise à déterminer la date de découverte de la masse et les modifications éventuelles qui ont été observées depuis l'apparition de la lésion. On veillera en outre à préciser les antécédents personnels de biopsie ou de cancer du sein de la patiente. Il convient enfin de consigner les facteurs de risque de cancer du sein, mais la présence ou l'absence de tels facteurs ne devrait pas influer sur la décision de pratiquer des examens complémentaires.

I.8.2.3 EXAMEN CLINIQUE

L'examen clinique n'est pas une méthode de dépistage. Il permet cependant de déceler une tumeur de l'ordre du centimètre dans un sein de volume moyen et de prescrire des examens complémentaires en cas d'anomalie suspecte.

I.8.2.4 L'EXAMEN PHYSIQUE : L'INSPECTION ET LA PALPATION

Ils ont pour objet de rechercher les signes qui permettent de différencier les masses malignes des tumeurs bénignes.

Cet autoexamen des seins est pratiqué par la femme elle-même. La palpation en particulier se fait à l'aide des doigts, soit de façon systématique en les déplaçant de haut en bas et de l'extérieur vers l'intérieur, soit en cercles concentriques autour du mamelon, soit en rayons convergeant vers le mamelon. La suspecte de masse fait appel à des investigations complémentaires. Le choix de la prochaine étape (mammographie, échographie ou ponction à l'aiguille fine, IRM) sera fonction de l'âge de la femme, de la nature de la masse, de la disponibilité et de la fiabilité des techniques diagnostiques à l'échelle locale et de la préférence du médecin.

I.8.2.5 EXAMENS COMPLEMENTAIRES

I.8.2.5.1 EXAMENS D'IMAGERIE

I.8.2.5.1.1 LA MAMMOGRAPHIE

Une mammographie est un examen radiologique des seins. **La mammographie diagnostique** est réalisée lorsqu'une anomalie dans le sein (douleur, écoulement du mamelon, rougeur de la peau, palpation d'une "boule" dans le sein, etc…) a été découverte par la patiente ou par son médecin traitant. Elle permet d'obtenir des images sur un film photographique de l'intérieur du sein à l'aide de rayons X et de détecter une éventuelle anomalie. Il est basé sur l'absorption

différentielle des rayons X par les divers constituants du sein (le tissu adipeux, le tissu fibroglandulaire, le tissu tumoral, les calcifications, ….).

La mammographie conventionnelle est la seule méthode de diagnostic qui ait été sérieusement évaluée dans le diagnostic des lésions mammaires. Cette mammographie a connu une évolution avec d'autres techniques alternatives et complémentaires essentiellement pour leur apport dans le diagnostic du sein (mammographie numérique). Elle permet de révéler des lésions de très petite taille (à partir de quelques millimètres) et souvent de déceler des lésions occultes à l'examen clinique. Mais elle ne donne aucune information sur la nature solide ou liquide de la tumeur (Bonafos et Le Canelier, 1971).

Chez les femmes plus jeunes, le tissu mammaire est généralement plus dense à la mammographie, et le cliché ne fournira vraisemblablement pas de renseignements utiles.

De nombreuses lésions bénignes sont détectées par la mammographie et peuvent être difficiles à différentier d'un cancer du sein. Afin d'éviter un grand nombre d'interventions chirurgicales inutiles, diverses techniques à côté de la mammographie diagnostique sont utilisées: l'échographie, la ponction à l'aiguille fine, la micro et la macrobiopsie.

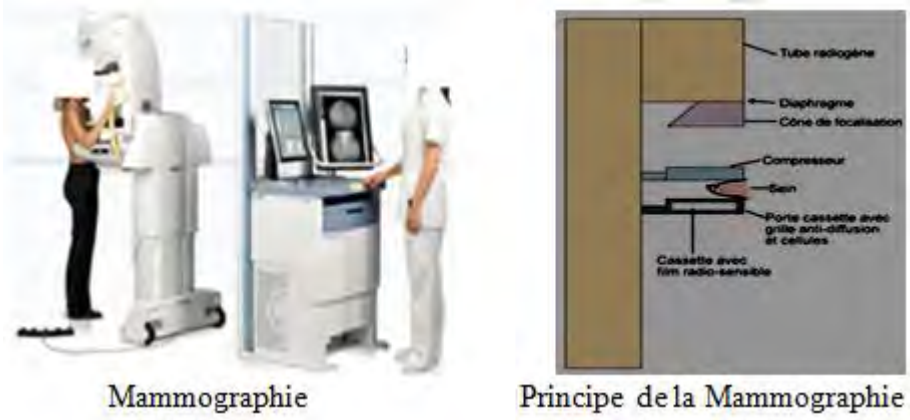


Figure 13: Mammographie et son principe

I.8.2.5.1.2 ECHOGRAPHIE

C'est un moyen de diagnostique très performant à condition que la méthodologie d'examen soit rigoureuse et qu'on utilise un appareillage adapté. Capable de faire le diagnostic initial des lésions mammaires du sein, elle est très utile pour investir la nature liquide ou solide des nodules palpées ou découverte par la mammographie. Elle permet de confirmer l'existence d'une lésion solide correspondant à une lésion bénigne (contenu homogène, sans transmission accrue des ultrasons et si elle est plus large que haute) ou maligne (contour irrégulier et étoilé, un rebord épais, une transmission accrue des ultrasons et si elle est plus haute que large). Elle

permet une meilleure définition dans les seins denses des femmes jeunes et les lésions du prolongement axillaire (Classe et Deschamps, 2007).

Figure 14: La salle d'échographie

I.8.2.5.1.3 IRM (Imagerie par Résonance Magnétique)

L'IRM est la technique la plus sensible pour la détection de tumeurs du sein. Elle permet de montrer toutes les lésions inflammatoires et vascularisées et d'améliorer la localisation de la tumeur détectée par les autres techniques de diagnostic. Cette technologie peut donc apporter des informations complémentaires à l'examen clinique, la mammographie et l'échographie. Ces informations supplémentaires sont susceptibles d'influencer les décisions thérapeutiques.
Mais l'IRM est peu spécifique pour le diagnostic des tumeurs du sein. Elle a surtout sa place dans le diagnostic des récidives locales, la surveillance d'une tumeur ainsi que la surveillance des seins porteurs de prothèses en silicone.
L'utilisation de l'imagerie par IRM en préopératoire dans les tumeurs du sein semble avoir augmenté probablement la mise en évidence d'autres images suspectes dans le sein
Depuis son apparition dans les années 1980, cette technologie n'a pas cessé de se sophistiquer grâce à l'augmentation de la puissance en Tesla.

Figure 15: Les différents types d'IRM utilisés dans le diagnostic du cancer

I.8.2.5.1.4 GALACTOGRAPHIE

C'est l'opacification du galactophore par un produit iodé. Elle est indiquée devant tout écoulement uni-orificiel spontané ou provoqué. L'intérêt essentiel de la galactographie est le repérage pré chirurgical du secteur drainé par le galactophore dans sa topographie et son étendue.

I.8.2.5.2 EXAMENS ANATOMOPATHOLOGIQUES

I.8.2.5.2.1 A PARTIR DES PRELEVEMENTS DE LA BIOPSIE

Le recours à la biopsie permet une étude histologique de la tumeur avant la chirurgie. C'est l'examen en laboratoire d'un échantillon de la tumeur prélevé lors d'une biopsie. Cet examen de laboratoire confirmera le diagnostic de la tumeur du sein et fournira davantage d'informations sur ses caractéristiques. La biopsie est effectuée manuellement par le médecin au moyen d'une aiguille, souvent à l'aide d'une échographie pour guider l'aiguille dans la tumeur. Lorsque l'aiguille est introduite dans la tumeur, un échantillon est prélevé.

Selon le type d'aiguille utilisée, on réalise soit une microbiopsie soit une macrobiopsie. Les macrobiopsies réalisées avec un système d'aspiration par le vide tel que le Mammotome présente de nombreux avantages par rapport aux microbiopsies avec une aiguille tru-cut ou au pistolet automatique.

Aujourd'hui, avec la table stéréotaxique, on assiste à une amélioration de la prise en charge des patientes, tant du point de vue du diagnostic que du confort. Avant l'apparition de cette table stéréotaxique, les micro et macrobiopsies étaient réalisées le plus souvent sur une table d'examen ou une chaise. La patiente se couche sur le côté ou elle est en position assise. Les lésions étaient parfois très difficiles à cibler et, en position assise, les malaises vagaux n'étaient pas rares…

Figure 16: Matériels et micro et macrobiopsies pour l'examen anatomopathologique (http://www.chu-besancon.fr/3c/Ksein_4fev09.pdf)

I.8.2.5.2.2 A PARTIR DES PRELEVEMENTS DE LA CYTOPONCTION

Elle peut être effectuée pour confirmer le diagnostic si un doute persiste**.** Elle consiste en un prélèvement à l'aiguille d'une tumeur palpable ou d'un prélèvement sous contrôle échographique d'une lésion infraclinique à l'aide d'une aiguille fine de 23 Gauge (G) (Body *et al*., 2005). **La microbiopsie**, examen souvent douloureux et très anxiogène chez la très jeune femme, n'est pas nécessaire dans la plupart des cas.

I.8.2.5.2.3 APPORT DE LA GENETIQUE DANS LE DIAGNOSTIC DES TUMEURS DU SEIN

Le processus mutation-sélection propre à notre évolution étant celui qui régit les cancers et que l'instabilité génétique tumorale conduisant à une grande diversité (Bernard *et al*., 2013), la génétique des populations se propose d'abord d'évaluer l'importance de cette diversité génétique. Au-delà de cette estimation, elle se propose aussi de dégager des lois permettant de rendre compte du maintien ou de l'évolution dans le temps et dans le microenvironnement tumoral de cette diversité génétique. Si l'évolution des tumeurs est, en dernière analyse, celle de leur patrimoine génétique, la génétique des populations apparaît alors comme le noyau dur obligatoire de toute théorie de l'évolution. Les différences génétiques entre cellule saine et tumorale, autrement dit le polymorphisme génétique des tissus, sont alors conçues comme un patrimoine, un capital adaptatif, un gage de survie de la cellule aux variations du microenvironnement tumoral selon le principe darwinien de la «survie du plus apte»; ce qui suppose évidemment l'existence préalable de telles différences génétiques entre les cellules. Par ailleurs le développement des tumeurs implique l'accumulation de diverses altérations génétiques qui sont présentes à la fois dans le génome nucléaire, ainsi que dans le génome mitochondrial (Preston-Martin et al. 1990).

Pour les pathologies mammaires, l'apport de l'étude génétique dans le diagnostic est d'une importance capitale dans la détection de ces pathologies au stade précoce. Au début, les études étaient orientées vers les tumeurs malignes du sein. C'est pourquoi, les méthodes utilisées dans l'identification et la localisation des gènes impliqués dans le cancer du sein, sont les mêmes que celles qu'on utilise dans la recherches de pathologies mammaires bénignes. Elles sont diverses. Dans l'historique des recherches sur le cancer, les études de liaison génétique ont permis, dans un premier temps, de localiser les gènes impliqués par la méthode des Lod scores (Morton, 1955). Cette approche statistique est basée sur la coségrégation de gènes selon leur position sur un chromosome. Si deux locus sont proches sur le génome, l'haplotype constitué d'un allèle de chacun des locus situés sur le même

chromosome se transmet comme un seul gène. Mais, si les locus sont éloignés ou situés sur deux chromosomes différents, on observera une ségrégation indépendante des allèles. Donc, le pourcentage de recombinaison entre les deux locus, noté θ, est fonction de la distance entre les deux locus. Les analyses de liaison nous permettent donc d'étudier la coségrégation de marqueurs génétiques avec le gène que nous supposons être responsable de la maladie (de localisation inconnue) dans un échantillon de population. Ce qui permet de comparer les hypothèses d'absence de liaison ($\theta = 0,5$) et d'existence d'une liaison ($\theta < 0,5$) en calculant le logarithme à base dix du rapport des probabilités des observations sous chacune des deux hypothèses. Si cette quantité, le Lod score, est supérieure à 3, on conclut alors à l'existence d'une liaison. Même Risch en 1992 a expliqué les raisons de ce seuil très conservateur dans une revue sur la méthode des Lod scores.

Les analyses de liaison permettent également de mettre en évidence l'hétérogénéité génétique, c'est-à- dire l'existence de différents locus responsables de la prédisposition héréditaire. C'est de cette manière qu'Easton (Easton *et al*., 1993) a mis en évidence une hétérogénéité génétique dans la prédisposition du cancer du sein et de l'ovaire sur BRCA1. Ce qui a été confirmé par la suite par Wooster (Wooster *et al*., 1994) avec le gène BRCA2. Ils sont parvenus aussi, à partir des données du Breast Cancer Linkage Consortium, à évaluer les proportions de l'hétérogénéité de chacun de ces loci des familles et à émettre hypothèse de l'existence d'une troisième d'un locus pouvant lui-même être hétérogène et noté souvent BRCAX jusqu'à présent non identifié. Cette hypothèse peut servir à identifier et localiser d'autres gènes impliqués dans le cancer du sein et d'envisager de nouvelles approches, plus directes, pour l'étude des prédispositions génétiques de ce cancer.

On peut aussi essayer d'obtenir de meilleures estimations de la fréquence génique et la pénétrance associée aux gènes responsables, mais aussi tenter de mettre en évidence une éventuelle interaction avec des facteurs environnementaux ou d'autres facteurs génétiques. Ces paramètres sont cruciaux non seulement en conseil génétique mais aussi pour proposer un modèle général englobant l'ensemble des facteurs génétiques impliqués dans les tumeurs du sein, ce qui permet notamment de savoir si ces loci sont impliqués ou non dans l'intégralité de l'excès de risque familial. C'est dans cette optique qu'Easton (Easton *et al*., 1995) a estimé, à partir des données de liaison génétique, la pénétrance des mutations de BRCA1 et a mis en évidence une hétérogénéité allélique.

I.9 TRAITEMENT

L'objectif primaire du traitement est de guérir la patiente mais à défaut de cela on fait recours à un traitement palliatif. Le traitement des tumeurs bénignes comporte un certain nombre de soins médicaux destinés à combattre la maladie pour en limiter les conséquences, rétablir la santé et entraîner la guérison. Elle a pour but de permettre la résorption ou la stabilisation des tuméfacions et nodules palpables, de corriger le déséquilibre hormonal et prévenir l'apparition de nouvelles lésions et de contrôler des résultats fonctionnels et esthétiques.

I.9.1 CHIRURGIE

Dans son livre *"L'empereur de toutes les Maladies",* Siddhartha Mukherjee (2013) nous souligne, que, « *L'Anatomie morbide* de Matthew Baillie "*Si la bile noire n'existait pas, comme il l'avait découvert, une opération pouvait effectivement débarrasser le corps de la maladie*" », il a posé les bases intellectuelles de l'extraction chirurgicale de tumeurs. Et ce n'est qu'en 1869 que Joseph Lister avait commencé à retirer les tumeurs de ses patientes.

Deux découvertes importantes donnèrent un nouvel élan à cette discipline: tout d'abord la découverte de l'anesthésie par William Morton en 1846, et la seconde celle de Joseph Lister l'antisepsie en 1867 (Mukherjee, 2013). Les chirurgiens eurent le courage d'opérer les malades car la souffrance qu'enduraient les patientes sur les tables d'opération disparurent et les risques d'infections après l'opération chutèrent fortement. Ce qui augmentait la chance des chirurgiens de réussir l'opération et prolongeait la vie des patients.

La chirurgie, demeurant la technique la plus ancienne dans le traitement de la pathologie du sein, son objectif est d'établir un diagnostic histologique, un pronostic et un projet thérapeutique mais aussi d'assurer le contrôle de la maladie.

Dans le cas du traitement des tumeurs bénignes du sein, lorsqu'elle est jugée nécessaire, il faut alors relever deux défis à priori contradictoires : en premier, réaliser une exérèse complète de la lésion de manière à éviter la récidive et à obtenir une analyse anatomopathologique de tout le tissu tumoral, et en second réaliser un geste le plus discret possible de manière à ne pas abîmer le sein par une exérèse trop large ou par une cicatrice disgracieuse.

I.9.1.1 L'EXERESE DU NODULE

Cette opération commence par un repérage des contours de la lésion palpable et de la position de l'incision en utilisant le plus souvent le crayon dermique. Il s'en suit successivement une incision jusqu'à la graisse, une traction avec crochet de Gillies, un décollement, une incision des crêtes de Duret, la dissection soustraction et ablation de la tumeur, une fermeture sous-

cutanée et drainage par voie mammelonnaire pour terminer par la pose de Stéri-StripT pour une bonne cicatrisation sans traction.

I.9.1.2 LA MASTECTOMIE PARTIELLE

Elle emporte la tumeur en totalité avec des berges macroscopiquement saines et le cas échéant avec des recoupes glandulaires. L'exérèse est réalisée sur toute l'épaisseur du tissu mammaire jusqu'au plan musculaire.

I.9.1.3 LA MASTECTOMIE TOTALE

Aujourd'hui elle est réalisée sous la forme de mastectomies sous-cutanées. Elle enlève tout le parenchyme glandulaire, respecte ou non le tissu cellulo-graisseux sous dermique tout en conservant la peau, l'aréole et son mamelon. Après qu'une reconstruction est réalisée dans le même temps opératoire ou à distance en cas d'une menaces de nécrose du mamelon ou de la peau.

I.9.2 L'HORMONOTHERAPIE

Lorsqu'en 1896, sir Thomas Beatson réalisait les premières ovariectomies et montra l'effet de la suppression ovarienne sur des cancers du sein inopérables, il venait de créer une nouvelle approche thérapeutique des tumeurs du sein : l'hormonothérapie.

L'hormonothérapie concerne l'utilisation d'hormones dans le traitement des tumeurs. Ce traitement consiste à administrer des molécules ayant une action anti-oestrogénique (Delozier, 2010). Elles bloquent ces récepteurs œstrogéniques et empêchent alors la tumeur de se développer (O.M.S, 2008).

Les progestatifs de synthèse, utilisés seuls, peuvent donner des résultats à de degrés variables mais sont souvent peu efficaces à long terme et mal tolérés du fait de leurs effets secondaires.

Donnés du 5ème au 25ème jour du cycle menstruel, ils entrainent un blocage de l'ovulation et une mise au repos ovarien. Egalement les progestérones en application cutanée ont une anti-œdémateuse. Leurs effets sont cependant inférieurs à ceux des progestatifs de synthèse oraux.

Les analogues des LH-RH peuvent avoir un effet remarquable sur la symptomatologie mais ce traitement ne doit être prescrit qu'à titre exceptionnel pour de courtes durées allant de 3 à 6 mois dans les formes très sévères, rebelles aux autres traitements ou encore lors d'une contre-indication aux hormones stéroïdiennes.

Le traitement local utilise la progestérone percutanée (Progestogel) par contre le traitement général.

Il existe un type d'hormonothérapie prescrite : les anti-œstrogènes (Tamoxifène) qui sont efficace dans 70 % à 95 % des cas à la posologie de 10 à 20 mg/jour par inhibition de la lésion

de l'œstradiol sur son récepteur avec diminution de la prolifération cellulaire. Cependant il existe un effet clomid-like hypothalamique avec augmentation de la FSH, entrainant un taux d'œstradiol plasmique élevé source d'hyperplasie de l'endomètre et de la constitution de Kyste ovarien fonctionnel.

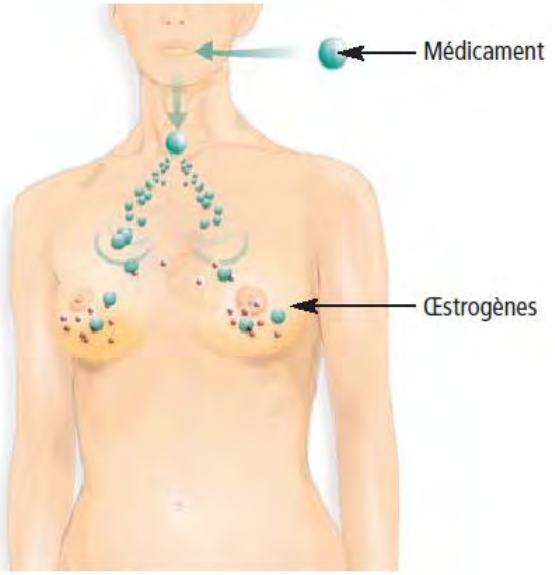


Figure 17: Hormonothérapie (http://lecancerdusein.canalblog.com/archives/2013/01/08/26099159.html)

I.9.3 MOYENS NOS MEDICAMENTEUX

Ce type de traitement comporte des règles hygiéno-diététiques (sport, consommation d'huile d'orange) et psychothérapie reposant sur la relation médecin-malade devant ces patientes souvent anxieuses.

I.9.4 QUELQUES INDICATIONS SUR LE TRAITEMENT DE TUMEURS BENIGNES

I.9.4.1 LE FIBROADENOME

Il n'y a pas de traitement médical efficace démontré. Une régression spontanée est observée dans environ 31 % des fibroadénomes (Jayasinghe2009).

Une décision d'exérèse chirurgicale pourra être prise soit d'emblée pour des tumeurs de taille supérieure à 3 cm, soit ultérieurement lors d'une modification clinique, soit après augmentation de taille du nodule soit à l'apparition ou l'augmentation du caractère douloureux. L'âge influence aussi le choix du traitement. Ainsi :

- avant 30 ans, la surveillance radio clinique est conseillée afin de ne pas multiopérer le sein en cas de récidive. Une ponction cytologique peut être réalisée.
- ailleurs l'exérèse chirurgicale est de règle sauf si l'on dispose d'une cytologie ou d'une biopsie sous anesthésie locale affirmant le fibroadénome.

Le traitement progestatif est aussi utilisé dans le cas des adénofibromes récents du fait de son efficacité sur l'œdème interstitiel et hyperplasie épithéliale. Mais dans le cas des adénifibromes anciens le traitement progestatif a un effet stabilisant.

D'après le Dr Edouard Poncelet le traitement par ultrasons est très prometteur. Il s'agit d'un traitement guidé par imagerie dont le but est de détruire le fibroadénome grâce à des ultrasons focalisés de haute énergie qui "chauffent" la tumeur à une température d'environ 70 degrés pour la nécroser[3].

I.9.4.2 TUMEUR PHYLLODE DU SEIN

Le traitement des tumeurs phyllodes est généralement chirurgical, de l'excision large à la mastectomie totale (Belkacémi *et al*., 2008). Pendant les années 1970, la chirurgie radicale était le traitement chirurgical standard pour tous les types de tumeur phyllode, quelle que soit la taille tumorale. Mais cela n'offrait pas plus d'avantages sur la survie des patientes, car les récidives locales ne semblaient pas être liées à la propagation de la maladie systémique. C'est pour cela qu'aujourd'hui, une approche chirurgicale conservatrice a été adoptée (Parker *et al*., 2001 ; Benhassouna *et al* ., 2006). Les traitements adjuvants ont peu d'intérêt. Le taux de récidive est inversement proportionnel à la taille de la marge de sécurité enlevée autour de la tumeur. Le pronostic reste discuté, les récidives sont assez fréquentes après tumorectomie simple. Une récidive locorégionale ou métastatique peut survenir en fonction du grade histologique tumoral. Les traitements complémentaires (radiothérapie, chimiothérapie) sont utilisés en recours mais n'ont pas fait la preuve de leur efficacité.

I.9.4.3 LIPOME ET HARMATOME

Il n'existe pas de traitement sauf si la patiente est gênée en cas de topographie ou de volume particulier. Dans ces cas une exérèse peut être préconisée.

I.9.4.4 PAPILLOME

L'exérèse chirurgicale est systématique pour éliminer un cancer dont le tableau est le même.

I.9.4.5 MASTODYNIE

Ces traitements sont souvent proposé dans le cas de mastodynie : Psychothérapie, l'ATG, les Anti-inflammatoires, le Tamoxifène, local ou général.

[3] http://www.parismatch.com/Actu/Sante/Tumeur-benigne-du-sein-les-ultrasons-prometteurs-161244 (25/09/15)

I.9.4.6 AUTRES TRAITEMENTS

En cas de tumeurs bénignes du sein, on peut utiliser les antibiotiques, les antalgiques et les anti-inflammatoires. Ces derniers peuvent être utilisés en cas de poussée inflammatoire locale.l'aplication de cataplasme d'antiphlogistine à titre local peut rendre de réels services.

I.10 HISTORIQUE DE L'IMPLICATION DE LA COMPOSANTE GENETIQUE ET EPIGENETIQUE DANS LES PATOLOGIES DU SEIN

Il n'est pas facile de définir qui, le premier, a suggéré que le cancer pouvait être une maladie génétique.

Si pendant des décennies l'idée que le cancer est une fatalité prévaut, il faudra attendre ces dernières années pour porter l'attention sur le rôle que peut jouer la prédisposition génétique dans certaines formes de cancer.

S'agit-il de Broca qui, dès 1866 (Broca, 1866), décrivait une famille ayant une agrégation anormale de cancers? Ou bien de Boveri qui, en 1914, décrivait des anomalies caryotypiques dans des cellules tumorales d'oursin (Boveri, 1914)? Qui est donc le père de cette hypothèse de prédisposition génétique de certaines formes de cancer ? Cette hypothèse booste l'attention des chercheurs et oriente les recherches vers "la prédisposition génétique dans certaines formes de cancer".

La découverte d'anomalies chromosomiques récurrentes associées à des hémopathies malignes (chromosome Philadelphie dans la leucémie myéloïde chronique) suggérait que des anomalies génétiques pouvaient être associées à la transformation cellulaire (Nowell *et al.,* 1960). La découverte ultérieure que ces remaniements génétiques impliquaient des oncogènes cellulaires confirme cette hypothèse.

La caractérisation d'oncogènes mutés dans des tumeurs solides en 1982 a été à la base de tout le développement de la biologie moléculaire des cancers.

Le clonage du premier gène suppresseur de tumeur en 1986 (Friend *et al.,* 1986) et la caractérisation des mutations germinales de ce gène dans les familles atteintes de rétinoblastome ont permis de confirmer les bases de l'hérédité de certains cancers proposée par Knudson dès 1971 (Knudson, 1971).

Même jusqu'au début des années 80, les causes du cancer étaient largement liées aux facteurs environnementaux (Doll *et al*., 1981 ; Peto *et al*., 2001). Mais c'est à cette période que, suite à des travaux de recherches soutenant de plus en plus cette hypothèse de Knudson, que marque le début de l'orientation des axes de recherches dans l'importance du rôle de la prédisposition

génétique dans les cancers. Il faut attendre le début des années 1990 pour mettre fin aux doutes sur la contribution de la composante génétique dans la sensibilité aux cancers par les travaux de Hall (Hall *et al*., 1990) démontrant la liaison génétique dans des familles atteintes de cancer du sein.

Entre 1989 et 1999 une autre étude réunissant médecins, ingénieurs et chercheurs de l'Institut Curie en France marque un nouveau pas dans la recherche sur le cancer en allant trouver le moyen de distinguer les patientes à faible et à fort risque métastatique, en ne s'intéressant qu'au matériel génétique des cellules tumorales. Chez 168 patientes porteuses de cancers du sein en majorité de type luminal, de taille inférieure à 3 cm, sans envahissement ganglionnaire, diagnostiquées, deux groupes de patientes ont ainsi pu être définis selon la nature des profils et le nombre d'altérations génétiques survenant dans leurs tumeurs du sein : un à bon pronostic et un à mauvais pronostic (Institut Curie, 2011).

L'implication des facteurs génétiques dans le cancer est devenue incontestable mais elle peine parfois à expliquer la diversité de ces cancers.

La génétique des populations qui se propose d'abord d'évaluer l'importance de la diversité génétique et enfin de dégager des lois permettant de rendre compte du maintien ou de l'évolution dans le temps et dans le microenvironnement tumoral cette diversité génétique part toujours du postulat que l'évolution des tumeurs est en dernière analyse celle de leur patrimoine génétique. Elle apparaît alors comme le noyau dur obligatoire de toute théorie de l'évolution. Les différences génétiques entre cellule saine et tumorale, autrement dit le polymorphisme génétique des tissus, sont alors conçues comme un patrimoine, un capital adaptatif, un gage de survie de la cellule aux variations du microenvironnement tumoral selon le principe darwinien de la «survie du plus apte»; ce qui suppose évidemment l'existence préalable de telles différences génétiques entre les cellules. Par ailleurs le développement des tumeurs implique l'accumulation de diverses altérations génétiques, qui sont présentes à la fois dans le génome nucléaire, ainsi que dans le génome mitochondrial (Preston-Martin *et al*., 1990).

Les facteurs épigénétiques sont de plus en plus impliqués dans la cancérogenèse. Ils « marquent » l'activation ou la désactivation de certains gènes dans la cellule. C'est grâce à eux, si, à partir d'un même capital génétique, les cellules acquièrent des spécificités. Ces facteurs peuvent être des modifications chimiques sur l'ADN et les protéines qui lui sont associées (les histones), ou des perturbations de l'organisation de l'ADN au cœur de la cellule. En 2009,

l'équipe de Geneviève Almouzni[4], qui étudiait l'implication et la nature de ces facteurs épigénétiques dans les cancers du sein, a découvert un nouveau marqueur pronostique de l'évolution des cancers du sein, et probablement d'autres cancers : la protéine HP1α. Plus cette protéine est présente en quantité dans les tumeurs du sein, plus le risque de développer rapidement des métastases est élevé. Ce marqueur pronostique semble significativement important que les marqueurs actuellement utilisés (Institut Curie, 2011)

[4] http://www2.cnrs.fr/presse/communique/1612.htm

NOTRE ETUDE

CHAPITRE II:

IMPLICATION DES MUTATIONS GENETIQUES DES GENES CYTOCHROME B ET DE LA D-LOOP DANS LA DIVERSITE ET L'EVOLUTION DES TUMEURS BENIGNES DU SEIN.

L'un des plus grands défis dans le diagnostic et la prévention de pathologies du sein est la détection précoce.

C'est dans ce cadre que s'inscrit l'approche de la génétique des populations qui peut s'avérer très utile dans une pareille étude des tumeurs bénignes du sein. Grâce à ces multiples outils d'analyse, la génétique des populations permet entre autres d'identifier des variantes affichant un niveau de différenciation génétique inhabituel entre les populations humaines et de déterminer dans quelle mesure les différents processus d'ordre génomique, démographique et sélectif ainsi que des forces socio-culturelles, interviennent dans l'initiation des profils tumoraux observés. Elle peut permettre aussi de mieux comprendre l'évolution d'une mutation conférant un plus grand risque de développer une tumeur bénigne du sein et celles impliquées dans un développement vers le cancer ou encore celles occasionnant la résistance à ces différentes pathologies, tout en complétant les approches cliniques et épidémiologiques dans la recherche de gènes et de polymorphismes impliqués dans ces affections humaines.

Notre compréhension du développement de ces tumeurs et l'identification des altérations génétiques dans le *Cyt-b* et la *D-Loop* dans la diversité et l'évolution de ces tumeurs bénignes du sein chez les femmes sénégalaises permettra de diagnostiquer sans ambiguïté ces pathologies mammaires bénignes.

Le choix de ces deux marqueurs repose sur les faits que:

Le *Cyt-b*, situé au niveau des positions 14201 et 15 341 dans la séquence humaine (Anderson, 1981**),** il a un faible taux de recombinaison (par rapport à la transmission maternelle seulement) et sa variabilité est relativement élevée bien qu'il soit une séquence codante ;

Et pour la *D-Loop*, il est le principal site de contrôle de la réplication de l'ADN mitochondrial et de sa transcription (Suzuki *et al*., 2003). Deux régions hypervariables sont trouvées sur ce gène (HV1 : 16024-16383 et HV2 : 57-333) (Klemba *et al*., 2010) et parmi les modifications signalées dans la littérature au cours de ces dernières années, la D310, zone située entre les nucléotides 303 et 315 et interrompue par un T en position 310, a été fréquemment étudiée dans des échantillons tumoraux du sein (Parrella *et al*., 2003 ; Aral *et al*., 2006 ; Santos-Jr *et al*., 2012 ; Xu *et al*., 2012) avec environ 42,18% des cas cette région mutait (Santos-Jr *et al*., 2012).

Ainsi, en vue de mieux comprendre l'implication des mutations du *Cyt-b* et de la *D-Loop* dans la diversité et l'évolution génétique des tumeurs bénignes du sein chez la femme sénégalaise, ce travail a pour objectifs spécifiques d'évaluer:

- L'implication des mutations du *Cyt-b* dans l'évolution des tumeurs bénignes du sein chez les femmes sénégalaises.
- L'impact de la diversité et de l'évolution génétique de la *D-Loop* dans les tumeurs bénignes chez les femmes sénégalaises.

Ce deuxième chapitre du travail est organisé en trois parties. D'abord nous nous sommes proposés de décrire les matériels et la méthode utilisés ensuit de présenter les résultats de l'évaluation de l'implication des mutations du *Cyt-b* dans l'évolution des tumeurs bénignes du sein chez les femmes sénégalaises qui serons discutés pour enfin terminer par ceux de l'estimation de l'impact de la diversité et de l'évolution génétique de la *D-Loop* dans les tumeurs bénignes chez les femmes sénégalaises.

II.1 MATERIELS ET METHODE

La stratégie de recherche que nous avons adoptée est basée sur une méthodologie. Ce dernier étant l'application de connaissances, de compétences et surtout la métrise des outils et de techniques à utiliser pour la réalisation des activités définies pour ce thème de recherche afin de satisfaire les exigences, nécessite le management efficace des processus. En d'autres termes, un ensemble d'actions et d'activités en relation les unes avec les autres, à mener à bien pour aboutir a des résultats. Pour ce faire, nous avons utilisé du matériel.

II.1.1 MATERIELS

Trois types de matériels ont été utilisés :

- ✓ d'abord, du matériel biologique qui est des prélèvements de tumeurs bénignes chez les patientes et des prélèvements de tissus sains des patientes souffrant de cancer du sein, d'une part, et d'autre part des fichets des patientes pour rassembler une importante masse d'informations cliniques sur chaque patiente. Les échantillons dont nous disposons et sur lesquels nous avons travaillés nous proviennent de l'Institut Joliot Curie de l'hôpital Aristide Le Dantec. Ils sont au total 135. Sur ces 135 échantillons 78 ont servi à l'étude du *Cyt-b* et 57 de la *D-Loop*.
- ✓ puis, du matériel du laboratoire comprenant les produits chimiques et le matériel mécanique;
- ✓ enfin, des logiciels pour l'étude bioinformatique.

II.1.2 METHODE

La méthodologie adoptée comporte (04) quatre étapes : la collecte des échantillons, le travail au laboratoire et les analyses bioinformatiques.

II.1.2.1 COLLECTE D'ECHANTILLONS

Le Professeur Ahmadou DEM et son équipe médicale, après opération chirurgicale réalisée sur les patientes souffrant de tumeurs bénignes et de patientes souffrant de cancer, ils nous livrent ces échantillons. Dès la récupération à l'hôpital, ils sont immédiatement acheminés au laboratoire de biologie moléculaire de l'IRD de Bel-Air (Centre pour Biologie et Gestion de la Population (CBGP), où se fera l'extraction d'ADN, la PCR. Pour le séquençage, il est fait dans la ville de Séoul, en Corée du Sud, par une société américaine nommée Macrogen sur les 30 µl par individu du produit de PCR envoyé.

Au laboratoire, ces échantillons sont conservés dans l'alcool à 96° et congelés jusqu'à utilisation. Actuellement, les échantillons biologiques représentatifs des différents stades de la

progression de la tumeur (le tissu normal du sein, les tumeurs bénignes, les tumeurs malignes) sont disponibles au laboratoire.

II.1.2.2 TRAVAIL AU LABORATOIRE

II.1.2.2.1. EXTRACTION DE L'ADN

Les extractions d'ADN des tissus mammaires ont été réalisées en utilisant deux protocoles : la méthode du Puregene DNA Purification et la méthode Standard Qiagen.

Pour isoler l'ADN total des cellules humaines avec le Kit Puregene DNA Purification, les échantillons ont été au préalable découpés en petits morceaux et placés dans un tube Eppendorf de 1,5 ml. Puis 150µl de Cell Lysis Solution (CLS) ont été ajoutés, ensuite 10µL de protéinase K pour lyser les cellules. La digestion s'est effectuée pendant 3h à 55 °C. Après refroidissement, 50 µl de solution de précipitations des protéines sont ajoutés et centrifugés à 13000 rpm (1361,35688 rad/s) pendant 3 min. Le surnageant a été décanté dans un autre tube de 1,5 ml et centrifugé à nouveau à 13000 rpm pendant 5 min, après ajout de 150 µl d'isopropanol (100% froid). Apparait alors un culot blanc d'ADN auquel 150 µl d'éthanol 70% sont ajoutés puis rapidement centrifugés. Après évaporation de l'alcool, 50 à 150 µl de solution d'hydratation de l'ADN (eau ultra pure) sont ajoutées sur le culot en fonction de la concentration d'ADN souhaitée, suivi d'une incubation à 65°C pendant 1h, permettant ainsi une ré-suspension de l'ADN.

Avec le Kit Qiagen DNeasy Tissue, les échantillons sont coupés en petits morceaux et mis dans 180 µl de tampon de digestion (ATL) contenant des détergents qui entrainent une dissociation des tissus et une individualisation des cellules, puis 20 µl de protéinase K sont ajoutés pour dégrader toutes les protéines. Le tout est alors soumis à une incubation à 55°C pendant 3h. Après incubation, le mélange est centrifugé à 13000 rpm (1361,35688 rad.s-1) durant une minute. Les débris tissulaires sont ensuite éliminés et le surnageant est récupéré dans un autre tube Eppendorf de 1,5 ml. A cette solution, 200 µl de tampon de lyse cellulaire sont ajoutés puis un passage immédiat au vortex et incubation pendant 10 min à 70°C. Après cette incubation, de l'éthanol 96-100% est ajouté au mélange et déposé dans une colonne puis centrifugé à 13000 rpm pendant une minute pour retenir l'ADN au niveau de la membrane de silice de la colonne. L'ADN étant chargé négativement est absorbé sur la membrane de silice de la colonne (chargée positivement) par interaction ionique alors que les protéines, les lipides et les polysaccharides passent à travers la membrane et se retrouvent au fond des tubes collecteurs qui seront alors jetés. L'ADN fixé sur la colonne est ensuite purifié par ajout successif de 500 µl de chacun des 2 tampons (AW1 et AW2) qui passent à travers la

membrane par centrifugation à 13000 rpm pendant respectivement 1 et 3 minutes. Ensuite 100 µl de tampon d'élution AE au préalable incubé à 70°C (ce qui va augmenter son rendement de 15 à 20%) est directement versé sur la membrane placée sur un tube de 1,5 ml pour recueillir l'ADN.

A la fin de ces processus d'extraction, la qualité de l'ADN est vérifiée par migration électrophorétique et suivie d'une conservation des extras à -20°C.

II.1.2.2.2. La PCR

Une fois l'ADN extrait des parties de *Cyt-b* et de la *D-Loop* qui présentent un grand intérêt ont été amplifiées et séquencées.

L'amplification du gène ciblé est réalisée dans un volume réactionnel de 50µL. Pour le *Cyt-b* ce milieu réactionnel comporte 28,9µL d'eau MilliQ, 5µL de tampon (10x) dans lequel on trouve les ions Mg2+ à la concentration de 15 mM (ces composants définissent un milieu avec un pH optimal et une concentration saline optimale pour le bon fonctionnement de l'enzyme), 2µL de dNTP, 5µL de chaque amorce : H15915 (TCT-CCA-TTT-CTG-GTT-TAC-AAG-AC) et L14723 (ACC-AAT-GAC-ATG-AAA-AAT-CAT-GGT-T), 0,1µL de Taq polymérase et 4µL d'extrait d'ADN. Et pour la *D-Loop*, il comporte 2,5µl de chacun de ces deux types d'amorces spécifiques à l'élongation (H408: TGTTAAAAGTGCATACCGCCA et L16340: AGCCATTTACCGTACATAGCACA), 2µl de désoxyribonucléotides (dNTP), 1µl de MgCl2 supplémentaire, 5µl de tampon 10x, et 34,9µl d'eau milliQ. Ces composants du milieu réactionnel sont utilisés pour la synthèse de l'ADN double brin. La PCR est réalisée soit avec un volume de 2µl ou 4µl d'ADN concentré, soit avec 8µl d'ADN dilué afin d'arriver à la concentration optimale et 0,1µl de Taq polymérase.

Le milieu réactionnel ainsi obtenu est placé dans un thermocucleur programmé pour effectuer les différents cycles de la PCR dont chacun est composé d'une succession de paliers de température prédéterminée, et d'une durée bien définie. Ces deux paramètres, température et temps, dépendant de la taille de la séquence à amplifier de la taille et de la composition en désoxyribonucléotides des amorces, permettent l'amplification du gène ciblé. L'amplification comprend trois phases : la dénaturation, l'hybridation et l'élongation. La PCR se déroule dans un thermocycleur Eppendhorf.

La température dans le tube est réglée à 94°C. A ce moment là, l'ADN se dénature. En effet, l'ADN perd sa structure caractéristique en double hélice à cette température. L'ADN double-brin (2 brins) est dénaturé en ADN simple brin (1 brin).

Lors d'hybridation, la température descend jusqu'à la température dite d'hybridation. Cette dernière est généralement comprise entre 50°C et 60°C et elle est fonction de la composition en désoxyribonucléotides (dATP, dTTP, dGTP, et dCTP) et des amorces. Les amorces reconnaissent et se fixent à leurs séquences complémentaires en reformant des liaisons hydrogène. On parle alors d'hybridation des amorces au brin d'ADN.

Puis la température est amenée à 72°C, température idéale pour l'activité de la Taq polymérase. C'est une enzyme très spéciale puisqu'elle est dite thermorésistante. En effet, sa température optimale d'action est de 72°C et elle est capable de résister à des températures allant jusqu'à 100°C. Cette étape permet à la Taq polymérase de synthétiser le brin complémentaire à l'ADN matrice, grâce aux dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel : l'élongation. Le premier cycle est fini et voilà qu'un nouveau cycle commence.

Ainsi, le gène du *Cyt-b* a été testé et amplifié par cette technique.

II.1.2.2.3. SEQUENÇAGE (Méthode enzymatique au di-déoxynucléotides de Sanger)

Cette étape qui consiste à déterminer la séquence nucléotidique d'un fragment d'ADN, repose sur une adaptation de la méthode enzymatique de Sanger (1977). En plus des composés habituellement nécessaires à la synthèse du brin d'ADN lors d'une PCR, sont ajoutés des didésoxynucléotides, qui sont des dNTPs dont le groupement OH a été remplacé par un groupement H. La synthèse est ainsi arrêtée à chaque fois qu'un ddNTP complémentaire est incorporé au hasard. Les fragments de différentes tailles ainsi synthétisés sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'acrylamide (des plus petits aux plus grands). La lecture du gel est réalisée par le balayage automatique d'un laser qui permet de détecte les différents fluorochromes couplés aux 4 ddNTPS: ddATP-vert, ddTTP-rouge, ddCTP-bleu et ddGTP-jaune. Après excitation par le laser, ces molécules hautement fluorescentes, de longueur d'onde différente, émettent de la lumière qui est captée par la caméra présente dans le séquenceur. Pour des raisons logistiques, nos travaux de séquençage ont été réalisés en Corée du Sud par une entreprise américaine à partir de 30 µl du produit PCR. (Voire annexe 10).

II.1.2.3 ANALYSES BIOINFORMATIQUES

Elles sont basées sur l'utilisation de logiciels pour l'exploitation des résultats bruts des travaux du laboratoire.

II.1.2.3.1. TRAITEMENT DES DONNEES DE SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES

Le traitement des données ou l'alignement des séquences permet d'obtenir un jeu de données correctes mettant en évidence la similarité entre les séquences. Les séquences du *Cyt-b* et de la *D-Loop* des deux groupes de tissus ont été alignées sous l'éditeur BioEdit version v. 5.0.6

(Hall, 2001) en utilisant l'algorithme Clustal W multiple aligment (Thompson *et al*., 1994) permettant de mettre en évidence les similitudes en laissant ainsi apparaître la position des insertions, des délétions ou encore des substitutions. Après leur alignement, les séquences ont été minutieusement vérifiées et corrigées manuellement.

II.1.2.3.2. RECHERCHE DE MUTATIONS D'INTERET

La recherche de mutations permet de décrire leurs profils afin de pouvoir déterminer les processus d'ordre génomique qui sont à la base de la diversité. Pour cela, les séquences des deux groupes de tissus sains et bénins préalablement alignées, ont été soumises à la base de données MITOMAP5 afin de les comparer avec la séquence de référence révisée de Cambridge (Andrews *et al*., 1999). Les différences de séquences identifiées entre la séquence de référence et nos deux groupes de tissus ont été enregistrées comme des mutations somatiques du *Cyt-b*. En outre, le type de mutation a été répertorié selon qu'il s'agisse d'une transition, d'une transversion, d'une insertion ou d'une délétion. Les mutations ont aussi été rapportées en fonction de si oui ou non elles ont été enregistrées dans la base de données. Cependant, les variations de séquences communes aux deux groupes de tissus sains et bénins ont été marquées comme des polymorphismes neutres. La significativité des variations de séquences entre les deux groupes de tissus sains et bénins a été mise en évidence par le test exact de Fisher disponible dans Mito Tool version 1.1.2 (Long *et al*., 2013) avec un niveau de significativité (P-value) de 0,05 et un intervalle de confiance de 95%.

Afin d'évaluer la pertinence fonctionnelle des mutations détectées dans le *Cyt b*, leur nature a été mise en évidence selon qu'il s'agît d'une mutation synonyme, non synonyme ou d'une mutation entraînant un déplacement du cadre de lecture. Par contre, pour la *D-Loop*, l'évaluation de la distribution de la fréquence des variations entre les TS et TB permet de voir les différentes mutations conférant un plus grand risque de développer une tumeur bénigne du sein et celles impliquées dans la résistance à ces différentes pathologies bénignes du sein après comparaison de nos séquences (TB et TS) avec la séquence de référence de Cambridge (rCRS) de la banque de données MITOMAP sous le n° d'accession NC_012920 gi : 251831106.

Les haplogroupes associés aux différentes mutations du *Cy-b* ont aussi été mis en évidence chez les deux groupes de tissus. En outre la significativité des différences entre ceux-ci a été évaluée également par le test exact de Fisher disponible dans Mito Tool version 1.1.2 (Long *et al*., 2013) avec un niveau de significativité de 0,05 et une intervalle de confiance de 95%. Ce

[5] http://www.mitomap.org/

test exact de Fisher disponible dans Mito Tool a permis également, dans le cas de la *D-Loop* , de rechercher les haplogroupes associés ou non au risque de développer une tumeur bénigne du sein. Ces haplogroupes répartis en différentes familles très fréquentes dans certaines régions géographiques voire même dans certaines populations (Coudray *et al*., 2009) sont des combinaisons des diverses mutations dans la séquence d'ADN(ou haplotypes) regroupées selon leurs relations phylogénétiques.

II.1.2.3.3. ÉVALUATION DE LA DIVERSITE GENETIQUE

L'évaluation de la diversité génétique des séquences permet de rendre compte des variations locales des séquences d'ADN du *Cyt-b* et de la *D-Loop* (allèles) entre tissus sains et tissus bénins. Pour cela, ont été mises en évidence les statistiques descriptives du polymorphisme telles que le nombre de sites variables, la nature de la mutation, le taux de substitutions, les fréquences nucléotidiques des séquences au niveau intra et inter-tissulaire. Celle-ci a été faite sous MEGA 6 version 6.05 (Tamura *et al*., 2013). Les indices de diversité et divergence tels les diversités haplotypique (Hd) et nucléotidique (Pi) de Nei (1987) ont été aussi mis en évidence par le logiciel DnaSP version 5.10.01 (Librado *et al*., 2009).

II.1.2.3.4. ANALYSE DE LA DIFFERENCIATION GENETIQUE

L'analyse de la différenciation génétique permet de rendre compte de la structuration génétique inter-tissulaire du *Cyt-b* et de la *D-Loop*. Pour cela, deux paramètres ont été mis en évidence: l'indice de différenciation génétique (Fst) et l'indice de dissemblance ou distance génétique.

La détermination de l'indice de différenciation génétique (Fst) de Cavalli-Sforza (1966) consiste à mesurer les variations de la fréquence allélique des SNP entre tissus afin de détecter des évènements de sélection positive. Elle a été faite sous Arlequin version 3.1 (Excoffier *et al*., 2005). Sa valeur est toujours comprise entre 0 (quand il n'y a pas de structuration) et 1 (s'il y a structuration génétique). En effet, à une valeur de Fst correspond une P-value permettant d'apprécier selon que celui-ci est significatif ou non. En outre le niveau de significativité du Fst qui a été retenu est de 0,05.

Quant à la détermination des distances génétiques de Nei (1987), elle consiste à évaluer le nombre de remplacement d'allèles qui sont intervenus au niveau du locus, au cours de l'évolution. Elle a été faite sous MEGA 6 version 6.05 (Tamura *et al*., 2013).

En plus de ces paramètres évalués avec le *Cyt-b* pour chaque population, avec la *D-Loop*, cela est fait pour les différents groupes répartis en individus appartenant ou non à l'haplogroupe subsaharien L.

II.1.2.3.5. DETECTION DE SIGNATURE MOLECULAIRE DE SELECTION

La détection de signature moléculaire de sélection permet de déterminer les processus d'ordre sélectif qui sont à la base de la diversité génétique, de son maintien ou de son évolution dans le temps et dans le microenvironnement tumoral. Celle-ci est basée sur des tests qui déterminent si le spectre de fréquence des mutations est conforme aux attentes du modèle standard de neutralité. Pour cela, différents tests ont été mis en évidence afin de mesurer les écarts par rapport à la neutralité dans la distribution des fréquences alléliques au sein des tissus. Il s'agit du D de Tajima (Tajima, 1989), des D et F de Fu & Li (Fu et Li, 1993) et les "Mismatch de distribution", ce dernier est uniquement fait avec la D-Loop. Ces tests ont été mis en évidence sous Arlequin Version 3.1 (Excoffier *et al*., 2005) et DnaSP (Rozas *et al*., 2010). Ainsi des valeurs négatives du D de Tajima et des D et F de Fu & Li indiquent généralement un excès d'allèles rares, cohérent avec une sélection positive ou négative, alors que des valeurs positives de ces statistiques reflètent généralement un excès d'allèles de fréquence intermédiaire, dû à la sélection équilibrante. En outre, pour le *Cyt-b* qui est un gène codant, pour discriminer entre la sélection positive et négative nous avons utilisé le test de dN/dS qui détecte la sélection agissant sur des loci codant pour des protéines en comparant le ratio de substitutions non-synonymes (dN) à celui des substitutions synonymes (dS). En cas de neutralité, les substitutions synonymes et non-synonymes devraient se produire au même rythme et on devrait trouver dN/dS = 1. La sélection négative des variantes non-synonymes se traduirait par dN/dS < 1, alors que la sélection positive de telles variantes se traduirait par dN/dS > 1 (Vasseur *et al*., 2013). Pour ce qui est de la *D-Loop*, l'étude sur l'indice des tumeurs a été réalisée. D'abord pour une comparaison entre haplogroupe et l'âge des patientes, ensuite une comparaison de ces mêmes haplogroupes par rapport à la typologie des tumeurs bénignes diagnostiquées. Il s'en est suivi une étude statistique basée su le test de chi^2 (X^2), effectué grâce au logiciel XLSTAT Pro-6.1.96. Et enfin une étude de la distribution des fréquents haplotypes identifiés sur la base des mutations révélées entre les positions 303 et 316 de l'ADNmt a été réalisée suivant le test exact de Fisher effectué avec le logiciel Mito Tool v 1.1.2 (Long et Yong-Gang, 2013).

II.1.2.3.6. MISE EN EVIDENCE DES VARIATIONS D'ACIDES AMINES

La mise en évidence des variations d'acides aminées permet d'évaluer la diversité protéique inter-tissulaire. Cette partie ne concerne que le *Cyt-b* car la *D-Loop* n'est pas un gène codant. Cette diversité protéique est basée sur la comparaison des fréquences des acides aminés au niveau des deux groupes de tissus. Ainsi, le *Cyt-b* étant un gène codant, les séquences

nucléotidiques des tissus ont été traduites en séquences protéiques sous MEGA 6 version 6.05 (Tamura *et al*., 2013). En effet, la traduction a été faite en utilisant le cadre de lecture le plus approprié. Pour une séquence d'ARN donnée, il existe 3 cadres de lecture possibles correspondant à l'enchaînement des triplets de base le long de la portion. Ainsi, le meilleur cadre de lecture est celui qui présente le moins de codon stop comparé aux deux autres.

En outre, le niveau de significativité des variations de fréquences d'acides aminés entre les deux groupes de tissus sains et bénins a été mise en évidence par le test exact de Fisher disponible dans Mito Tool version 1.1.2 (Long *et al*., 2013) avec un niveau de significativité (P-value) de 0,05 et une intervalle de confiance de 95%.

II.2 RESULTATS ET DISCUSSION DE L'IMPLICATION DES MUTATIONS DU *CYT B* DANS L'EVOLUTION DES TUMEURS BENIGNES DU SEIN CHEZ LES FEMMES SENEGALAISES.

II.2.1 RESULTATS

II.2.1.1 PROFILS DE MUTATIONS DU *CYTOCHROME B*

Les profils des mutations du *Cyt-b* dans les deux groupes de tissus mammaires obtenus suite à la soumission des séquences à la base de données MITOMAP sont consignés dans le Tableau I.

Au total, 40 mutations ont été identifiées dont 16 spécifiques aux tissus sains, 22 aux tissus bénins et 2 communes aux deux groupes de tissus sains et bénins pouvant être définies comme des polymorphismes neutres. Parmi ces variations décrites, 21 ont déjà été rapportées dans la base de données et 19 sont nouvelles.

Au niveau des séquences de tissus sains 64,71% (22/34) d'entre elles ont subi une à plusieurs mutations avec une fréquence de 5,54% dont 72,22% sont des transitions et 27,78% des transversions. En effet, 66,67% de celles-ci sont des mutations synonymes (silencieuses) et 33,33% des mutations non-synonymes conduisant à un changement d'acide animé. Cependant, au niveau des séquences de tissus bénins, 72,73% (32/44) d'entre elles ont subi une à plusieurs mutations avec une fréquence de 6,59% dont 58,33% sont des transitions, 29,17% des transversions, 4,17% des insertions et 8,33% des délétions. Sur les 72,73%, 37,5% de celles-ci sont des mutations silencieuses, 50% des mutations faux-sens conduisant à un changement d'acide aminé et 12,5% des mutations décalantes conduisant à un changement de cadre de lecture.

Tableau I: Mutations du Cytochrome b au niveau des tissus mammaires

Mutations	Type de mutation	Nature de la mutation	Tissus sains (34)	Tissus bénins (44)	P-value	Odds Ratio	Mutation rapportée
T15784C	Transition	syn:P=>P	6 (17,65%)	8 (18,18%)	0.579	0.768421	+
A15824G	Transition	non-syn:T=>A	0	10 (23,73%)	$5.6\ e^{-10}$ *	-	+
C15849T	Transition	non-syn:T=>I	0	4 (9,09%)	0.001 *	-	+
C15839T	Transition	syn:L=>L	0	2 (4,54%)	0.016 *	-	+
C15849A	Transversion	non-syn:T=>N	0	2 (4,54%)	0.016 *	-	+
T15519C	Transition	non-syn:L=>P	0	6 (13,64%)	$6.7\ e^{-06}$ *	-	+
G15521A	Transition	non-syn:A=>T	0	2 (4,54%)	0.016 *	-	+
C15577CC	Insertion	Frmshft	0	1 (2,27%)	0.197	-	
C15582d	Délétion	Frmshft	0	1 (2,27%)	0.197	-	
G15596d	Délétion	Frmshft	0	1 (2,27%)	0.197	-	
C15789G	Transversion	non-syn:T=>S	0	1 (2,27%)	0.197	-	
C15604T	Transition	syn:N=>N	7 (20,59%)	0	$1.9\ e^{-06}$ *	-	+
T15622G	Transversion	syn:L=>L	10 (29,41%)	0	$1.1\ e^{-08}$ *	-	
T15541C	Transition	syn:P=>P	2 (5,88%)	0	0.034 *	-	+
A15546C	Transversion	non-syn:H=>P	4 (11,76%)	0	0.001 *	-	
C15569T	Transition	syn:L=>L	4 (11,76%)	1 (2,27%)	0.023 *	5.28713	
A15613G	Transition	syn:G=>G	3 (8,82%)	0	0.004 *	-	+
C15608A	Transversion	non-syn:L=>M	2 (5,88%)	0	0.034 *	-	
A15794T	Transversion	non-syn:I=>F	0	1 (2,27%)	0.197	-	
A15799T	Transversion	syn:G=>G	0	1 (2,27%)	0.197	-	
A15802T	Transversion	non-syn:Q=>H	0	1 (2,27%)	0.197	-	
G15553A	Transition	syn:K=>K	0	1 (2,27%)	0.197	-	+
C15641T	Transition	non-syn:L=>F	0	1 (2,27%)	0.197	-	+
C15832G	Transversion	non-syn:I=>M	0	1 (2,27%)	0.197	-	
T15512C	Transition	non-syn:Y=>H	0	1 (2,27%)	0.197	-	+
T15530C	Transition	syn:L=>L	0	1 (2,27%)	0.197	-	+
C15838T	Transition	syn:I=>I	1 (2,94%)	0	1	-	

+ : mutation rapportée syn : mutation synonyme
*: différence significative non-syn: mutation non synonyme

Tableau I. (Suite) Mutations du Cytochrome b au niveau des tissus mammaires

Mutations	Type de mutation	Nature de la mutation	Tissus sains (34)	Tissus bénins (44)	P-value	Odds Ratio	Mutation rapportée
C15608T	Transition	non-syn:L=>F	1 (2,94%)	0	1	-	
C15577A	Transversion	non-syn:L=>M	1 (2,94%)	0	1	-	
C15580T	Transition	syn:S=>S	1 (2,94%)	0	1	-	
C15589A	Transversion	syn:L=>L	1 (2,94%)	0	1	-	+
T15586C	Transition	syn:I=>I	1 (2,94%)	0	1	-	+
C15587T	Transition	non-syn:L=>F	1 (2,94%)	0	1	-	
C15595T	Transition	syn:S=>S	1 (2,94%)	0	1	-	+
C15577T	Transition	syn:L=>L	1 (2,94%)	0	1	-	
G15734A	Transition	non-syn:A=>T	1 (2,94%)	0	1	-	+
C15574T	Transition	syn:F=>F	0	1 (2,27%)	0.197	-	+
A15851G	Transition	non-syn:I=>V	0	1 (2,27%)	0.197	-	+
T15629C	Transition	syn:L=>L	0	1 (2,27%)	0.197	-	+
A15835T	Transversion	syn:L=>L	0	1 (2,27%)	0.197	-	

+ : mutation rapportée syn : mutation synonyme
*: différence significative non-syn: mutation non synonyme

Les mutations détectées au niveau des deux groupes de tissus sains et bénins ont été associées à différents haplogroupes (Tableau II). Ainsi, 5 haplogroupes ont été décrits dont 3 (H, M et L) communs aux deux groupes de tissus. Cependant, l'haplogroupe L est majoritaire au niveau des tissus bénins avec une différence très significative de (0,001), un Odds Ratio de (0.054) et un intervalle de confiance (I.C.) de (0.006 - 0.451).

Tableau II: Haplogroupes associés aux différentes mutations

Haplogroups	Tissus sains	Tissus bénins	P-value	Odds Ratio	I.C
H	16	14	0.051	3.428	1.064- 11.043
R	4	0	0.023 *	-	-
M	1	2	1	0.714	0.061 - 8.398
L	1	15	0.001 *	0.054	0.006 - 0.451
B	0	1	1	-	-

H: haplogroupe d'origine européenne L : haplogroupe d'origine sub-saharienne
B et M : haplogroupe d'origine asiatique

II.2.1.2 DIVERSITE GENETIQUE INTER-TISSULAIRE

L'analyse du polymorphisme des séquences des deux groupes de tissus sains et bénins révèle une très grande diversité du *Cyt-b* aussi bien au niveau des tissus sains que bénins (Tableau III). Cependant, on note une plus grande diversité au niveau des séquences de tissus bénins qui sont 2 fois plus variables que les séquences de tissus sains. En effet, chez les deux groupes de tissus, les transitions sont largement supérieures aux transversions, 71,84% contre 28,16% chez les tissus sains avec un taux de mutation de 2,21% et 80,53% contre 19,47% chez les tissus bénins avec un taux de mutation de 2, 992%.

Tableau III: Polymorphisme intra-tissulaire

Paramètres de diversité	Tissus sains				Tissus bénins			
Fréquences nucléotidiques	T	C	A	G	T	C	A	G
	30,5	10,5	25,9	33,1	31,3	9,6	24,6	34,4
Nombre de séquences	34				44			
Pourcentage de sites variables	12%				25,27%			
Taux de transitions	71,84%				80,53%			
Taux de transversions	28,16%				19,47%			
Taux de mutations	2,21%				2, 992			

L'analyse des indices de diversité et de divergence (Tableau IV) révèle de fortes diversités haplotipyques de (0,982) et de (0,949) respectivement au niveau des tissus sains et des tissus bénins contre de faibles diversités nucléotidiques de (0,04504) et de (0,02438).

Tableau IV: Indices de diversité et de divergence

	H	Hd	Pi (π)	Θπ
Tissus sains	26	0,982 ± 0,012	0,04504 ± 0,00224	0,04792
Tissus bénins	27	0,949 ± 0,019	0,02438 ± 0,00604	0,02520

h: nombre d'haplotypes Pi(π): diversité nucléotidique de Nei
Hd: diversité haplotypique θπ: nombre moyen de différences par site et par paire de séquences

II.2.1.3 DIFFERENCIATION GENETIQUE INTER-TISSULAIRE

L'analyse de la structuration génétique du *Cyt-b* au niveau des deux groupes de tissus sains et bénins (Tableau V) a révélé de faibles distances génétiques intra-tissulaires de (0,046) et de (0,016) respectivement au niveau des tissus sains et des tissus bénins. Celle-ci montre également une faible distance génétique inter-tissulaire de (0,049).

En plus des faibles distances génétiques intra et inter-tissulaires observées, on note également un Fst significativement faible de (0,36942) avec une P-value de 0,00 inférieure 0,05 correspondant au niveau de significativité du Fst.

Tableau V: Distances génétiques et indice de différenciation (Fst)

Groupe	Distance génétique intra-tissulaire	Distance génétique inter-tissulaire	Fst
Tissus sains	0,046	0,049	0,36942 P-value=0,00
Tissus bénins	0,016		

II.2.1.4 VARIATIONS D'ACIDES AMINES

II.2.1.4.1. CHEZ L'ENSEMBLE DES PATIENTES

Les acides aminés constituent les monomères des protéines. Ils sont au nombre de 20. Et sur les 20, seuls 10 (acides aminés non indispensables) sont synthétisés par l'homme et les dix autres (acides aminés indispensables) sont apportés par l'alimentation sous forme de protéines végétales ou animales. Lors de la synthèse de ces protéines, des gènes mutants produisent dans certains cas des protéines (enzymes) anormales et/ou tronquées qui sont responsables des déficiences dans le métabolisme mais aussi d'apparition d'autres maladies comme des

cancers. Les maladies qui en découlent constituent la majeure partie des préoccupations de la médecine aujourd'hui. Certains désordres affectant le métabolisme des acides aminés sont connus et recensés avec comme exemple le cas du métabolisme de la phénylalanine pour lesquels on dispose des tests de diagnostic.

C'est pourquoi on se demande si ces mutations notées dans les tissus bénins de ces patientes ne sont pas à l'origine des ces tumeurs bénignes.

L'analyse de la diversité protéique inter-tissulaire (Tableau VI) par la mise en évidence des variations d'acides aminés indique que, malgré les légères variations des fréquences des acides aminés entre les deux groupes de tissus aucune différence significative n'a pu être déterminée. Cependant, on note au niveau des tissus bénins la présence de deux acides aminés Asp et His avec une fréquence de 0,02 mais absents au niveau des tissus sains.

Tableau VI: Fréquences d'acides aminés

Acides aminés	Tissus sains	Tissus bénins	P-value
Alanine	0,43	1,00	1
Cystéine	3,21	4,91	0.72
Asparagine	0	0,02	1
Glutamine	3,38	3,95	1
Phénylalanine	2,08	2,16	1
Glycine	19,06	19,46	1
Histidine	0	0,02	1
Isoleucine	3,44	3,93	1
Lysine	2,43	1,92	1
Leucine	21,66	21,36	0.86
Méthionine	6,73	6,81	1
Acide Aspartique	1,62	1,96	1
Proline	0,58	0,09	0.49
Acide Glutamique	2,22	1,99	1
Arginine	6,27	7,03	1
Sérine	2,92	1,94	0.68
Thréonine	0,95	0,02	0.49
Valine	13,06	11,78	0.83
Tryptophane	8,43	5,57	1
Tyrosine	1,53	1,07	1

II.2.1.4.2. CHEZ LES PATIENTES AVEC LES TISSUS TEMOINS

Pour les 12 patientes avec à la fois séquence de tissus sains et bénins, le pourcentage total d'acides aminés mutés dans des tissus bénins est de 36,71% sur les 50% de l'ensemble. Des disparités sont cependant, notées au sein de notre population d'étude. Certaines patientes ont un taux de mutation plus élevé que d'autres (voir tableau VII).

Des modifications d'un ou de plusieurs Trp, en codon-stop ou en d'autres acides aminés, du tissu sain au tissu bénin, sont notées chez les $\frac{3}{4}$ des patientes (8 patientes sur les 12) qui ont des séquences témoins. Parmi ces individus, les mutations conduisent dans 47,62 % à des protéines tronquées. Parallèlement, une diminution du nombre de Trp dans 68,97% des cas, est notée dans les tissus bénins. Les individus concernés sont répertoriés dans le tableau XII. Il faut noter que, chez les douze patientes qui ont des séquences témoins (tissu sain), 08 d'entres elles ont présenté de mutations du tryptophane du tissu sain en d'autres acides aminés dans les tissus bénins. En contrepartie, un fort taux de mutation des autres acides aminés dans le tissu sain en tryptophane dans le tissu bénin est constaté. Seules deux patientes n'ont pas présenté de mutation des autres acides aminés en tryptophane du tissu sain au tissu bénin.

Tableau VII: Comparaison des mutations des acides aminés entre les tissus sains et tissus bénins

Patiente		Age	Substitution du Trp de TS dans les TB	Substitution des acides aminés en Trp de TS dans les TB	Acides aminés mutés en Ph de TS dans les TB
Individu 1	TS38 TB04	35	End; Glu	End	Ser; 2(Leu); Cys
Individu 2	TS51 TB31	26	End; Gln; 3(Gly); Val; Leu; Ile	Val	End; Gly
Individu 3	TS50 TB38	53	Met; End; Phe; End	Ser; Gly; Asp; 2(His); Tyr; (Leu)	Pro; Trp; End
Individu 4	TS54 TB43	25		2 (Phe)	
Individu 5	TS59 TB28	26	End; Lys; Ile; Lys	End; Arg; Ser; Cys; Glu; Val; Ala; Leu	End
Individu 6	TS08 TB22	19		End; His	Glu; Ile
Individu 7	TS49 TB10	15			End ; Asp
Individu 8	TS44 TB21	21		Gly	Leu
Individu 9	TS24 TB03	24	Gly; Val	2 (Gly); Arg; Phe	Leu; His
Individu 10	TS33 TB23/30	18	End; Gly		End; Gln; 3(Gly); Val; Leu; Ile
Individu 11	TS39 TB18	23	Arg; 2(Phe); Gly	Val ; Ser	Trp; End; 2(Leu); Glu; Trp; Ile; Gly
Individu 12	TS36 TB39	22	Cys	Phe	

TB : Tumeur Bénigne TS : Tissu Sain End : Codon stops Alanine: Ala Cystéine: Cys Asparagine: Asp Glutamine: Glu Phénylalanine: Phe Glycine: Gly Histidine: His Isoleucine: Ile Lysine: Lys Leucine: Leu Méthionine: Met Acide Aspartique: Asn Proline: Pro Acide Glutamique: Gln Arginine: Arg Sérine: Ser Thréonine: Thr Valine: Val Tryptophane: Trp Tyrosine: Ty

II.2.1.5 SIGNATURE MOLECULAIRE DE LA SELECTION NATURELLE

La détection de signature de sélection naturelle au niveau des tissus bénins basée sur le spectre de fréquence allélique (Tableau VIII), indique que les tests du D de (Tajima) correspondant à (-2,39301) et des D et F de (Fu & Li) respectivement de (-4,01614) et de (-4,07023) sont significativement négatifs. On note également que le ratio dN/dS, qui a été utilisé pour discriminer selon qu'il s'agit d'une sélection positive ou négative, indique une valeur de 1,33333 supérieur à 1.

Tableau VIII: Tests de neutralité au niveau des tissus bénins

Tests statistiques	Tissus bénins	P-value
D de Tajima	-2,39301	0,00
D de Fu et Li	-4,01614	0,02
F de Fu et Li	-4,07023	0,02
dN/dS	1,33333	-

II.2.2 DISCUSSION

Partant de la définition de tumeur, on comprend pourquoi certaines tumeurs bénignes sont placées dans les facteurs de risque potentiel pour développer le cancer du sein. Les anomalies qui causent l'homéostasie, par augmentation de la prolifération et/ou diminution de la mort cellulaire, sont à l'origine de l'accumulation des mutations dans les cellules. Ce qui aboutissait à la formation d'une tumeur macroscopiquement visible. Le génome mitochondrial est différent de l'ADN nucléaire par différents aspects parmi lesquels: le fait qu'il soit transmis par la mère (Giles *et al*., 1980), qu'il ne contient pas d'intron et enfin qu'il est légèrement différent de celui du génome nucléaire (pour 3 codons chez l'homme). Ces particularités de l'ADNmt, associées au fait que chaque cellule contient des centaines voire des milliers de copies d'ADNmt, sont à l'origine des caractéristiques distinguant la génétique mitochondriale de la génétique mendélienne et expliquent plusieurs particularités cliniques des maladies mitochondriales (Lagier-Tourenne, 2006). Plusieurs gènes mutés ont été identifiés dans l'apparition du cancer par suite de mutations ponctuelles, ou des délétions ou des duplications d'ADNmt impliquées dans le déclenchement ou le développement des tumeurs.

L'objectif de cette étude étant de déterminer l'implication des altérations génétiques du Cytochrome b dans l'évolution des tumeurs bénignes du sein chez les femmes sénégalaises, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'importance de la mutation et de la sélection au niveau des séquences de tissus mammaires. En effet, les tumeurs étant régies par le processus mutation-sélection, propre à notre évolution, celle-ci nous a permis de mieux comprendre l'histoire des cellules tumorales, la distribution de la variabilité génétique et phénotypique entre tissus sains et tumoraux et à terme de déterminer l'implication du *Cyt-b* dans la tumorogenèse. Dans l'atteinte de notre objectif général nous nous sommes fixés un certain nombre d'objectifs spécifiques parmi lesquels la recherche de mutations. Cependant la grande variabilité des séquences de l'ADN mitochondrial humain induit de nombreuses difficultés dans la recherche de ses mutations. Dans le cas de notre étude, nous avons entrepris l'analyse du Cyt b chez 44 patientes sénégalaises présentant une tumeur bénigne mammaire, comparée à un groupe de 34 individus servant de témoins.

Plusieurs mutations somatiques ont été décrites aussi bien au niveau des séquences de tissus sains qu'au niveau des séquences de tissus bénins. Cependant, elles étaient plus fréquentes au niveau de ces dernières; ce qui témoigne ainsi de la grande diversité du *Cyt-b* ainsi que de son instabilité génétique au niveau des tissus bénins.

Ce qui nous pousse à nous poser la question à savoir « Qu'est ce qui pourrait expliquer cette forte variabilité intra comme inter-tissus des pathologies de ce gène mitochondrial utilisé? Deux pistes pourraient l'expliquer:

Premièrement les particularités du génome mitochondrial: l'hétéroplasmie et la ségrégation mitotique.

L'hétéroplasmie qui correspond à la coexistence dans une même cellule de deux espèces d'ADN mitochondriales. Au cours des divisions cellulaires, les mitochondries d'une cellule ne se répartissent pas de manière homogène dans les cellules filles. Ainsi, à partir d'une cellule présentant 2 types de populations de mitochondries, des cellules filles peuvent avoir des taux variables de chacune des 2 populations puisqu'il ne s'agit pas d'un phénomène aléatoire.

La ségrégation mitotique expliquant le fait qu'à partir d'un ovule contenant une proportion donnée d'ADN mitochondriaux normaux et mutés, un individu peut avoir des rapports ADN normal sur ADN muté très variables dans ses différents tissus et organes (Lescuyer, 2002). Son association avec l'effet de seuil explique la grande hétérogénéité de l'expression clinique des maladies liées à l'ADN mitochondrial (Di Mauro *et al*., 2001). L'effet seuil n'est rien d'autre que le pourcentage d'ADN muté à partir duquel un tissu ou un organe n'est plus en mesure d'assurer la production d'énergie minimale permettant de maintenir ses fonctions normales. En effet, si la proportion d'ADN muté est très variable chez un individu, il faudrait qu'un nombre critique minimum de génomes mutants soit atteint pour déclencher une dysfonction tissulaire débouchant à des manifestations cliniques.

Deuxièmement cette variabilité inter-individuelle observée chez les patientes avec des témoins pourrait être due à des mutations pré-cancéreuses du fait que les prélèvements sont des tissus bénins du même sein. En effet, Palacios *et al*. (2008) ont démontré que les pertes d'hétérozygoties observées dans 90% des tumeurs *BRCA1/2* sont également présentes dans les lésions prénéoplasiques : carcinome in situ de ces patientes, mais également dans le tissu non tumoral. Ce qui suggère donc que les tissus non tumoraux et/ou bénins présentent un certain degré d'altérations génétiques qui pourrait prédisposer à l'apparition de tumeur bénigne ou même à la transformation néoplasmique.

Nos observations confirment les résultats des travaux de Legros *et al.* (2001) portant sur la caractérisation fonctionnelle de nouvelles mutations dans le gène Cytochrome b humain et ceux de Mbaye *et al*. (2012) portant sur la pénétrance du *Cyt-b* dans le cancer du sein chez les femmes sénégalaises. Afin d'évaluer la pertinence fonctionnelle de ces mutations, nous avons

examiné des critères indirects tels la nature de la mutation et la conservation des acides aminés mutés dans la population de cellules tumorales.

Bien qu'il n'y ait pas de différence significative entre les fréquences des acides aminés des deux groupes de tissus sains et bénins malgré quelques variations notoires, nous avons pu observer que chez 71,43% des séquences de tissus bénins 50% des mutations ont conduit à un changement d'acide aminé. Nous avons également noté que chez 6,81% des séquences 12,5% des mutations ont conduit à un changement dans le cadre de lecture mais aussi à une diminution du taux de trp dans les tissus bénins par rapport celui des tissus sains (8,43 % TS conte 5,57 % TB). Même pour seulement les douze patientes chez qui on a à la fois les prélèvements de tissus sains et de tumeurs bénignes, une diminution du taux de Trp est aussi notée dans 68,79% des cas de tissus bénins. Cette diminution du taux local de Trp dans les tumeurs est due à sa dégradation par l'indoléamine et le tryptophane 2,3-dioxygénase comme le révèle Moineau et al en 2010 montrant qu'in vivo ces deux enzymes *IDO1* (*l'indoléamine 2,3-dioxygénase 1*) et *TDO (le tryptophane 2,3-dioxygénase),* représentent des acteurs essentielles qu'utilisent les cellules cancéreuses pour développer des mécanismes permettant aux tumeurs de résister et d'échapper au système immunitaire.

D'autant que ces deux enzymes : la première *IDO1* (Eynde *et al*., 2003) et la seconde enzyme *TDO* (Eynde *et al*., 2012) peuvent utiliser le tryptophane et former la kynurénine surexprimées dans les tumeurs humaines (en d'autres termes présentes et actives), cela explique pourquoi le taux du tryptophane est faible dans les tumeurs du sein. L'abaissement du tryptophane et la formation de kynurénine qu'elle peut causer, inhibent la fonction des lymphocytes T qui deviennent incapable de jouer leur rôle de défense, en reconnaissant les cellules tumorales. Ce qui confère à ces tumeurs le pourvoir de défier tous ces nombreux systèmes de réparation ou de correction des mutations de l'ADN : le MMR (Mis Match Repair) : réparation des mésappariements, le NER (Nucleotide Excision Repair) : réparation par excision de nucléotide, le BER (Base Excision Repair) : réparation par excision de base, la TS (Translesion Synthesis) : réparation directe, réparation des agents portant l'ADN et le DSBR (Double Strand Break Repair) : réparation des cassures double brin, qui comprend le HR (Homologous Repair) et le NHEJ (Non Homologous End Joining) (de Feraudy, 2007) ; présents dans les cellules eucaryotes normales pouvant être à l'origine de leurs apparitions. Mais il ne faut pas oublier que l'équilibre entre la survenue des lésions de l'ADN et leur réparation sont déterminant pour le risque de développement d'une tumeur ((Moisan, 2009).

En somme, ces observations laissent penser donc que ces mutations sont d'une importance fonctionnelle, mais d'autres études biochimiques et moléculaires extensives seraient nécessaires afin de déterminer leur effet dans le métabolisme énergétique des cellules tumorales.

Néanmoins, Dasgupta *et al.* (2008), dans une étude portant sur les mutations du *Cyt-b* dans la croissance tumorale du cancer de la vessie, ont montré par un modèle de xénogreffe murin et humain l'effet fonctionnel de la surexpression d'une mutation de délétion de 21 pb du Cytochrome b. Ils ont pu démontrer que celle-ci induisait une croissance tumorale significative par un déclanchement rapide de la progression du cycle cellulaire, par up-régulation de la voie de signalisation nucléaire du facteur *kB2*. Cependant, ces mutations peuvent entraîner des conséquences dans la structuration génétique du *Cyt-b* entre les deux populations de cellules (saines et bénignes).

L'étude de la structuration génétique du *Cyt-b* au niveau des tissus sains et bénins, par l'analyse de leur distance génétique et de l' indice de différenciation génétique (Fst), montre un début de différenciation génétique entre les deux groupes de tissus sains et bénins, caractérisé par la faible distance génétique inter-tissulaire de (0,049) et un Fst de (0,36942) significativement faible; ce qui traduit d'ailleurs l'état bénin des cellules tumorales. La faible distance génétique (0,016) intra-tumorale peut s'explique par l'origine monoclonale des tumeurs mammaires (Nkondjock *et al.,* 2005) dont le développement repose sur une succession de vagues d'expansions clonales. Une tumeur est en effet composée de différentes sous-populations de cellules anormales ayant pour points communs les altérations survenues précocement et dont la genèse suit les lois d'un continuum évolutif spatiotemporel (Guinebretière, 2007). Ainsi la fixation de ces altérations dans la population cellulaire pourrait être l'effet de la sélection naturelle, un des moteurs de l'évolution.

L'analyse de signature moléculaire de sélection naturelle basée sur les tests de neutralité, révèle que le Cytochrome b (*Cyt-b*) est sous sélection positive, caractérisé par des valeurs du D de (Tajima), et des D et F de (Fu & Li) qui sont significativement négatives indiquant un excès d'allèles rares, cohérent avec une sélection positive ou négative et dont la positivité est confirmée par le ratio dN/dS (Vasseur *et al.,* 2013). Cette sélection positive appelée aussi sélection adaptative entraîne l'augmentation en fréquence des variants qui confèrent un avantage dans le microenvironnement tumoral (Sabeti *et al.,* 2006). Ceci peut être expliqué par une adaptation des cellules tumorales au stroma devenu permissif. En effet, le *Cyt-b* étant un élément clé du système de phosphorylation oxydative, a dû par ses mutations, conférer aux cellules tumorales un avantage sélectif dans leurs mécanismes d'adaptation, de survie et de

prolifération. Ceci est d'ailleurs confirmé par l'état d'évolution de la population de cellules tumorales au niveau mammaire qui révèle une croissance de population rapide à partir d'une population ancestrale à faible effectif, caractérisée par une forte diversité haplotypique (Hd) de (0,949) pour une faible diversité nucléotidique (Pi) de (0,02438).

Nos observations confirment les résultats d'un bon nombre de chercheurs quant à la corrélation entre les mutations de l'ADNmt et la tumorogenèse mais ces résultats sont, par ailleurs, controversés par un autre groupe de chercheurs. A cet effet deux théories s'opposent: la première stipule que les mutations de l'ADNmt surviennent simplement par hasard dans les cellules progénitrices de la tumeur sans aucun avantage physiologique ou exigence tumorigène, en revanche, l'autre théorie affirme que ces mutations de l'ADNmt stimulent la tumeur et contribuent à la tumorogenèse et à la progression tumorale.

Dans la première théorie les auteurs ont émis l'hypothèse selon laquelle les mutations de l'ADNmt dans les cellules cancéreuses proviennent de la tumorogenèse. Certains auteurs tels que Beckman *et al.,* (1997) affirment que de nombreuses mutations de l'ADNmt se produisent au hasard à la suite de dommages oxydatifs générés par les cellules tumorales. D'autres tels que Warburg (1956), pionnier de l'étude des changements mitochondriaux dans les cellules tumorales, Coller *et al.,* (2001) et Chinnery *et al.,* (2002) affirment que les mutations de l'ADNmt n'endommagent pas le métabolisme énergétique des cellules et que ces mutations ont la capacité de se fixer ou de disparaître dans les cellules par l'intermédiaire du mécanisme de la dérive génétique. Par ailleurs, Vega *et al.,* (2004) ont postulé que les mutations de l'ADNmt dans les cellules tumorales étaient des mutations neutres et ne jouaient aucun rôle dans la tumorogenèse.

Cependant, les auteurs de la seconde théorie suggèrent que les mutations de l'ADNmt dans les cellules tumorales agissent comme un stimulant pour les tumeurs et contribuent à la tumorogenèse et à la progression tumorale. En effet certains d'entre eux tels que Hayashi *et al.,* (1992) et Dani *et al.,* (2004) ont montré que le dysfonctionnement du génome mitochondrial affectait fortement la survie et la prolifération des cellules tumorales. D'autres ont aussi démontré que l'augmentation des ERO causée par des mutations de l'ADNmt contribuait à la tumorogenèse et à la progression tumorale (Esposito *et al.,* 1999; Bostwick *et al.,* 2000).

En définitive, il convient d'admettre que les mitochondries jouent un rôle important dans le métabolisme énergétique cellulaire, dans la production de radicaux libres et dans l'apoptose. Ainsi, tout dysfonctionnement de la mitochondrie, suite à des mutations dans son génome affectant sa fonction, pourrait être l'un des facteurs de causalité de la tumorogenèse.

Cependant, bien que le rôle des mutations de l'ADN mitochondrial (ADNmt) dans la tumorogenèse ait été étudié en détail par diverses approches, les conclusions restent à ce jour controversées.

II.3 RESULTATS ET DISCUSSION DE L'IMPACT DE LA DIVERSITE ET DE L'EVOLUTION GENETIQUE DE LA D-LOOP DES TUMEURS BENIGNES CHEZ LES FEMMES SENEGALAISES

II.3.1 RESULTATS

II.3.1.1 SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES OBTENUES

Après alignement et correction puis suppression des séquences présentant une très grande différence génétique, vingt-huit (28) séquences de tissus bénins sur les trente et une (31) de départ ont été conservées. La longueur de la portion conservée est de 560 pb. À celles-ci se sont ajoutées vingt-neuf (29) séquences correspondantes à la portion de la *D-loop* étudiée, de même taille, obtenues à partir de tissus mammaires sains. Ainsi, au total cinquante-sept (57) séquences seront prises en compte dans les analyses génétiques.

II.3.1.2 VARIABILITE ET STRUCTURATION DE LA *D-LOOP*

II.3.1.2.1 MUTATIONS DE LA *D-LOOP*

La portion d'ADNmt étudiée s'étend de la position 366 à la position 16374, incluant la totalité de la zone hypervariable II *(HV2)* de la *D-loop*. Les résultats de la recherche de mutations chez les patientes et les témoins sont résumés dans le tableau IX.

Tableau IX: Positions et fréquences des variants de la *D-Loop* dans les tissus bénins appariés aux tissus témoins

Mutations de la D-loop					Répertoire Sur Mitomap	Types de mutations			Fréquences des variants				
rCRS	Position	VB	VC	VS		Transition	Transversion	Insertion	TS (n=29)	TB (n=28)	P-Value	OR	95% CI
G	16389	A			+	S			-	3,57%	0,1466	-	-
G	16390		A		+	S			27,59%	35,71%	0,7013	0,9081	0,5498-1,4996
T	16392	G					V		-	7,14%	*0,0461	-	-
C	16393	T			+	S			-	7,14 %	*0,0461	-	-
C	16395			G			V		3,45%	-	0,0711	-	-
C	16411			A			V		3,45%	-	0,0711	-	-
A	16421			C			V		3,45%	-	0,0711	-	-
T	16422			C	+	S			3,45%	-	0,0711	-	-
T	16468			G			V		3,45%	-	0,0711	-	-
T	16469			G			V		6,90%	-	*0,0021	-	-
G	16477			A	+	S			3,45%	-	0,0711	-	-
C	16478			A			V		10,34%	-	*0,0002	-	-
T	16479			A			V		3,45%	-	0,0711	-	-
C	16501			G			V		3,45%	-	0,0711	-	-
C	16511			T	+	S			3,45%	-	0,0711	-	-
T	16519		C		+	S			65,52%	60,71%	*0,0155	0,6366	0,4443-0,9120
T	16522			A			V		3,45%	-	0,0711	-	-
A	16525			G	+	S			3,45%	-	0,0711	-	-
C	16527		T		+	S			6,90%	14,29%	0,5106	1,4215	0,5713-3,5368
C	11			A			V		3,45%	-	0,0711	-	-
C	29			A	+		V		3,45%	-	0,0711	-	-
T	55	A			+		V		-	7,14%	*0,0461	-	-
C	33			G	+		V		3,45%	-	0,0711	-	-
C	61			T	+	S			6,90%	-	*0,0021	-	-
C	64		T		+	S			6,90%	7,14%	0,5904	0.7067	0,2470-2,0220
A	73		G		+	S			93,10%	92,86%	*0,0155	0,6844	0,5062-0,9253
A	77	G				S			-	10,71%	*0,0037	-	-
G	79	T			+		V		-	32,14%	$*3,73e^{-08}$	--	-
C	80	A				S			-	14,29%	*0,0006	--	-
G	81	T			+		V		-	39,29%	$*9,65e^{-10}$	--	-
T	83	C				S			-	3,57%	0,1466	-	-

+ : mutation rapportée (VC): variants en commun (VB): variants spécifique aux tissus bénins
*: différence significative (VS): variants spécifique aux tissus sains

Tableau IX : (Suite 1) Positions et fréquences des variants de la *D-Loop* dans les tissus bénins appariés aux tissus témoins

Mutations de la D-loop					Répertoire Sur Mitomap	Types de mutations			Fréquences des variants				
rCRS	Position	VB	VC	VS		Transition	Transversion	Insertion	TS (n=29)	TB (n=28)	P-Value	OR	95% CI
C	86	G					V		-	17,86%	*0,0001	-	-
T	89	A					V		-	21,14%	*1,59e^{-05}	-	-
G	90	T			+		V		-	3,57%	0,1466	-	-
G	90	A			+	S			-	7,14%	*0,0461	-	-
C	91	A					V		-	3,57%	0,14661	-	-
C	91	G			+		V		-	17,86%	*0,0001	-	-
A	93		G		+	S			17,24%	17,86%	0,3929	0,7463	0,3824-1,4564
A	95		C		+		V		10,34%	3,57%	*0,0287	0,2810	0,0878-08989
C	96	T			+	S			-	21,43%	*1,60e^{-05}	-	-
G	97	A			+	S			-	46,43%	*2,75e^{-11}	-	-
C	98	A					V		-	3,57%	0,1466	-	-
C	114			G	+		V		6,90%	-	*0,0021	-	-
C	120			A			V		3,45%	-	0,0711	-	-
C	140	A					V		-	3,57%	0,1466	-	-
G	143		A		+	S			10,34%	17,86%	0,5692	1,2991	0,5875-2,7847
T	146		C		+	S			27,59%	32,14%	0,4268	0,8044	0,4807-1,3461
C	150		T		+	S			41,38%	17,86%	*1,01e^{-05}	0,3007	0,1716-0,5271
C	151		T		+	S			3,45%	7,14%	0,5371	1,6565	0,4272-6,4242
C	151			G	+		V		10,34%	-	*0,0002	-	-
T	152		C		+	S			55,17%	78,57%	0,9281	1,0186	0,7137-1,4538
C	182		T		+	S			27,59%	28,57%	0,2755	0,7272	0,4294-1,2314
A	183		G		+	S			3,45%	3,57%	1	0,9443	0,2108-4,2298
G	185		A		+	S			6,90%	7,14%	0,5904	0,5904	0,2470-2,0220
G	185		T		+		V		6,90%	14,29%	0,5106	1,4215	0,5713-3,5368
G	185			C	+		V		3,45%	-	0,0711	-	-
C	186		A		+		V		3,45%	3,57%	1	0,9443	0,2108-4,2298
A	189		C		+		V		3,45%	3,57%	1	0,9443	0,2108-4,2298
A	189		G		+	S			3,45%	10,71%	0,1746	2,6117	0,7264-9,3896
T	195		C		+	S			51,72%	50,00%	0,0502	0,6675	0,4482-0,9941
A	197			C			V		3,45%	-	0,0711	-	-
C	198		T		+	S			24,14%	14,29%	*0,0075	0,4064	0,2090-0,7902

+ : mutation rapportée (VC): variants en commun (VB): variants spécifique aux tissus bénins
*: différence significative (VS): variants spécifique aux tissus sains

Tableau IX: (suite 2) Positions et fréquences des variants de la *D-Loop* dans les tissus bénins appariés aux tissus témoins

Mutations de la D-loop					Répertoire Sur Mitomap	Types de mutations			Fréquences des variants				
rCRS	Position	VB	VC	VS		Transition	Transversion	Insertion	TS (n=29)	TB (n=28)	P-Value	OR	95% CI
A	200	G			+	S			-	7,14%	*0,00461	-	-
T	204		C		+	S			3,45%	7,14%	0,5371	1,6565	0,4272-6,4241
T	204			G	+		V		13,79%	-	*4,17e^{-06}	-	-
T	206	G			+		V		-	3,57%	0,1466	-	-
G	207			A	+	S			13,79%	-	*4,17e^{-06}	-	-
T	208	G			+		V		-	3,57%	0,1466	-	-
T	217	A					V		-	3,57%	0,1466	-	-
T	217	G			+		V		-	3,57%	0,1466	-	-
T	220	A					V		-	3,57%	0,1466	-	-
G	221	A				S			-	3,57%	0,1466	-	-
G	221			C	+		V		3,45%	-	0,0711	-	-
C	222	T			+	S			-	10,71%	*0,0037	-	-
T	224	G					V		-	3,57%	0,1466	-	-
G	228	A			+	S			-	28,57%	*2,32e^{-07}	-	-
C	231	A					V		-	7,14%	*0,0461	-	-
A	232			C			V		3,45%	-	0,0711	-	-
A	235	G			+	S			-	3,57%	0,1466	-	-
T	236	C			+	S			-	7,14%	*0,0461	-	-
A	240			T			V		3,45%	-	0,0711	-	-
G	242	A				S			-	3,45%	0,2715	-	-
G	247		A		+	S			10,34%	28,57%	*0,0486	2,0798	1,0082-4,2903
C	256			T	+	S			3,45%	-	0,0711	-	-
A	257	C					V		-	3,45%	0,2715	-	-
A	263		G		+	S			100%	100,0%	*0,0104	0,6824	0,5096-0,9138
G	275	A			+	S			-	7,17%	*0,0461	-	-
T	279			C	+	S			3,45%	-	0,0711	-	-
T	292			A	+		V		3,45%	-	0,0711	-	-
A	297			G	+	S			3,45%	-	0,0711	-	-
C	309			T	+	S			3,45%	-	0,0711	-	-
T	310	C			+	S			-	3,57%	*6,72e^{-09}	-	-
T	310	TTC			+			I	-	3,57%	*6,72e^{-09}	-	-
C	311	T			+	S			-	3,57%	0,1466	-	-
C	315		CC		+			I	93,10%	60,71%	*8,16e^{-07}	0,4365	0,3121-0,6105
C	315	CCG			+			I	-	3,57%	0,1466	-	-

+ : mutation rapportée (VC): variants en commun (VB): variants spécifique aux tissus bénins
*: différence significative (VS): variants spécifique aux tissus sains

Tableau IX: (suite 3) Positions et fréquences des variants de la *D-Loop* dans les tissus bénins appariés aux tissus témoins

Mutations de la D-loop					Répertoire Sur Mitomap	Types de mutations			Fréquences des variants				
rCRS	Position	VB	VC	VS		Transition	Transversion	Insertion	TS (n=29)	TB (n=28)	P-Value	OR	95% CI
G	316		C		+		V		3,45%	3,57%	1	0,9443	0,2108-4,2298
G	316		GA					I	3,45%	3,57%	1	0,9443	0,2108-4,2298
C	317	T			+	S			-	3,57%	0,1466	-	-
C	320	T			+	S			-	3,57%	0,1466	-	-
C	325		T		+	S			3,45%	7,14%	0,5371	1,6565	0,4272-6,4241
C	332			T	+	S			3,45%	-	0,0711	-	-
C	332	A			+		V		-	3,57%	0,1466	-	-
G	347	C					V		-	3,57%	0,1466	-	-
A	357		G		+	S			10,34%	14,29%	1	0,9916	0,4384-2,2429
Nb de mutation	43		29	33	73(69,52%)	53(50,48%)	48(45,72%)	4(3,81%)					
TB	72	59,72%	40,28%	-	53(73,61%)	42(58,33%)	26(36,11%)	4(5,56%)	* : P value significative, p < 0,050 Mutations				
TS	62	-	46,77%	53,23%	47(75,81%)	35(56,45%)	27(43,55%)	-					

+ : mutation rapportée (VC): variants en commun (VB): variants spécifique aux tissus bénins

*: différence significative (VS): variants spécifique aux tissus sains

Les résultats obtenus pour les tissus bénins (tableau IX) révèlent la présence de 72 variants avec 58,33% de transitions, 36,11% de transversions et 5,56% d'insertions contre 62 variants pour les tissus sains avec moins de transitions (56,45%) et plus de transversions (43,55%). Toutefois ces résultats montrent qu'il y a 29 variants en commun (VC) entre les tissus sains (soit 46,77% des variants des TS) et les tissus bénins étudiés (soit 40,28% des variants des TB). Parmi les plus représentatifs des variants en commun (présents à plus de 28% des séquences étudiées), peuvent être cités : G16390A ; T16519C ; A73G ; T146C ; T152C ; T195C ; A263G ; C315CC, en plus de la mutation C150T qui est plus présente de façon très significative ($p = 1,01e^{-05}$) chez les individus sains (41,38%) que chez les patientes (17,86%), contrairement à la mutation G247A plus présente significativement ($p = 0,0486$) chez les patientes (28,57%) que chez les individus sains (10,34%).

Les plus représentés des variants spécifiques aux tissus bénins sont: G79T (34,14%; $p = 3,73e^{-08}$) ; G81T (39,29%; $p = 9,65e^{-10}$) ; G97A (46,43%; $p = 2,75e^{-11}$) ; G228A (28,57%; $p = 2,32e^{-07}$) ; T310C (35,71%; $p = 6.72e^{-09}$) et pour les tissus sains : C16478A (10,34%; $p = 0,0002$) ; C151G (10,34%; $p = 0,0002$) ; T204G (13,79%; $p = 4,17e^{-6}$) ; G207A (13,79%; $p = 4,17e^{-6}$) avec une présence très significative.

II.3.1.2.2 HAPLOGROUPES DE LA *D-LOOP*

Sur les cinquante-sept (57) individus séquencés, un total de huit (8) haplogroupes (B, D, H, L, M, T, U, X) ont été retrouvés. Seuls les haplogroupes L, U, B, et M sont représentés chez les patientes, alors que les haplogroupes B, D, H, L, M, T et X, sont présents chez les témoins (tableau X).

L'haplogroupe subsaharien L, couvre plus de la moitié des individus étudiés soit 54,39%, avec une différence significative ($p = 0,0104$; $OR = 2,1728$) entre les tissus bénins (64,29%) et les tissus sains (44,83%). Les haplogroupes asiatiques B, D, et M viennent ensuite avec 28,07%, et se révèlent plus présents chez les patientes (32,14%) que chez les sujets sains (24,14%). Par contre, les haplogroupes d'origine européenne et berbérophone (H, U, T et X) se présentent bien moins de façon très significative ($p = 4,05e^{-07}$; $OR = 0,0927$) chez les patientes (3,57%) que chez les femmes sénégalaises saines où ils sont bien représentés avec 31,03%.

L'analyse des sous haplogroupes de la lignée L révèle la présence de L1 (avec ses sous branches L1c et L1b) qui figure aussi bien chez les patientes que chez les témoins, contrairement au sous haplogroupe L0 seulement présent de façon significative chez les patientes (7,14% ; $p = 0,014$). Le sous haplogroupe L2 occupe à lui seul près de 55% de la famille L, soit 29,82% des sénégalaises étudiées tandis que le sous haplogroupe afro-eurasienne

L3 a été observé, à des fréquences non négligeables, avec ses sub-haplogroupes L3k et L3x chez les patientes et L3e chez un témoin. Parmi toutes ces sous-branches de la famille L, la plus fréquente chez les patientes est L2a (21,43%) avec une différence moyennement significative (p = 0,052) par rapport aux témoins (10,34%), alors que L2b est la plus présente chez les témoins (13,79%) et révèle une différence significative (p = 0.0125) d'avec les patientes (3,57%). Les sous branches B4a et M6a d'origine asiatique, observés seulement chez les patientes, sont aussi très bien représentés avec respectivement 17,86% ($p = 3.67e^{-06}$) et 10,71% (p = 0,0008). Parmi les sous haplogroupes d'origine européenne et berbérophone, H1, H2 et T2 sont observés seulement et de façon significative chez les témoins.

Tableau X: Fréquences et diversité des haplogroupes et sous-haplogroupes retrouvés chez les femmes sénégalaises.

Zone de Répartition	Haplogroupes		%TS	%TB	P-value	%TS	%TB	P-value	%TS	%TB	P-value	OR (95%CI)
Sub-sahariens	L0	L0a	0,00	7,14	* 0,014	0,00	7,14	*0,0140	44,83	64,29	*0,0104	2,1728 (1,2320-3,8322)
	L1	L1b	10,34	14,29	0,5181	13,79	17,86	0,5634				
		L1c	3,45	3,57	1							
	L2	L2a	10,34	21,43	0,0520	27,59	32,14	0,6436				
		L2b	13,79	3,57	* 0,0125							
		L2c	3,45	7,14	0,3327							
	L3	L3e	3,45	0,00	0,1140	3,45	7,14	0,3311				
		L3k	0,00	3,57	0,1217							
		L3x	0,00	3,57	0,1217							
Asiatiques	B2	B2g	6,90	0,00	* 0,0058	13,79	21,43	0,2640	24,14	32,14	0,2702	1,4902 (0,7999 – 2,7763)
	B4	B4a	0,00	17,86	* $3.67e^{-06}$							
		B4c	6,90	3,57	0,3640							
	D4	D4j	3,45	0,00	0,1140	3,45	0,00	0,2462				
	M6	M6a	0,00	10,71	* 0,0008	6,90	10,71	0,4595				
	M56	M56	6,90	0,00	* 0,0058							
Européens et Berbérophones	H1	H1a	6,90	0,00	* 0,0058	13,79	0,00	*$7.49e^{-05}$	31,03	3,57	*$4,05e^{-05}$	0,0927 (0,0313 – 0,2748)
	H2	H2a	6,90	0,00	*0,0058							
	T2	T2b	10,34	0,00	* 0,0006	13,79	0,00	*$7,49e^{-05}$				
		T2c	3,45	0,00	0,1140							
	U5	U5b	0,00	3,57	0,1217	0,00	3,57	0,1212				
	X3	X3a	3,45	0,00	0,1140	3,45	0,00	0,2462				

*: P value significative, $p < 0,05$

II.3.1.2.3 DIVERSITE DES SEQUENCES D'ADN DES TUMEURS BENIGNES DU SEIN ET STRUCTURE GENETIQUE DES POPULATIONS

II.3.1.2.3.1 DIVERSITE GENETIQUE

Les 560 pb de la *D-Loop* analysées chez les vingt et huit (28) patientes atteintes de tumeurs bénignes présentent 12,14% de sites variables et, parmi eux, plus de la moitié, soit 57,36%, sont informatifs en parcimonie, alors que pour les vingt et neuf (29) témoins sains (560 pb) 16,99% des sites sont variables, avec seulement 29,47% de sites informatifs en parcimonie. Ainsi, le pourcentage des sites informatifs en parcimonies est plus élevé dans les TB que dans les TS. Un autre paramètre testé est la nature des mutations et les résultats obtenus montrent qu'au niveau des tissus mammaires bénins 32,24% des mutations sont des transversions comparées au niveau des TS où 30,99% sont des transversions. Dans tous les cas nous remarquerons que les transitions sont toujours majoritaires. Il en résulte ainsi un rapport transition/transversion de 2,049 et 2,2267 pour les TB et TS respectivement. Les paramètres de diversité génétique des TS et des TB sont consignés dans le tableau XI.

Tableau XI: Paramètre de diversité des tissus sains et des tissus bénins

		Tissus sains	Tissus bénins
Taille échantillon, N :		29	28
Longueurs séquence sans gaps, L :		560	560
Sites polymorphiques, V:		95 (16,99%)	68 (12,14%)
Sites variables informatifs, Pi:		28 (29,47%)	39 (57,36%)
% total de mutations, Eta:		102 (18,25%)	73 (13,06%)
Nature des mutations	Trs, s:	69,01%	67,76%
	Trv, v	30,99%	32,24%
Rapport Trs/trv, R		2,267	2,049

Le tableau XII des fréquences nucléotidiques montre que les bases C et A sont les plus fréquentes avec respectivement 30,12% et 27,69% pour les TB et 30,01% et 27,44% pour les TS. Il en est de même du couple T+C qui est supérieur à l'association A+G pour les TB comme pour les TS.

Tableau XII: Fréquences nucléotidiques des séquences.

	T%	C%	A%	G%	(T+C)%	(A+G)%
Tissus sains	24,99	30,01	27,44	17,56	55,00	45,00
Tissus bénins	24,95	30,12	27,69	17,12	55,07	44,93

II.3.1.2.3.2 DIFFERENCIATION ET STRUCTURE GENETIQUE DES POPULATIONS

Les distances génétiques (tableau XIII) qui rendent compte de la différence génétique intra et inter-tissus ont, dans un premier temps, été calculées, pour chaque population et ensuite pour les différents groupes répartis en individus appartenant ou non à l'haplogroupe L. La distance génétique entre tissus bénins des femmes sénégalaises étudiées (0,024) est légèrement plus élevée que celle observée entre les tissus sains (0,023). Cependant, la distance génétique intergroupes TS nL et TB nL (0,017) est plus petite que celle entre TS L et TB L (0,025).

Tableau XIII: Distances génétiques des populations et groupes de populations.

Groupes		Distances génétiques intra-groupes	
TS	TSL	0,015	0,023
	TS Nl	0,024	
TB	TBL	0,030	0,024
	TBnL	0,008	

Distances génétiques inter-groupes				
	TS nL	TS L		
TB nL	0,017		TS	
TB L		0,025	TB	0,025

TS L: tissus sains appartenant à l'haplogroupe L
TB nL: tissus bénins n'appartenant pas à l'haplogroupe

Le tableau XIV révèle un Fst non significatif égal à 0 pouvant illustrer une très faible différenciation entre populations saines et populations affectées. Alors que les valeurs entre populations réparties en fonction des haplogroupes se révèlent modérées et significatives, avec des valeurs existant entre groupes de tissus issus des populations (TS L et TB L) appartenant à l'haplogroupe L (Fst = 0,077) et entre groupes de tissus des populations (TS nL et TB nL) n'appartenant pas à l'haplogroupe L (Fst = 0,067) plus faible. Nous remarquons aussi un Fst (0,213) entre groupes de tissus TS L et TS nL plus grand que le Fst existant entre groupes de tissus bénins TB L et TB nL (0,149).

Tableau XIV: Valeurs de la différentiation génétique (Fst) entre les populations et groupes de populations.

Différentiation génétique (Fst)					
			TS L	TS nL	TB nL
TB	TS	TS nL	0.213 *		
	0,0000	TB L	0.077 *		
	(p = 0,0991)	TB nL		0.067 *	0.149 *

TS= Tissus Sains
TB= Tissus Bénins

* P-value = 0.000

II.3.1.2.3.3 EVOLUTION DE LA D-LOOP

Une forte diversité haplotypique (Hd) et une diversité nucléotidique (Pi) faible sont observées avec 1 et 0,0238 pour les tissus bénins, et 0,998 et 0,022 pour les tissus sains respectivement. Ces résultats montrent en plus que les indices Hd et Pi des tissus bénins sont légèrement supérieurs à ceux des tissus sains. Dans le tableau 36 sont consignées les valeurs des indices de diversité génétique (Hd et Pi) des TS et des TB. (Tableau XV)

Tableau XV: Diversités haplotypique (Hd) et nucléotidique (Pi) des tissus sains et tissus bénins.

	Tissus sains	Tissus bénins
Nombre d'haplotypes, h :	28	28
Diversité haplotypique, Hd ± sd :	0,998 ± 0,01	1 ± 0,01
Diversité nucléotidique, Pi ± sd :	0,0220 ±0,0058	0,0238 ±0,0031

Le D de Tajima (-1,1134), le D* (-1,2926) ainsi que le F* (-1,4558) de Fu and Li montrent, pour l'ensemble des tissus bénins, des valeurs négatives et non significatives. Le H de Fay and Wu se révèle nul et non significatifs alors que le Fs de Fu (-18,22) est négativement significatif (Tableau XVI).

Tableau XVI: Test de neutralité

	Tissus bénins
D de Tajima	-1,1134
P-value	P > 0,1
D* de Fu and Li	-1,2926
P-value	P > 0,1
F* de Fu and Li	-1,4558
P-value	P > 0,1
H de Fay and Wu	0,00
P-value	P > 0,1
Fs de Fu	-18,22
P-value	0,000

Les représentations graphiques de la distribution des distances génétiques existant entre les tissus bénins des patientes pris deux à deux ou Mismath distribution (figure 25), selon l'hypothèse d'une population constante ou d'une population en expansion, montrent une distribution multimodale.

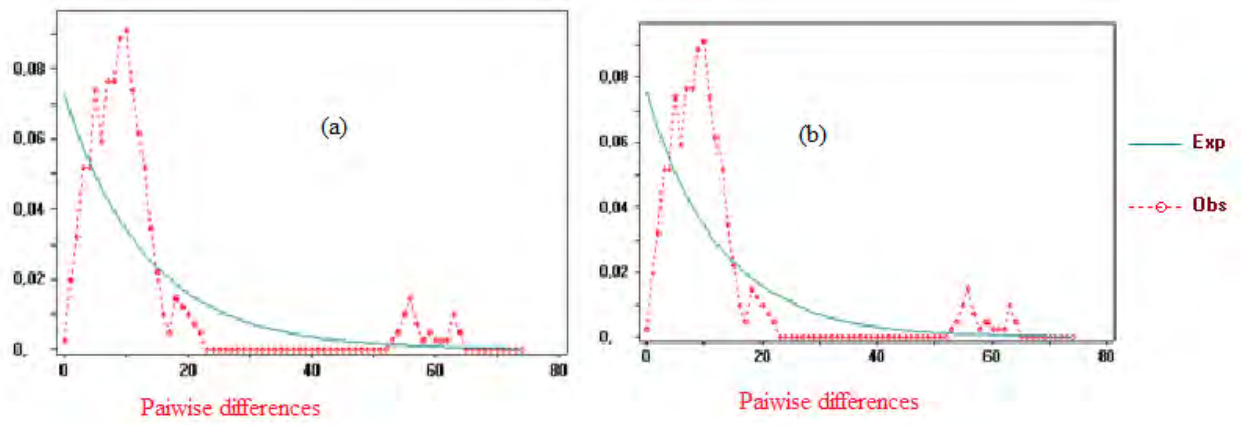


Figure 18: Courbes de mismatch distribution de la D-Loop des tissus bénins sous l'hypothèse

II.3.1.2.3.4 ETUDE SUR L'INCIDENCE DES TUMEURS BENIGNES

Le tableau XVII montre une différence significative de la présence de tumeurs bénignes, entre les patientes très jeunes, âgées de moins de 20 ans, dont l'âge est connue (38,09%), de celles d'au moins 20 ans (28,57%), appartenant à l'haplogroupe L, alors que dans l'ensemble 52,38% ($p = 0,011$) ont 20 ans ou plus. Parmi les patientes dont le type de tumeur est connu, 76,47% ($p = 0,026$) sont atteintes d'adénofibrome dont 52,94% sont de l'haplogroupe L, avec une présence non négligeable de tumeurs kystiques, épithéliales, et de HSTP bien notée (11,77%, $p < 0,05$) chez les patientes d'haplogroupe asiatique (B et M).

Tableau XVII: Comparaison entre haplogroupes de la *D-loop*, âge des patientes et type des tumeurs bénignes.

Haplogroupes TB		Âge				Typologie			
		< 20 ans	≥ 20 ans	ND	P-value	Adénofibrome	Autres	ND	P-value
L	64.29%	8 (38,09%)	6 (28,57%)	4	p < 0.05	9 (52,94%)	2 (11,77%)	7	p > 0.10
B & M	32.14%	2 (9,52%)	4 (19,04%)	3	p > 0.10	3 (17,65%)	2 (11,77%)	3	p < 0.05
U	3.57%	-	1 (4,76%)	-	0.05< p <0.1	1 (5,88%)	-	-	p > 0.10
Total	100%	10 (47,61%)	11 (52,38%)	7	0.011	13 (76,47%)	4 (23,53%)	10	0.026

Pour le microsatellite situé entre les positions 303 et 316 de la région non codante de la molécule d'ADNmt, trois (3) haplotypes ont été observés chez les patientes et deux (2) chez les sujets sains. Une séquence témoin a été obtenue pour les femmes sénégalaises pour la région *D310*. Elle est constituée dans le deuxième tronçon de 6C au lieu de 5C et est identifié chez la presque totalité (96,55%) des sujets sains dans cette étude. L'haplotype C309CC identifié seulement chez les patientes montre une présence très significative (avec 35,71 % ; $p = 6,42e^{-13}$). La comparaison des fréquences de l'haplotype témoin entre les patientes (60,71%) et les sujets sains

(96,55%) donne une valeur de p-value très significative ($p = 4,41e^{-11}$) associée d'une valeur de l'Odd ratio égale à 0,0472. L'haplotype C309T n'est porté que par un seul individu sain alors que l'haplotype C311T est présente chez une seule patiente. Toutes ces différences de polymorphisme notées dans le tableau 39 se caractérisent par une substitution d'une base C par une base T, à l'exception de l'insertion C309CC (Tableau XVIII).

Tableau XVIII: Comparaison entre haplotypes du microsatellite mitochondrial 303-316 (*D310)*

Motifs	Séquence entre pb 303 et 316	TS (n=29)	TB (n=28)	P-value	OR	95% CI
Témoin	CCCCCCCTCCCCCC	28 (96,55%)	17 (60,71%)	* $4.41e^{-11}$	0.0472	0.0140 - 0.1592
C309CC	CCCCCCC**C**TCCCCCC	-	10 (35,71%)	* $6.42\ e^{-13}$	-	-
C309T	CCCCCC**T**TCCCCCC	1 (3,45%)	-	0.1213	-	-
C311T	CCCCCCCTT**T**CCCCC	-	1 (3,57%)	0.1213	-	-

II.3.2 DISCUSSION

Dans cette présente étude, un total de 28 patientes atteintes de tumeurs bénignes du sein et 29 sujets témoins ont été analysés dans le but de déterminer la diversité et l'évolution génétique de la *D-loop* dans les tumeurs bénignes du sein chez les femmes sénégalaises. Parmi les variants les plus en communs, les mutations G16390A; T16519C; A73G; T146C; C182T; T195C; A263G; et C315CC présentent un Odd ratio inférieur à 1 (OR < 1) autrement dit une réduction du risque relatif (RR), et donc un facteur préventif à la présence de tumeur bénigne du sein, à l'exception de la mutation T152C (OR = 1,0186) plus présente de façon non significative (p = 0,9281) chez les patientes (78,57%) que chez les sujets sains (55,17%). Deux variants en commun ont également été identifiés, dont C150T, associé dans certaines études à la longévité (Chen *et al*., 2012). Elle est plus fréquente de façon significative ($p = 1.01e^{-05}$) dans les tissus sains que dans les tissus bénins avec un OR = 0,3007. De même que la mutation G247A, mais avec p = 0,0486 et OR = 2.0798. Ainsi la mutation C150T pourrait donc être associée à une protection à la présence de tumeur bénigne au sein alors que la mutation G247A serait impliquée à une augmentation du risque. Une différence très significative ($p < 2,32e^{-07}$) a été observée pour toutes les plus fréquentes des mutations spécifiques aux patientes (G79T ; G81T ; G97A ; G228A ; T310C) par rapport au groupe témoin. Ces mutations pourront être associées à la présence de tumeur bénigne du sein chez les femmes sénégalaises, tandis que les mutations C16478A, C151G, T204G, et G207A seraient associées à une absence de tumeurs car seulement présentes de façon significative (p < 0,0002) chez les sujets sains.

De nombreuses études ont fait état de plusieurs mutations détectées à la fois dans les gènes de l'ADN mitochondrial humain et dans la principale région non codante (la *D-loop*). Dans la littérature, certaines études suggèrent l'implication des mutations de cette région de contrôle de l'ADNmt contenant les principaux promoteurs, dans la carcinogenèse humaine (Lee *et al*., 2004 ; Van Trappen *et al*., 2006 ; Sharawat *et al*., 2010). Plusieurs études ont de même rapporté la présence des mutations T146C, T152C, C150T et autres polymorphismes dans les cellules tumorales (Chen *et al*., 2004; Yoneyama *et al*., 2005) et dans divers tissus et fluides corporels (Fliss *et al*., 2000 ; Jerónimo *et al*., 2001 ; Zhu *et al*., 2005 ; Wang *et al*., 2011). La mutation C150T en particulier était significativement indiquée pour un risque accru de cancer du col utérin chez les femmes chinoises (Zhai *et al*., 2011) alors que T16519C s'est avérée augmenter le risque de cancer du sein (Bai *et al*., 2007). Ces résultats montrent ainsi que ces polymorphismes mitochondriaux spécifiques peuvent être utiles pour la mise en place de biomarqueurs en vue d'une détection précoce des tumeurs.

L'étude des patientes portant certaines de ces mutations mitochondriales a été poursuivie afin de distinguer les haplogroupes qui sont plus à risque de développement d'une tumeur bénigne du sein. Et une prévalence de la présence de tumeurs bénignes au sein, plus élevée et significative (p = 0,0104) avec un OR = 2,1728 dans un intervalle de confiance IC à 95% = (1.2320 - 3.8322) pour les haplogroupes mitochondriaux d'origine subsaharienne (essentiellement L) et une prévalence significativement plus faible ($p = 4{,}05e^{-07}$) avec un OR = 0.0927 dans un IC à 95% = (0.0313 - 0.2748) pour les haplogroupes d'origines européennes et berbérophones, ont été remarquées chez les patientes par rapport au groupe témoin. Malgré la prévalence élevée non significative observée pour les haplogroupes d'origine asiatique, on serait tenté de dire que plus les tissus mammaires des femmes sénégalaises sont de l'haplogroupe mitochondrial L, plus le risque de contracter une tumeur bénigne du sein augmente, alors que les haplogroupes (H et T en particulier) d'origines européennes et berbérophones auraient un effet protecteur sur cette population d'étude.

La composition en haplogroupe mitochondrial de cette population a révélé un large spectre des haplogroupes d'origines géographiques différentes. Il s'est avéré qu'au cours des premières colonisations humaines, les populations issues d'Europe et d'Asie ont amené avec elles une fraction de leur variabilité génétique, laissant paraitre au sein de l'Afrique subsaharienne des haplogroupes non-africaines (Cann, Stoneking, et Wilson, 1987; Excoffier, 2002; Jakobsson *et al*., 2008; Li *et al*., 2008), tel que mise en évidence dans cette population d'étude sénégalaise. En effet, Chen *et al*., (1995), dans une étude sur la variation de l'ADNmt dans les populations africaines, remarquaient que : « en plus de l'haplogroupe L, d'autres haplogroupes qui étaient plus similaires à ceux notés chez les européens et les asiatiques étaient présents chez les sénégalais ». Cela en raison des longues interactions culturelles et économiques qui ont eu lieu avec les populations sahariennes et nord-africaines, et des échanges génétiques d'avec les populations européennes. Cependant, d'après Torroni *et al*., 1994a ; 1994b ; 1994c ; 1994d, l'haplogroupe africain L est le plus divergent et le plus ancien par rapport aux haplogroupes spécifiques aux continents asiatique, européen et amérindien. Ainsi cette prévalence élevée notée pour les sujets appartenant à l'haplogroupe L laisse suggérer que celle-ci puisse être le fruit de cette divergence élevée. Etudier ces différents variants observés aujourd'hui dans ces divers haplogroupes et sous haplogroupes, en particulier ceux de la lignée L, permettra certainement de mieux identifier les mutations responsables des maladies bénignes du sein, mais également de comprendre l'histoire évolutive de l'Homme sénégalais.

Sur une population, le niveau de diversité génétique et de la variabilité des fréquences alléliques dépend de l'action respective de quatre forces évolutives pouvant interagir les unes avec les

autres : la mutation, la sélection, la migration et la dérive. Elles sont à l'origine de la structure de la diversité génétique et de son évolution (William, 2011). Dans le cadre de la génétique des populations, ces polymorphismes renseignent sur les différents processus d'ordre génomique, démographique et sélectif qui sont à la base de la variabilité génétique des populations humaines (Quach, 2010). Afin d'examiner l'effet de ces forces évolutives dans cette population d'étude, plusieurs paramètres ont été étudiés.

Ainsi, il a été remarqué dans les résultats que les sites informatifs en parcimonie ainsi que le nombre de transversions sont plus importants dans les TB que dans les TS. Ce qui conduit à une valeur de la distance génétique intra tissus bénins plus élevée qu'au niveau des TS.

Les Fsts obtenus ont aussi permis d'observer une différenciation génétique modérée entre populations (TS L et TB L) appartenant à l'haplogroupe L (Fst = 0,077) et celle existant entre les populations (TS nL et TB nL) n'appartenant pas à l'haplogroupe L (Fst = 0,067). Ces résultats corrélées aux valeurs des distances génétiques inter populations appartenant à l'haplogroupe L (D = 0,025) et celle existant entre les populations n'appartenant pas à l'haplogroupe L (D = 0,017), illustrent l'existence d'une différence génétique entre les tissus sains et les tumeurs bénignes, mais aussi appuient le fait que le risque de contracter une tumeur bénigne du sein soit associé aux femmes sénégalaises dont l'haplogroupe mitochondrial est L, qui présentent une valeur de D et un Fst supérieurs à ceux observés pour les populations n'appartenant pas à l'haplogroupe L. Cependant, cette différence notée entre les populations appartenant à l'haplogroupe L (TS L et TB L) et les populations n'appartenant pas à l'haplogroupe L (TS nL et TB nL) encore plus faible, pourrait aussi être le fruit de leur histoire génétique différente. En effet, selon Quach (2010) les populations africaines montrent un profil de variabilité génétique compatible avec une expansion, alors que la variabilité présente dans les populations non-africaines est compatible à un goulot d'étranglement qui se serait produit lors de la sortie d'Afrique des hommes modernes pour coloniser le monde. Et les diverses analyses en génétique des populations conduites dans des régions neutres du chromosome Y, de l'ADN mitochondrial, et sur de grands nombres de loci indépendants du génome, montrent que les populations non-africaines semblent avoir subies une réduction drastique de leur diversité génétique avant de connaitre une ré-expansion à partir de cette faible diversité (Vasseur, 2011 ; Patillon, 2014).

Une étude comparative des différenciations génétiques existant entre les tissus mammaires appartenant à l'haplogroupe L et les tissus mammaires n'appartenant pas à l'haplogroupe L a été réalisée, non pas pour confirmer la forte différenciation génétique existante déjà entre ces haplogroupes, mais plutôt pour comparer ces différences entre TS et TB. Ainsi, le Fst observé entre TB L et TB nL (Fst= 0,149) plus faible que le Fst existant entre TS L et TS nL (Fst=

0,213), laisse supposer un certain rapprochement de ces tumeurs bénignes du sein. Une étude plus poussée des mutations spécifiques aux tumeurs bénignes du sein, de même qu'une étude de la différenciation génétique de ces tumeurs en fonction des paramètres clinicopathologiques pourraient s'avérer très édifiantes, afin d'éclairer ce rapprochement.

L'analyse de la variabilité génétique de la *D-loop* des tissus du sein a montré une forte diversité haplotypique (Hd) et une diversité nucléotidique (Pi) faible, aussi bien dans les tissus bénins que dans les tissus témoins avec une légère supériorité des indices Hd et Pi dans les TB. Ce qui laisserait croire à une croissance rapide des cellules mammaires, plus accentuée au niveau des tumeurs bénignes du sein. En général les cellules tumorales se caractérisent par une multiplication cellulaire plus rapide, due à la présence des altérations au niveau des gènes qui régulent la prolifération dans les cellules normales (ou proto-oncogènes), qui s'activent alors en oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs (ou anti-oncogènes), associés à un dysfonctionnement de l'ADN face à la régulation du cycle cellulaire et au système de réparation du génome (Poehlmann et Roessner, 2010 ; Hanahan et Weiberg, 2011). Ce sont en réalité les mutations qui constituent la source fondamentale de la variation génétique à l'origine de la diversité pour tous les organismes, jouant ainsi le rôle de moteur de l'évolution (Parent, 2008 ; William, 2011). Cependant, d'après le modèle de Motoo Kimura, appelé « théorie de la mutation et de la dérive aléatoire » : la plus grande partie de la variabilité génétique est neutre et les polymorphismes sont éliminés ou fixés dans les populations sous l'influence des effets environnementaux de la dérive génétique (Bergeault, 2010).

Dans le but d'estimer l'influence des processus neutres et des processus sélectifs, l'étude de l'évolution de la D-loop chez les patientes sénégalaises a été réalisée. Et les résultats obtenus révèlent pour les tests de neutralité des valeurs négatives et non significatives du D de Tajima, du D* et F* de Fu and Li, rejettant ainsi l'idée d'une sélection possible de la *D-loop*. Cette tendance a été confirmée par la valeur du Fs de Fu qui est significativement négative, de même que par le H de Fay and Wu qui s'est révélé nul et non significatif. En effet, pour des séquences non codantes comme la région de contrôle de l'ADN mitochondrial, un écart à la neutralité s'expliquerait plus vraisemblablement par des fluctuations démographiques récentes que par la sélection (Razafindrazaka, 2010), en d'autres termes cette évolution serait due à un excès de mutations récentes, à l'origine de cette présence de légions bénignes au sein. Ces résultats sur l'évolution de la D-loop semblent bien confirmer le caractère non létale des tumeurs bénignes contrairement aux tumeurs cancéreuses pour lesquelles il a été démontré que le Cyt b est sous sélection (Mbaye et al., 2012).

Les courbes de mismatch distributions qui ont montré une distribution multimodale pour les tissus bénins avec un écart de la distribution observée par rapport à celle attendue, suggèrent la signature d'une population constante ou même d'une croissance modérée. Cependant, chez l'homme y compris dans les populations naturelles, il est bien rare de constater des effectifs constants (Reich *et al*., 2002; Marth *et al*., 2003; Voight *et al*., 2005 ; Bergeault, 2010).

Dans l'étude sur l'incidence des tumeurs bénignes du sein chez les femmes sénégalaises, la mise en rapport des haplogroupes et des paramètres clinicopathologiques en l'occurrence l'âge et la typologie a révélé chez les patientes d'haplogroupes L, une prévalence significative pour les plus jeunes patientes, âgées de moins de 20 ans, alors que dans l'ensemble une prévalence significative est observée pour les patientes âgées de 20 ans ou plus. En outre, une incidence significative des adénofibromes a été notée parmi les tumeurs bénignes du sein présentes dans cet échantillon.

L'analyse du polymorphisme du microsatellite situé entre les positions 303 et 316 de la *D-loop*, a révélé que sur l'ensemble des 28 patientes étudiées, 17 (soit 60,71 %) ont en commun l'haplotype témoin avec la majorité des sujets sains (soit 96,55%) et près de 1/3 des patientes (35,71%) présentent l'haplotype C309CC spécifique aux TB. Après comparaison de la distribution des fréquences haplotypiques entre les porteuses de tumeurs bénignes au sein et les femmes saines une valeur de p-value très significative ($p = 4{,}41e^{-11}$) associée d'une valeur de OR = 0,0472 a été observée pour l'haplotype témoin et, pour le motif C309CC une présence très significative (avec $p = 6{,}42e^{-13}$) a été remarquée. Ces résultats corrélatifs signifieraient que, parmi les sénégalaises présentant l'haplotype témoin, près des 2/3 sont susceptibles de contracter une tumeur au sein alors que celles présentant l'haplotype C309CC, constituent un groupe à risque accru. Cependant, l'étude d'un effectif plus important de patientes et de témoins devrait être envisagée pour confirmer ces résultats.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION

Au Sénégal, comme dans la plupart des pays d'Afrique sub-sahariens, les tumeur Bénignes du sein constitue le frappent le plus souvents les jeunes femmes et les adolescentes. Elles constituent une source d'inquiétude importante car elles posent le problème de diagnostis et de traitement mais aussi enrôlent la patiente et son entourage dans une inquiétude permanent à cause de la hantise du cancer.

De nos jours, un certain nombre de facteurs de risque de développement des tumeurs bénignes du sein sont reconnus.

Cependant, aucun facteur n'a pu être impliqué directement dans l'étiopathogénie de ces tumeurs bénignes.

Néanmoins, certains facteurs étiologiques sont de plus en plus soupçonnés de contribuer au développement de tumeur sein. Ils font, de plus en plus, l'objet de sujet de recherche. En effet de nombreuses tumeurs sont aujourd'hui associées de façon spécifique à l'apparition de mutations génétique dans les cellules.

La relation entre tumeur bénigne et mutation a déjà fait l'objet de nombreuses études dont les plus récentes ont permis d'identifier des altérations dans les cellules du stroma qui peuvent être critiques pour la progression des tumeurs bénignes en cancer invasif (Magdalena *et al.*, 2010).

Mais aborder les processus de la tumorigenèse par l'analyse moléculaire de l'ADNmt reste à l'heure actuelle un défi car de nombreux facteurs doivent être pris en compte puisqu'ils augmentent la complexité et les difficultés d'analyse et d'interprétation des résultats obtenus.

Les résultats du deuxième chapitre du travail ont permis en somme de conclure qu'au Sénégal :

- Dans cette partie portant sur les mutations du *Cyt-b*, les études reliant les mutations de la lignée germinale de l'ADNmt aux tumeurs bénignes relèvent beaucoup d'ambiguïtés à cause de sa grande variabilité génétique. Mais celle sur les mutations somatiques s'est avérée décisive dans l'identification des mutations impliquées dans la genèse et l'évolution des tumeurs. Dans cette partie on a noté que 50% des mutations identifiées, sur les tumeurs bénignes, ont conduit à un changement d'acides aminés dans 71,43% des cas et 12,5% à un changement de cadre de lecture sur 6,8% des cas. Ce qui permet de conclure que ces mutations sont d'une importance fonctionnelle dans l'évolution des tumeurs mammaires ou à la limite dire que ces altérations génétiques du *Cyt-b* seraient impliquées dans l'évolution du tissus sain vers des tumeurs bénignes du sein.
- Et dans cette autre partie sur la *D-Loop* : l'objectif d'établir une corrélation entre les variabilités de la *D-loop* de l'ADNmt et l'apparition chez les femmes sénégalaises de

tumeurs bénignes au sein, nous avons voulu rendre compte la complexité de l'étude génétique des tumeurs qui constituent une conséquence des altérations de l'ADN. Cette étude vise à situer la diversité génétique de la population affectée par rapport à la normale. Tout d'abord une grande diversité haplotypique est notée pour l'ensemble des individus étudiés. Mais les résultats ont révélé une présence significative de variants spécifiques aux tumeurs bénignes du sein et ceux des tissus sains. La mutation C150T est associée à la protection à la présence de la tumeur et celle G247A est impliquée à une augmentation de risque. Ensuite les résultats de la recherche de femmes sénégalaises qui seraient exposées a permis de confirmer que : les individus de l'haplogroupe mitochondrial L sont significativement les plus vulnérables contrairement à ceux des haplogroupes d'origine européenne et berbérophone qui seraient moins affectés. Mais il faut préciser au passage que la *D-Loop* n'est pas sous sélection et que les cellules tumorales se multiplient plus rapidement que celles qui sont saines. A ceci, il faudra ajouter que la différentiation des individus a permis de constater une relation qui existerait entre les tumeurs et la typologie des lésions ou entre tumeurs et l'âge des patientes ou de manière générale entre les tumeurs et les paramètres cliniques. Enfin la recherche de l'incidence des mutations observées sur le microsatellite situé entre les positions 303 et 316 de la *D-Loop* chez les femmes sénégalaises a permis, à partir des résultats obtenus, d'attribuer à l'haplotype C309CC un risque élevé de contracter une tumeur bénigne du sein contrairement à celles qui portent l'haplotype témoin, elles sont susceptibles de contracter une tumeur du sein.

Ces résultats du deuxième chapitre représentent un argument en faveur de la justification de la contribution des mutations génétiques à faible pénétrance (*Cyt-b* et *D-Loop*) dans les tumeurs bénignes du sein. En effet, ces pathologies mammaires bénignes sont des maladies multifactorielles où plusieurs facteurs (hormonaux, environnementaux et génétiques) ont été associés avec la physiopathologie de ces tumeurs. Ainsi, il est probable que les mutations observées interagissent avec certains de ces facteurs, conduisant au développement des tumeurs du sein.

Si les résultats de l'implication de ces mutations dans les tumeurs bénignes du sein se confirment, leurs détections au stade précoces pourrait mener à la mise au point de nouveaux moyen de diagnostic des tumeurs bénignes et des traitements préventifs seraient envisageables.

L'ensemble des difficultés rencontrées avant d'arriver à obtenir ces résultats présentés dans ce manuscrit, nous incite à prodiguer des.

PERSPECTIVES

Bien que nos résultats concourent à une réponse favorable à la question de recherche de solution face à ce fléau qui monte en puissance dans notre pays, il n'empêcherait pas de proposer un certain nombre de perspectives qui permettraient de résoudre de manière définitive cette question. Nous donnerons en premier les perspectives sur les travaux faits sur le *Cyt-b* et en deuxième celles sur la *D-Loop*.

En considérant cette hypothèse de cette étude selon laquelle les altérations génétiques du *Cyt-b* seraient impliquées dans l'évolution des tumeurs bénignes du sein, il n'en reste pas moins que tous les variants (mutations) identifiés dans cette étude comme étant des cibles potentielles de sélection positive, pourraient avoir un impact fonctionnel dans l'évolution des tumeurs bénignes du sein. En effet, bien qu'il existe plusieurs rapports portant sur les mutations du *Cyt-b* dans diveres tumeurs d'origine anatomique différente, l'effet fonctionnel de celles-ci dans le métabolisme et la croissance cellulaire n'est pas clairement élucidé. Ainsi, cette étude ayant un rôle prédictif, nos résultats ouvrent la voie à de futures études biochimiques, protéomiques et cliniques afin de déterminer l'effet de ces mutations somatiques dans le métabolisme énergétique des cellules tumorales.

Néanmoins, la génétique des populations, via la détection de signature de sélection au niveau génomique, constitue une bonne alternative aux études cliniques et épidémiologiques dans la recherche de gènes ou de variants impliqués dans les cancers et dans les maladies humaines.

En ce qui attrait aux résultats obtenus avec la *D-Loop*, ces hypothèses nécessitent d'être confirmées par une analyse multiplexe de gènes et ou de microsatellites dans un plus grand nombre d'échantillons. Ce travail a aussi été limité par l'absence de renseignements clinicopathologiques intégrales des patientes qui devraient être associés aux données génétiques. Dans le cadre d'une recherche plus poussée sur les tumeurs bénignes du sein et sur le cancer, l'étude des gènes dont l'expression dépend de la *D-loop* devraient aussi être envisagé, afin d'estimer l'impact des altérations de cette régions de contrôle sur ceux-ci.

REFERENCES

A

Anderson S., Bankier A.T., Barrel B.G., DE Bruijn M.H.L., Coulson A.R., Drouin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F., Schreier., Smith A.J., Staden R. & Young I.G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*; 290: 457-465.

Andrews R.M., Kubacka I., Chinnery P.F., Lightowlers R.N., Turnbull D.M. & Howell N. (**1999**). Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genetics* 23 (2): 147.

Antoniou AC, Pharoah PDP, McMullen G, et al.(**2002**). A comprehensive model for familial breast cancer incorporating *BRCA 1*, *BRCA 2* and other genes. *Br. J. Cancer*, 86: 76-83.

Aral, C., Kaya, H., Ataizi-Celikel, C., Akkiprik, M., Sonmez, O., Gulluoglu, B.M. and Ozer, A. (2006) A Novel Approach for Rapid Screening of Mitochondrial *D310* Polymorphism. *BMC Cancer*, 6, 21.

Ashikari R, Farrow JH, O'Hara J. (**1971**). Fibroadenomas in the breast of juveniles. *Surg Gynecol Obstet*,132(2):259-262.

B

Bai R. K., Leal S. M., Covarrubias D., Liu A. and Wong L. J. (**2007**). Mitochondrial genetic background modifies breast cancer risk. *Cancer Research*, 67(10), 4687-4694.

Bazzochi F et al. (**1986**). Juvenile papillomatosis (epitheliosis) of the breast. *Am. J.Clin.Pathol*, 86: 745.

Beckman, K.B, Ames, B.N. (1997). Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem*, 272: 19633-19636.

Belkacémi Y, Laharie-Mineur H, Gligorov J, Azria D. (**2007**). Bénéfice et risques potentiels de l'association du trastuzumab à la chimiothérapie et à la radiothérapie dans le cancer du sein non métastatique. *Cancer/Radiothér*, 11 : 266-75.

Bénard J. et Larsen C.J. (2013). Une vision élargie des modèles explicatifs de la biologie des cancers. *Bulletin du Cancer*, 100: 697-713.

Benhassouna J et al. (2006) . Phyllodes tumors of the breast: a case series of 106 patients. *The American Journal of Surgery* , 192 : 141Ŕ147.

Bergeault K. (2010). Identification de deux gènes NPR1 chez les *Vitaceae*, analyse de leur diversite de sequences et interactions avec les facteurs de transcription *VVTGA*. Thèse Universite de Haute-Alsace. 173p

Berkowitz GS, Kelsey JL, Holford TR, et al. (1985). Estrogen remplacement therapy and fibrocystic breast disease in postmenopausal women. *Inst J Epidemiol, 121:238-45.*

Berkowitz GS, Kelsey JL, Livolsi VA, et al. **(1984).** Exogenous hormone use and fibrocystic breast disease by histopathologic component. *Inst J Cancer, 34: 443-9.*

Berkowitz GS, Kelsey JL, Livolsi VA, et al. (**1985).** Risk factor for fibrocystic breast disease and its histopathologic components. *J Natl Cancer Inst, 75: 43-50.*

Bodian CA, Perzin KH, Lattes R, Hoffmann P, et Abernathi TG (1993). Pronostic significance of benigne proliferative breast disease. *Cancer*, 71: 3896-390.

Body G, Gailler B, Chapiron C, Bougnoux A.(2005). Tumeurs du sein. *Re. Prat, 55 : 303-360.*

Bogorad RL, Courtillot C, Mestayer C, Bernichtein S, Harutyunyan L, Jomain JB, Bachelot A, Kuttenn F, Kelly PA, Goffin V, Touraine P. (2008). Identification of a gain-of-function mutation of the prolactin receptor in women with benign breast tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105:14533-14538

Boisvert G. (2013). Les lésions bénignes du sein. Spécial cancer du sein. *Le patient* Volume. 7, nº 3, 38-41

Bonafos M, Le Canelier. (**1971).** Les cancers génitaux et mammaires de la femme algérienne**.** *Rev. Afr.Noire*, 18 :235-240.

Bonnier P, Martin P M, Taranger-Charpin C et Piana L (2005). Tumeurs du sein (159)-tumeurs et kystes du sein. DCEM 3 – Module optionnel n° 15 Santé de la mère et de l'enfant. Faculté de Médecine de Marseille. 32p

Bostwick D.G., Alexander E.E. & Singh R. (**2000**). Antioxidant enzyme expression and reactive oxygen species damage in prostatic intraepithelial neoplasia and cancer. *Cancer*, 89: 123-134.

Bousquet G. (2005). Tumeurs phyllodes et sarcomes primitifs mammaires : etude retrospective multicentrique internationale a propos de 443 tumeurs phyllodes et 102 sarcomes primitifs mammaires. Lille,These medecine.

Boveri T.(1914). Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. *Jen,* Gustav Fischer Verlag,.

Brinton LA, Vessey MP, Flavel R and Yeates D. (1981). Risk factors for benign breast disease. *Am J Epidemiol*, 113: 203-214.

Broca P. (**1866-1869**). Traité des tumeurs. *Paris: Asselin*, 80-5.

Burstein H.J, Polyak K, Wong J.H, Lester C.S. & Kaelin C.M. (2004). Ductual carcinoma in situ of the breast. *The New England Journal of Medicine*; 350 (14): 1430-1441.

C

Cann R. L, Stoneking M, and Wilson A. C. (1987). Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature,* 325:31-36.

Canny PF, Berkowitz GS, Kelsey JL, et al. **(1988).** Fibroadenoma and the use of exogenous hormones: a case-control study. *Am J Epidemiol, 127: 454-61.*

Cavalli-Sforza, L.L. (1966). Population structure and human evolution. *Proc R Soc Lond B. Biology Science*, 164:362-379.

Chauvet M P, Jafari M, Lambaudie E and Giard S (2006). Benign tumors and complex lesions: Surgeon's point of view. 28èmes journées de la SFSPM, Lille. 355-360.

Chen. A, Raule. N, Chomyn. A and Attardi. G. **(2012)** Decreased Reactive Oxygen Species Production in Cells with Mitochondrial Haplogroups Associated with Longevity. *PLoS ONE*, **7**, e46473. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0046473.

Chen, J.Z. and Kadlubar, F.F. (2004). Mitochondrial Mutagenesis and Oxidative Stress in Human Prostate Cancer. *Journal of Environmental Science and Health*, *Part C*: *Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*, **22**, 1-12. http://dx.doi.org/10.1081/GNC-120037931.

Chinnery. P.F, Samuels. D.C, Elson J & Turnbull. D.M. **(2002)**. Accumulation of mitochondrial DNA mutations in ageing, cancer, and mitochondrial disease: is there a common mechanism? *Lancet*, 360: 1323-1325.

Classe J M, Deschamps P. (**2007**) Cancer du sein: rapport du 109ème Congrès français de chirurgie Paris 2007. Monographies de l'Association française de chirurgie *Arnette*, p152.

Cole P, Elwood J M, Kaplan S D. (1978). Incidence rates and risk factors of benign breast neoplasms. *Am J Epidemiol*, 108: 112-120.

Coller H A, Khrapko K, Bodyak N. D, Nekhaeva E, Herrero-Jimenez P. & Thilly W.G. (2001). High frequency of homoplasmic mitochondrial DNA mutations in human tumors can be explained without selection. *Nature Genetics*, 28: 147-150.

Coudray C., Torroni A., Achilli A., Pala M., Olivieri A., Larrouy G. et Dugoujon J. M., (2009). Les lignées mitochondriales et l'histoire génétique des populations berbérophones du nord de l'Afrique. *Antropo*, 18, 63-72. (www.didac.ehu.es/antropo).

Courtillot C, et al. (2005). Benign breast diseases. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 10:325–335.

D

Dangou JM, Ndiaye-BA N, Ndiaye PD. **(2002).** Valeur diagnostique de la cytologie mammaire en pathologie tumorale. *Rev Afr. Pathologie*, 42, 10.

Dani M A, Dani S.U & Lima S. P. (2004). Less deltamtDNA4977 than normal in various types of tumors suggests that cancer cells are essentially free of this mutation. *Genetics Molecular Research*, 3: 395-409.

Darboux R, Zevounou L, Sotton D (1994). Aspects cyto-anatomopathologiques des tumeurs du sein au Bénin. *J, Soc,Biol, Clin, Bénin*, 1 :64-73.

Dasgupta S, Hoque M. O & Upadhyay S. (**2008**). Mitochondrial Cytochrome B Gene Mutation Promotes Tumor Growth in Bladder Cancer. *Cancer Research*, 68:700-706.

Delozier T (2010). Hormonothérapie du cancer du sein. *Jour Gyn Obst et Bio Reprod*, 39 (8) :71-78.

Deschildre L, Hurtevent-Labrot G, Savage J, Bercez H, Taieb S and Ceugnart L (2006). Imaging of benign tumors and complex mastopathy. Aspects radiologiques, 28ème journées de la SFSPM, Lille. 346-354

Di Mauro S. & Schon EA.(2001). Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Am. J. Hum. Genet,* 106, 18-26.

Diallo M. S, Diallo S. B, Camara M. D, Diallo F. B, Dieng A, Diallo Y , Diaw S. T. **(1996).** Les tumeurs du sein: épidémiologie, clinique, anatomie pathologique et Pronostic. Med d'Afrique Noire, 43 (5)

Diarra Y. (2002). Corrélation radio clinique et anatomopathologique des nodules du sein. Thèse Med: Bamako (Mali), M32.

Doll R et Peto R. **(1981).** The causes of cancer. *JNCI,* 66. 1197-1312.

Dupont W D and Page D L. (1987). Breat cancer risk associated with proliferative disease, age at first birth, and a family history of breast cancer. *American Journal Epidemiology*. 125: 769-779.

E

Easton D. F, Bishop D. T, Ford D, Crockford G. P and the Breast Cancer Linkage Consortium. **(1993)**. Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. *Am J Hum Genet,* 52: 678-701.

Easton D. F, Ford D, Bishop D. T and the Breast Cancer Linkage Consortium. **(1995)**. Breast and ovarian cancer incidence in *BRCA1*-mutation carriers. *Am J Hum Genet,* 56: 265-271.

Eisinger F. (2005). Breast cancer screening for women with a strong familial risk. *Bulletin du Cancer*; 92 (10): 874-884.

Epié M, Tournant B. (2001). Epidémiologie des lésions bénignes du sein. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale, 812-A-10.*

Espie M, Roquancourt ADE, Tournant B, Perret F. (2002). Mastopathies bénignes et risques de cancers du sein. *Cancer*, 78 :258-266.

Esposito L. A, Melov S, Panov A, Cottrell B.A & Wallace D. C. **(1999)**. Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 4820-4825.

Excoffier L. **(2002).** Human demographic history: refining the recent African origin model. *Current Opinion Genetics Dev*, 12:675-682.

Excoffier L, Laval L.G & Schneider S. (2005). Arlequin *V3.1*: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*; 1: 47-50.

Eynde V. D, Goldmanm B. J, Magdi Y, Auf H. (2003). A new mechanism of tumor resistance to the immune system, based on tryptophan degradation by indoleamine. *Bulletin and memories of the Royal Academy of Medicine of Belgium*, 58(7-9): 356-365.

Eynde V. D, Goldmanm B. J, Magdi Y, Auf H (2012). *Le tryptophane 2,3-dioxygénase* : une nouvelle cible pour la thérapie du cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 109: 2497-2502.

F

Feraudy De (2007). Molecular mechanisms to repair of DNA damage and human tumor pathology. Role of the translesional polymerase Ƞ in DNA replication. *Thesis University Paris Descartes,* 75 pages.

Fleming NT, Armstrong BK, Sheiner HJ. (1982). The comparative epidemiology of bening breast lumps and breast cancer in Western Australia. *Int J Cancer, 30: 147-52.*

Fliss M. S, Usadel H, Caballero O. L, Wu L, Buta M. R, Eleff S. M, Jen J. and Sidransky D. (2000). Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. *Science*, 287, 2017-2019.

Foko I. Etude épidémiologique et anatomo-clinique des tumeurs bénignes du sein au MALI Thèse Med : Bamako 2004; M10.

Friend SH, Bernards R. Rogelji S et al. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. Nature 1986 323: 643-646

Fu Y.X. & Li W. H. **(1993).** Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, 133: 693-709.

G

Gauthier Philippe (2010). Apports de la biologie moléculaire pour la détection du polymorphisme de l'ADN, *Centre de Biologie et de Gestion des Populations UR022 – IRD, Montpellier*; p 1-50.

Geneviève Almouzni (2009).

Greydanus D. E, Matytsina L, Gains M. Breast disorders in children and adolescents.

Guinebretière J. M, Menet E & Fourme E.(2007). Le risque histologique, compte rendu du cours supérieur francophone de cancérologie, *Saint paul de Vence. Springer-Verlag France,* edition 2007, Paris.

Guray M and Sahin A. A. (2006). Benign breast diseases: classification, diagnosis, and management. *Oncologist,* 11(5):435-49.

H

Hall JM, Lee MK, Morrow J, Anderson L, King MC. **(1990).** Linkage of early onset of familial breast cancer to chromosomes 17q 21. *Science*, 250: 1684-1689

Hall T A. **(2001).** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acid S*, 44: 211-232.

Hanahan D and R A Weinberg. (2000). "The hallmarks of cancer." *Celll00*: 57-70.

Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: *The Next Generation Cell*, **144**, 646-674. http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013.

Hartmann L. C, Sellers T. A, Frost M. H and al. (2005). Benign breast disease and the risk of breast cancer. *New England Journal Medecine*, 353(3):229-37.

Hayashi J., Takemitsu M. & Nonaka I. **(1992).** Recovery of the missing tumorigenicity in mitochondrial DNA-less HeLa cells by intro- duction of mitochondrial DNA from normal human cells. *Somatic Cell Molecular Genetics*, 18: 123-129.

Hislop T. G, Band P. R, Deschamps M. et al. **(1990).** Diet and histologic types of benign breast disease defined by subsequent risk of breast cancer. *Am J Epidemiol,* 131: 263-270.

Hsieh C. C, Crosson A. W, Walker A. M. *et al. (1984).* Oral contraceptive use and fibrocystic breast disease of different histologic classification. *J. Natl Cancer Inst, 72: 285-290.*

Hughes L, Mansel R, Webster D. T. **(1987).** Aberrations of the normal development and involution (ANDI): a new perspective on pathogenesis and nomenclature of benign breast disorders. *The Lancet*, 330(8571):1316-1319.

Hugues, Mansel et Webster 's. **(2009).** Benign Disorders ans Diseases of the Breast, third edition, *Saunders Elsevier*.

I

IARC: International Agency for Research on Cancer. **(2012)**. World Estimate Cancer Incidence, All Ages, Female. IARC Press.

Institut Curie. **(2011)**. Cancer du sein: l'Institut Curie au service des femmes. *Dossier de presse.*

J

Jakobsson M, Scholz S. W, Scheet P, Gibbs J. R, VanLiere J. M, Fung H. C, Szpiech Z. A, Degnan J. H, Wang K, Guerreiro R, Bras J. M, Schymick J. C, Hernandez D. G, Traynor B. J, Simon-Sanchez J, Matarin M, Britton A, Van De Leemput J, Rafferty I, Bucan M, Cann H. M, Hardy J. A, Rosenberg N. A, and Singleton A. B. (2008). Genotype, haplotype and copy-number variation in worldwide human populations. *Nature*, 451:998-1003.

Jayasinghe Y, Simmons P. S. (**oct 2009).** Fibroadenomas in adolescence.*Curr. Opin. Obstet. Gynecol*. 21(5):402-406.

Jerónimo C, Nomoto S, Caballero O. L, Usadel H, Henrique R, Varzim G, Oliveira J, Lopes C, Fliss M. S. and Sidransky D. (2001). Mitochondrial mutations in early stage prostate cancer and bodily fluids. *Oncogene*, 20(37), 5195-5198.

Jick SS, Walker AM, Jick H. (1986). Conjugated estrogens and bibrocystic breast disease. *Am J Epidemiol, 124: 746-51.*

K

Kelsey JL, Lindfors KK, White C. (1974). A case-control study of the epidemiology of breast diseases with reference to oral contraceptive use. *Int J Epidemiol, 3: 333-40.*

Key T J, Verkasalo P K and Banks E. (2001). Epidemiology of breast cancer. *Lancet oncology,* 2: 133-140.

King M. C, Wieand S, Hale K, Lee M, Walsh T, Owens K, Tait J, Ford L, Dunn B. K, Costantino J, Wickerham L, Wolmark N, Fisher B. (2001). Tamoxifen and breast cancer incidence among women with inherited mutations in *BRCA1* and *BRCA2*: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP-P1) Breast Cancer Prevention Trial. *JAMA*, 286: 2251-2256.

Klemba, A., Kowalewska, M. and Kukwa, W. (2010). Mitochondrial Genotype in Vulvar Carcinoma-Cuckoo in the Nest. *Journal of Biomedical Science*, **17**, 73. http://dx.doi.org/10.1186/1423-0127-17-73.

Knudson A. G. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 68: 820-823.

L

Lansac J, Lecomte P. (1994). Gynécologie pour le praticien : *Masson éditeur, 4eme édition, Paris ;* 554p.

Lee H. C, Li S. H, Lin J. C, Wu C. C, Yeh D. C and Wei Y. H. (2004). Somatic mutations in the *D-loop* and decrease in the copy number of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma. *Mutation Research*, 547(1-2), 71-78.

Legros F, Chatzoglou E, Frachon P, Ogier de Baulny H. A, Laforêt P, Jardel C, Godinot C. & Lombès A. (2001). Functional characterization of novel mutations in the human cytochrome b gene. *European Journal of Human Genetics*, 9: 510-518.

Lescuyer P. (2002). Etude de l'expression des gènes nucléaires codant pour les sous unités du complexe I mitochondrial humain. *Thèse Université Joseph Fourier-Grenoble I*, 159 pages.

Li J. Z, Absher D. M, Tang H, Southwick A. M, Casto A. M, Ramachandran S, Cann H. M, Barsh G. S, Feldman M, Cavalli-Sforza L. L, and Myers R. M. (2008). Worldwide human relationships inferred from genome-wide patterns of variation. *Science*. 319:1100-1104.

Liberman L, Tornos C, Huzjan R et al. (2006). Is surgical excision warranted after benign, concordant diagnosis of papilloma at percutaneous breast biopsy? *AJR Am J Roentgenol* 186(5):1328-34.

Librado P. & Rozas J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics,* 25: 1451-1452.

Long F. & Yong-Gang Y. (2013). An update to MitoTool: Using a new scoring system for faster mtDNA haplogroup determination. *Mitochondrion*, 3: 360-363.

Lucidarme O. (2001). Imagerie de la pathologie mammaire bénigne. *In: Espié M, Gorins A, eds. Le Sein. Paris. Ed Eska*: 234-57.

M

Marth G, Schuler G, Yeh R, Davenport R, Agarwala R, Church D, Wheelan S, Baker J, Ward M, Kholodov M, Phan L, Czabarka E, Murvai J, Cutler D, Wooding S, Rogers A, Chakravarti A, Harpending H. C, Kwok P. Y, and Sherry S. T. (2003). Sequence variations in the public human genome data reflect a bottlenecked population history. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 100:376-381.

Masood S, Loya A, Khalbuss W. **(2003).** Is core needle biopsy superior to fine-needle aspiration biopsy in the diagnosis of papillary breast lesions? *Diagn Cytopathol*, 28(6):329-34.

Mbaye F, Dem A, Fall M. and Sembène M. (2012). Implication of *the Cytochrome Bull* nucleotide and protein mutations in the occurrence of breast cancer in Senegal. International *Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology,* 3(2): 107-114.

Mbaye, F. **(2015).** Le cancer du sein chez les femmes senegalaises: Impact de la variabilite nucleotidique et de l'instabilite de loci microsatellites. Thèse Génétique des Populations, Universite Cheikh Anta Diop de Dakar, Dakar, 131 p.

Mercado CL, Hamele-Bena D, Oken SM et al. (2006). Papillary lesions of the breast at percutaneous coreneedle biopsy. *Radiology,* 238(3):801-8.

Moineaux L, Charlier C, Dolusic E, Larrieu P, Pilotte L, Colau D, Stroobant V, Galleni M, Masereel B, Eyndeb BVD, Wouters J, Fredericka R. (2010). Design, synthesis and study of inhibitors of tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO), a promising target for cancer therapy. *Seminar*. page. 1.

Moisan F. (2009). Study of the influence polymorphism genes repair of DNA by nucleotide excision on the activity of anticancer agents. *Thesis University of Angers*. Pages 119.

Mones WJ, Norris HJ, Snyder R. **(1989).** Infiltrating Syringomatous adenoma of the nipple. A clinical and Pathological study of 11 cases. *Am J Surg Pathol*, 13:197-201.

Morton NE. **(1955).** Sequential tests for the detection of linkage. *Am J Hum Genet* 7: 277-318

Morvan F, Gompel A. **(2004).** Cancer du sein. In : Godeau P. Herson S. Piette JC, editors. Traité de médecine. 4e ed. Paris: Flammarion, 2088-2092.

Moyret-lalle C, Falette N, Grelier G. & Puisieux A. (2008). Génomique tumorale: l'image d'un paysage instable. *Bulletin du Cancer*; 95 (10): 923-930.

N

Nei, M. (1987). Molecular evolutionary genetics.

Nielsen M, Jensen J et Andersen J. (1984). Precancerous and cancerous breast lesions during lifetime and at autopsy a study of 83 women. *Cancer* ; 54: 612-615.

Nkondjock A. & Ghadirian P. (2005). Facteurs de risque du cancer du sein. *Medecine/ Sciences*; 21(2): 175-180.

Nowell PC, Hungerford DA. (1960). A minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science,* 132: 1497.

O

Oluwole S. F, Freeman H. P. (1979). Analysis of benign breast lesions in blacks. *Am. J. Surg. Juin,* 137(6):786-789.

OMS série de rapports techniques, N°326, 1966 (Aspects cliniques de l'utilisation des gestagènes oraux) ; N°386, 1986 (La contraception par les stéroïdes hormonaux) ; N°473, 1971 (Méthodes de régulation de la fécondité) ; N°575, 1975 (Progrès dans les méthodes de régulation de la fécondité).

OMS : Organisation Mondiale de la Santé **(2008).** "Le cancer."

OMS-CIRC (2013). Communiqué de presse N° 223.

Ory H et al (1976). Oral contraceptives and reduced risk of benign breast diseases. *New England Jornal of Medecine*, 294: 419-422.

Ory H, Cole P, MacMahon B, et al. (1976). Oral contraceptives and reduced risk of breast diseases. *N Engl J Med*, 294: 419- 422.

Oueslati S et al. (2007). Hamartome du sein. *Imagerie de la Femme*, 17 : 19-25.

P

Page D. L, Salhany K. E, Jensen R. A (1996). Subsequent breast cancer risk after biopsy with atypia in a breast papilloma. *Cancer*, 78: 258-266.

Palacios J, Robles-Fria M.J, Castilla M.A, Lopez-Garcia M.A & Benitez J. (2008). The molecular pathology of heredity breast cancer. *Pathobiology,* 75, 85-94.

Parker S. J, Harries S. A. **(2001 Jul).** Phyllodes tumours. *Postgrad Med J*, 77(909):428-35 144: 341-3.

Parrella P, Seripa D, Matera M. G, Rabitti C, Rinaldi M, Mazzarelli P, Gravina C, Gallucci M, Altomare V, Flammia G, Casalino B, Benedetti-Panici P.L and Fazio V.M. (2003) .Mutations of the *D310* Mitochondrial Mononucleotide Repeat in Primary Tumors and Cytological Specimens. *Cancer Letters*, 190, 73-77.http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3835(02)00578-5.

Pastides H, Kelsey J L, Holford T R, et al. **(1985).** An epidemiologic study of fibrocystic brearst disaese with reference to ductal epithelial atypia. *Am J Epidemiol*, 121:440-447.

Pastides H, Najjar M. A, Kelsey J. L. **(1987)**. Estrogen replacement therapy and fibrocystic breast disease. *Am J Prev Med, 3: 282-6.*

Patillon B. (2014). Différenciation génétique des populations humaines pour les gènes de la réponse aux médicaments. Thèse Santé Publique, Université Paris-Sud Xi. 312p.

Peto J., Phelan C., Zhang HX., Szabo C., Devilee P., Goldgar D., Futreal PA., Nathanson KL., Weber B., Rahman N. & Stratton MR. (2001). Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to *CHEK2* in noncarriers of *BRCA1 or BRCA2* mutations. *Nature Genetic*, 31, 55-9.

Picard S F. (2003). Rôle de l'instabilité génétique dans la réponse aux traitements dans une population de cancers du sein localement avancés et traités par chimiothérapie première. France. Mémoire école pratique des hautes études. 41p.

Poehlmann, A. and Roessner, A. (2010). Importance of DNA Damage Checkpoints in the Pathogenesis of Human Cancers. *Pathology Research and Practice*, **206**, 591-601.http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2010.06.006.

Poirier J. Histologie humaine fascicule 7, Peau et phanères, sein, organes des sens, 1971.

Potten CS, Watson RJ, Williams GT, Tickle S, Roberts SA, Harris M et Howell A. 1988. The effect of age and menstrual cycle upon proliferative activity of the normal human breast. *Br J Cancer*. 58(2): 163-70.

Preston-Martin S, Pike M. C. (1990). Ross R.K., Jones P.A., Henderson B.E. Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer Research*; 50: 7415-7421.

Prim.(**2006).** Care. Juin, 33(2):455-502.

Q

Quach H. (2010). Sélection naturelle dans le génome humain : Exemples des récepteurs de type Toll et des microARN. Thèse Génétique Evolutive Humaine, Ecole Pratique des Hautes Etudes. 31p.

R

Ravnirhar B, Seigel DG, Lindtner J. (1979). An epidemiologic study of breast cancer and benign breast neoplasias in relation to oral contraceptive and estrogen use. *Eur J Cancer, 15:395-405.*

Razafindrazaka, H. **(2010)**. Le peuplement humain de Madagascar: Anthropologie génétique de trois groupes traditionnels. Thèse Biotechnologie, Anthropobiologie, Université Toulouse III—Paul Sabatier, Toulouse, 277 p.

Reclus. (1893). Maladie kystique de la mamelle.

Reich D. E, Schaffner S. F, Daly M. J, McVean G, Mullikin J. C, Higgins J. M, Richter D. J, Lander E. S, and Altshuler D. (2002). Human genome sequence variation and the influence of gene history, mutation and recombination. *Nat Genet,* 32:135-142.

Risch N. (1992). Genetic linkage: interpreting lod scores. *Science,* 255: 803804.

Roman Bogorad [1,2], Carine Courtillot[1,2,3], Chidi Mestayer[1,2], Sophie Bernichtein[1,2], Lilya Harutyunyan[3] , Jean-Baptiste Jomain[1,2], Anne Bachelot [3], Frédérique Kuttenn[1,2,3], Paul Kelly[1,2], Vincent Goffin[1,2] et Philippe Touraine[1,2,3] .(2008). Identification of a gain of function mutation of

the prolactin receptor in women with benign breast tumors. *The National Academy of Sciences of the USA, PNAS _ September* 23, 2008 _ vol. 105 _ no. 38 _ 14533–14538.

Rouet V, Bogorad RL, Kayser C, Kessal K, Genestie C, Bardier A, Grattan DR, Kelder B, Kopchick JJ, Kelly PA, Goffin V (2010). Local prolactin is a target to prevent expansion of basal/stem cells in prostate tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 107:15199-15204.

Royal College of Géneral Practitioner. (1977). Oral contraception study. Effect on hypertension and benign breast disease of progestogen component in combined oral contraceptives. *Lancet*,1: 624.

Rozas J, Librado P, Sánchez-Del Barrio JC, Messeguer X, Rozas R. DnaSP. (2012). Version 5 Help Contents (Help File). *Available*: http://www.ub.edu/dnasp/.

S

Sabeti PC, Schaffner SF, Fry B, Lohmueller J, Varilly P, Shamovsky O, Palma A, Mikkelsen TS, Altshuler D, Lander ES. (2006). Positive natural selection in the human lineage. *Science*. 312: 1614-1620.

Santen RJ, Mansel R. (2005). Benign breast disorders. *N Engl J Med* 353:275–285.

Santos Jr, G.C, Góoes A.C, Vitto H. D, Moreira C.C, Avvad E, Rumjanek, F. D and Gallo C.V. (2012). Genomic Instability at the 13q31 Locus and Somatic mtDNA Mutation in the *D-Loop* Site Correlate with Tumor Aggressiveness in Sporadic Brazilian Breast Cancer Cases. *Clinics* (*Sao Paulo*), **67**, 1181-1190. http://dx.doi.org/10.6061/clinics/2012(10)10.

Sharawat S. K, Bakhshi R, Vishnubhatla S, and Bakhshi S. (2010). Mitochondrial D-loop variations in paediatric acute myeloid leukaemia: a potential prognostic marker. *Br. J. Haematol*, 149(3), 391-398.

Siddhartha Mukherjee (2013). L'empereur de toutes les maladies: une biographie du cancer, Flammarion, p 57.

Silbernagl S, Despopoulos A. (2001). Atlas de poche de physiologie médecine sciences. *Flammarion*, p 436 303.

Simard A, Vobecky J, Vobecky JS. (1990). Nutrition and lifestyle factors in fibrocystic disease and cancer of the breast. *Cancer Detect Prev, 14: 567-72.*

Simsir A, Waisman J, Thorner K et al. (2003). Mammary lesions diagnosed as "papillary" by aspiration biopsy: 70 cases with follow-up. *Cancer*, 99(3):156-65.

Sir Astley Cooper. (1829). Illustrations of Diseases of the Breast**.**

Sitruk-Ware, Kutten F, Contesso G et al. **(1987).** Aspects thérapeutiques des mastopathies bénignes Contref. *Fertile Sex*, 15 :435-438.

Soini I, Aine R, Lauslahati K, et al. **(1981).** Independent risk factors of bening and malignant breast lesion. *Am J Epidemiol, 114:507-14* .

Starwell, P E et al. (1973). Epidemiology of benign breast lesions: lack of association with oral contraceptive use. *New England journal of medicine*, 288: 551-554.

Suzuki M, Toyooka S, Miyajima K, Iizasa T, Fujisawa T, Bekele N. B and Gazdar A. F. (2003). Alterations in the Mitochondrial Displacement Loop in Lung Cancers. *Clinical Cancer Research*, **9**, 5636-5641.

T

Tajima F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123 (3): 585-595.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M & Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology & Evolution*, 28 (10): 2731-2739.

Tavassoli Fade. **(1999).** Pathology of the breast.Second ed. *Norwalk,Connecticut: Appleton Lange*.

Thiam D. **(2002).** Cancer du sein : Etude clinique dans le service de Gynéco Obstétrique De l'*HNPG* à propos de 43 cas. Thèse de médecine : Faculté de médecine, pharmacie et d'odontostomatologie de Bamako (MALI) ,32.

Thompson J. D, Higgins D. G and Gibson T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22:4673-4680.

Torroni A, Neel J. V, Barrantes R, Schurr T. G and Wallace D. C. (1994d). A mitochondrial DNA "clock" for the Amerinds and its implications for timing their entry into North America. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:1158-1162.

Tranbaloc P. **(2006).** Benigns tumors and complex mastopathies: *Pathologist's point of view.* 28es journées de la SFSPM, Lille. 340-345

Trapido E. J, Brinton L. A, Schairer C, Elbaz P. Estrogen replacement therapy and benign disease. *J Nant Cancer Inst 1984; 73: 1101-5.*

Trojani M. **(1988).** Atlas en couleur d'histopathologie mammaire. *Adhérence papillaire du Mamelon*, p 62.

Tse G. M. K, Law B. K. B, Ma T. K. F, Chan A. B. W, Pang L-M, Chu W. C. W, Cheung H. S. (2002). Hamartoma of the breast: a clinic pathological review. J Clin Pathol, 55 : 951–954.

V

Van Trappen P.O, Cullup T, Troke R, Swann D, Shepherd J.H, Jacobs I. J, Gayther S. A and Mein C. A. (2007). Somatic mitochondrial DNA mutations in primary and metastatic ovarian cancer. *Gynecologic Oncology,* 104: 129–133.

Vasseur E. & Quintana-Murci L. (2013). The impact of natural selection on health and disease: uses of the population genetics approach in humans. *Evolutionary Applications*, 6 (4): 596–607.

Vasseur E. (2011). Contraintes sélectives et adaptation chez l'homme : histoire évolutive des senseurs microbiens. Thèse Génétique Evolutive Humaine, Université Toulouse 3 Paul Sabatier. 202p

Vega A, Salas A, Gamborino E, Sobrido M. J, Macaulay V & Carracedo A. (2004). *mtDNA* mutations in tumors of the central nervous system reflect the neutral evolution of *mtDNA* in populations. *Oncogene*, 23: 1314-1320.

Vessey M. P et al (1976). A long-term follow-up study of women using different methods of contraception: an interim report. *Jornal of biosocial science*, 8: 373-427.

Villeneuve S. (2011). Professions, expositions professionnelles aux solvants et cancer du sein : Analyse de deux études épidémiologiques sur les cancers du sein chez l'homme et chez la femme. France. Thèse Universite Paris XI – Faculte De Medecine Paris-Sud ED420. 157p.

Voight B. F., Adams A. M., Frisse L. A., Qian Y., Hudson R. R., and Di Rienzo A., 2005. Interrogating multiple aspects of variation in a full resequencing data set to infer human population size changes. Proc Natl Acad Sci USA 102:18508-18513.

W

Wang C, Zhang F, Fan H, Peng L, Zhang R, Liu S. and Guo Z. 2011. Sequence polymorphisms of mitochondrial D-loop and hepatocellular carcinoma outcome. Biochemical and Biophysical Research Communications 406: 493–496.

Warburg O. 1956. On the origin of cancer cells. Science; 123: 309-314.

William, M. (2011) Diversité génétique et adaptation au milieu chez les arbres forestiers tropicaux: Etude chez le genre Virola (Myristicaceae). Thèse génétique écologique, Université des Antilles et de la Guyane, Guadeloupe, 178 p.

Wooster R. Neuhausen S. Mangion J et coll. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13ql2 13. Science 1994 265: 2088-2090

World Health Organization. 2nd ed. Histologic typing of breast tumors, 2. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1981. p. 22.

X

Xu, C., Tran-Thanh, D., Ma, C., May, K., Jung, J., Vecchiarelli, J. and Done, S.J. (2012) Mitochondrial D310 Mutations in the Early Development of Breast Cancer. *British Journal of Cancer*, **106**, 1506-1511. http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2012.74.

Y

Yoneyama H., Hara T., Kato Y., Yamori T., Matsuura E. T., and Koike K., 2005. Nucleotide sequence variation is frequent in the mitochondrial DNA displacement loop region of individual human tumor cells. Mol. Cancer Res., 3, 14–20.

Yu H, Rohan TE, Cook MG, et al. Risk factors for fibroadenoma : a case-control study in Australia. *Am J Epidemiol 1992; 135: 247-58.*

Z

Zhai K, Chang L, Zhang Q, Liu B. and Wu Y. 2011. Mitochondrial C150T polymorphism increases the risk of cervical cancer and HPV infection. Mitochondrion, 11(4), 559-563.

Zhu W., Qin W., Wessel A., Puckett C. L. and Sauter E., 2005. Mitochondrial DNA mutations in breast cancer tissue and in matched nipple aspirate fluid. Carcinogenesis, 26(1), 145-152.

1. **(http://lecancerdusein.canalblog.com/archives/2013/01/08/26099159.html)** (06/12/2010 à 18 : 15).

2. **(http://www.generika.ch/content-n46-sF.html) (14/08/2014 à 09 : 30).**

3. **http://globocan.iarc.fr/** «Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2008» (10/03/2013 à 15 : 14).

4. **http://www.academie sciences.fr/activite/archive/dossiers/Adanson/Adanson_pdf/Chevalier_CR.pdf** (13/07/2014 à 10 : 23).

5. **http://www.academie-medecine.fr/Upload/tubiana_rapp_cancer_13sept_073.pdf (25/10/2013 à 9 : 15).**

6. **http://www.chu-besancon.fr/3c/Ksein_4fev09.pdf (**17/06/2013 à 22 : 10)

7. **http://www.iarc.fr/** (10/03/2013 à 18 : 25).

8. **http://www.xibar.net/CANCER-AU-SENEGAL-800-nouveaux-cas-chaque-annee-chez-les-enfants_a21739.html** (12/11/2014 à 18 : 20).

9. **http://www2.cnrs.fr/presse/communique/1612.htm** (14/08/2014 à 09 : 30).

10. **www.mitomap.org/mitoseq.html** (28/08/2014 à 22:26).

www.who.int/fr/

ANNEXES

Annexe 1: Tableau explicatif du concept d'ANDI : Anomalies du développement Normal mammaire et Involution, adapté de Benign Disorders and Diseases of the breast, (Hugues, Mansel & Webster 2009).

Présentation clinique / stade	Processus normal	Aberration	Maladie
Début de la vie de reproduction (15 à 25 ans)	Développement lobules	Adénofibrome	Adénofibrome géant
	Développement stroma	Hypertrophie de l'adolescente	Gigantomastie
	Eversion mamelon	Inversion du mamelon	Abcès sous auréolaire / Fistulisation
Vie reproductive mature (25 à 40 ans)	Changements menstruels cycliques	Mastodynie/nodularités cyclique	Mastodynie invalidante
	Hyperplasie épithéliale de la grossesse	Ecoulement mamelonnaire sanglante	
Involution (35 à 55 ans)	Involution lobulaire	Macrokyse	
	Involution canalaire ✓ Dilatation ✓ Sclérose	Lésions sclérosantes Ectasie canalaire Rétraction mamelonnaire	Mastites périductales / abcès
	Tumover épithéliale	Hyperplasie épithéliale simple	Hyperplasie avec atypies

Annexe 2: Association (RR) entre l'Indice de Masse Corporelle avec la maladie fibrokystique et adénofibrome

Types histologique et études (référence)	Type de contrôle	Indice de Masse corporelle (Kg/m^2)			
		<21	21-22	23-24	≥25
Fibroadénome					
Yu *et al* 1992	Population	1,0	1,0	0,7	0,4
Yu *et al* 1992	Biopsie	1,0	0,8	0,5	0,4
Brinton *et al*., 1981	*	1,0	0,5	0,3	0,2
Maladie fibrokystique					
Brinton *et al*., 1981	*	1,0	0,9	0,7	0,2

Annexe 3: Association du RR de la contraception orale sur le développement de maladie fibrokystique du sein

Etude (référence)	Années d'utilisation de contraceptif													
	<1	< 2	1-2	2	>2	2-5	3-4	4	5-6	≥5	6	7-8	8	≥9
Cohorte														
Brinton *et al* 1981		1,0		0,7				0,4			0,5		0,3	
Hsieh *et al* 1984	1,0			0,6			0,6	0,6		0,4				
Ory *et al* 1976	1,0			0,8	0,4									
Cas de contrôle														
Canny *et al* 1988	1,0		0,7				1 ,2		1,2			0,6		0,6
Sartwell *et al* 1973	1,0		0,7			0,3				0,2				

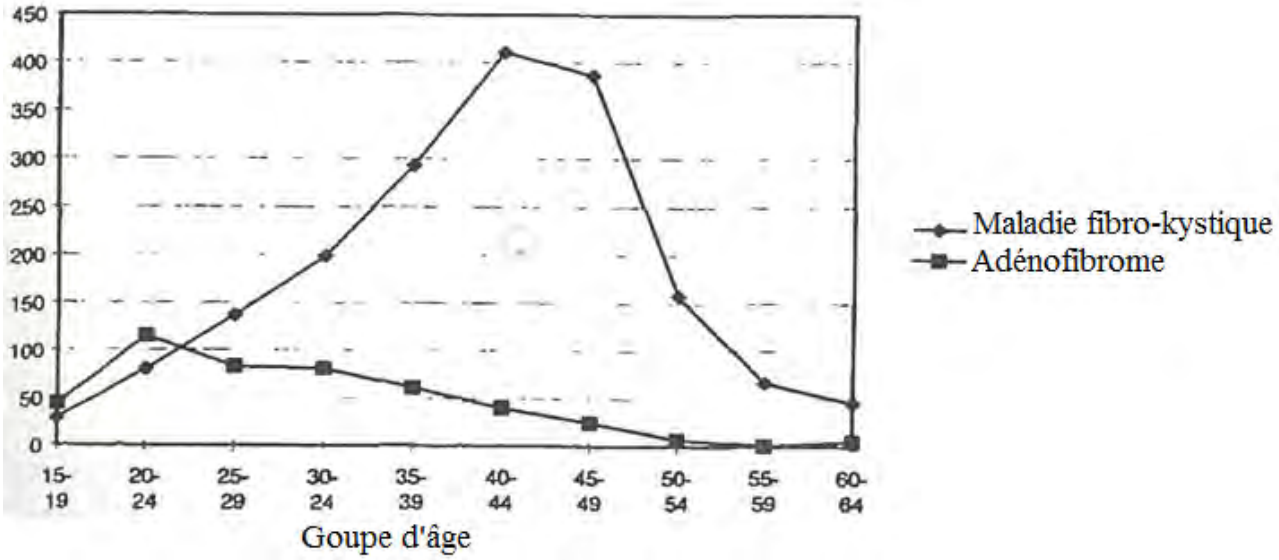
Annexe 4: Association du RR de la thérapeutique de substitution d'œstrogène aux adénofibrome et à la maladie fibrokystique du sein

Etude	Durée d'exposition à la thérapeutique de substitution d'œstrogène en années							
	≤1	<2	1-2	1-4	2-4	≥3	5-9	≥10
Numura et Comstock		1,0			0,7		1,4	3,5
Trapido et al		1,0					1,2	1,4
Pastides et al	1,0		1,6			3,6		

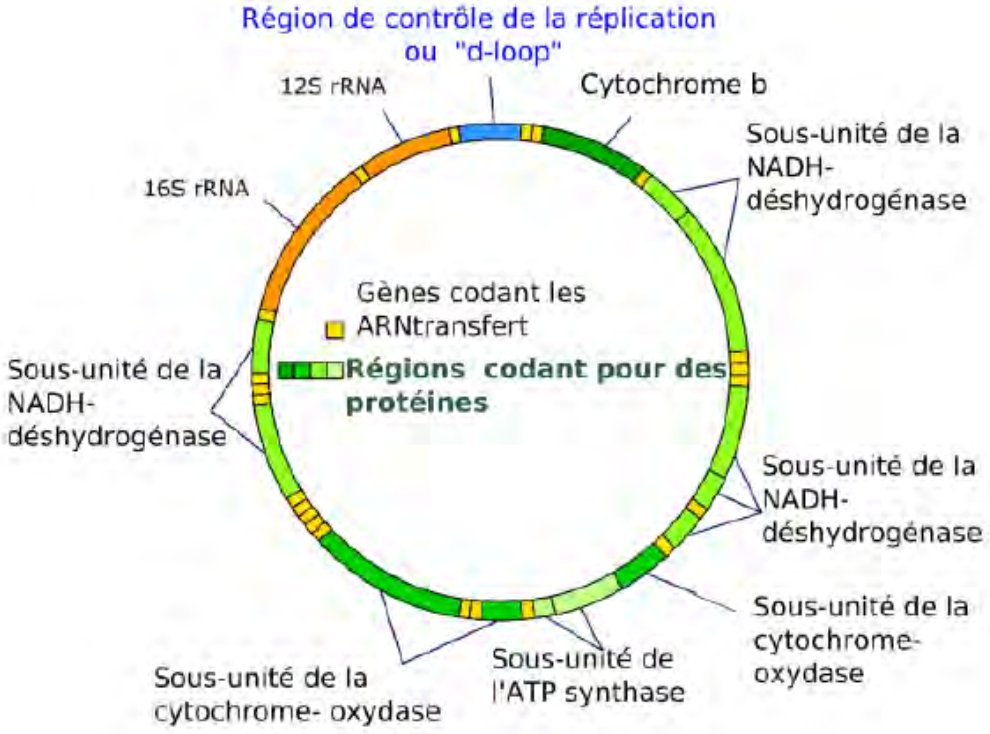
Annexe 5: Classification de l'American College of Radiology (ACR)

Classification des anomalies mammographiques de l'ACR (American College of Radiology)		
ACR	**Anomalies mammographiques**	**Interprétation et Attitude**
ACR 1	Aucune anomalie	
ACR 2	- Opacités rondes avec macrocalcifications (adénofibrome ou kyste) - Opacités ovales à centre clair (ganglion intra mammaire) - Opacités rondes correspondant à un kyste typique en échographie - Image de densité graisseuse ou mixte (lipome, hamartome)	Anomalie bénigne identifiable ne nécessitant ni surveillance ni examen complémentaire
ACR 3	- Microcalcifications de type 2 d'après Le Gal en foyer unique ou multiple ou nombreuses calcifications dispersées groupées au hasard - Opacités rondes ou ovales, discrètement polycycliques non calcifiées, bien circonscrites, non typiquement liquidiennes en échographie ou	Forte probabilité de bénignité mais une surveillance à court terme est conseillée
ACR 4	- Microcalcifications de type 3 d'après Le Gal groupée en amas, ou de type 4 peu nombreuses - Images spiculées sans centre dense - Opacités non liquidiennes rondes ou ovales, à contour microlobulé ou masqué - Distorsions architecturales	Anomalie indéterminée ou suspecte, qui fait poser l'indication d'une vérification
ACR 5	- Microcalcifications de type 5 d'après Le Gal ou de type 4 nombreuses et groupées - Amas de microcalcifications de topographie galactophorique - Microcalcifications évolutives ou associées à une anomalie architecturale ou à une opacité	Forte probabilité de malignité

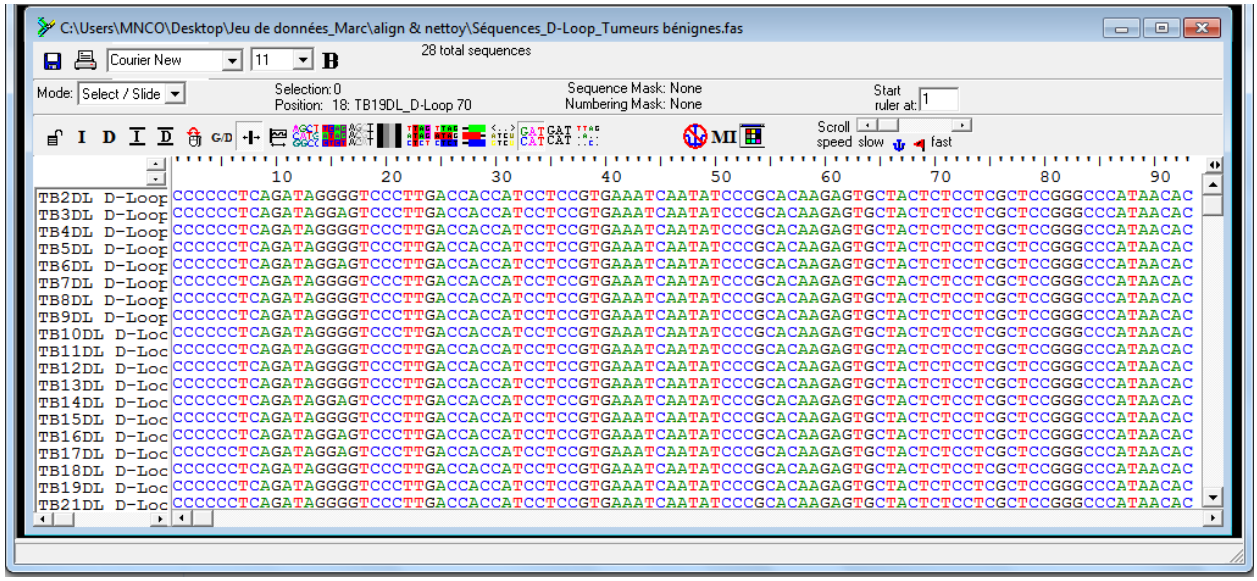
Annexe 6: Incidence des maladies fibro-kystiques et des adénofibromes selon la tranche d'âge



Annexe 7: Organisation de l'ADNmt des mammifères et emplacement de la D-Loop.
(www.adn.wikibis.com/genomemitochondrial)



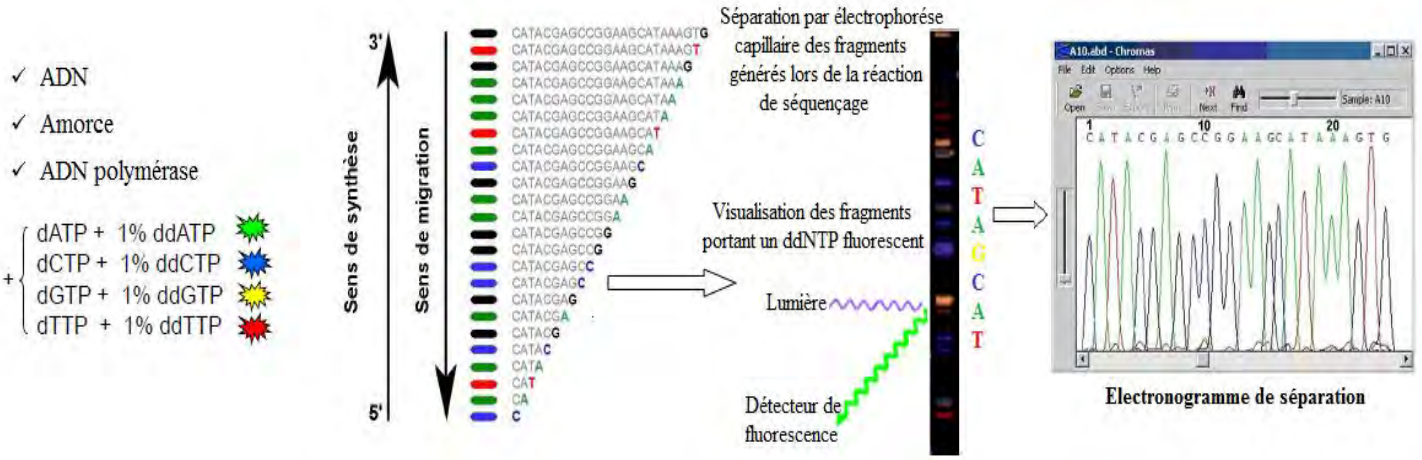
Annexe 8: Exemple de séquences corrigées et alignées grâce au logiciel BioEdit v 7.0.8.



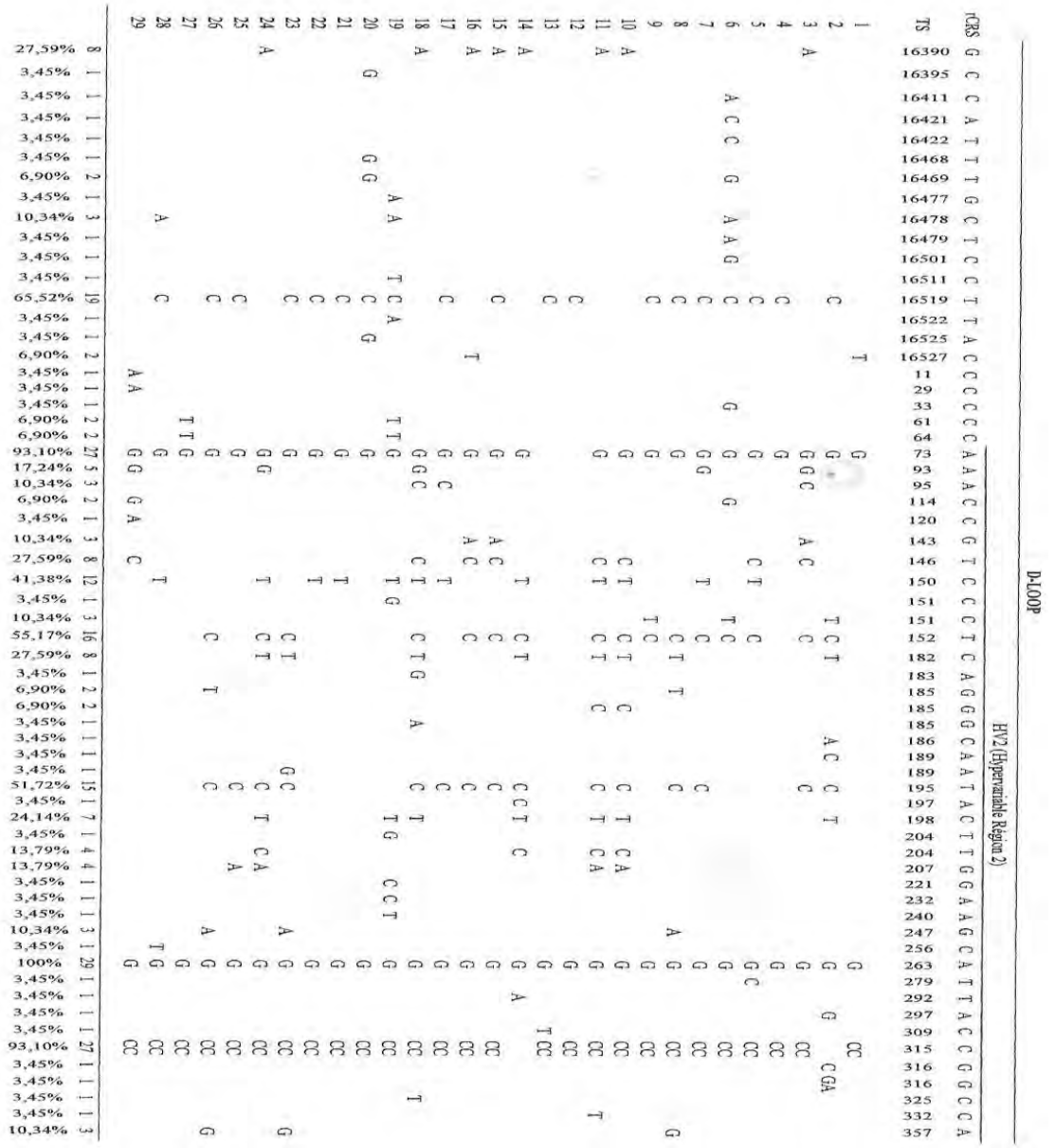
Annexe 9: Extrait de la séquence de référence de Cambridge révisée (rCRS) de l'ADNmt, disponible sur GenBank.

```
    1 gatcacaggt ctatcaccct attaaccact cacgggagct ctccatgcat ttggtatttt
   61 cgtctggggg gtatgcacgc gatagcattg cgagacgctg gagccggagc accctatgtc
  121 gcagtatctg tctttgattc ctgcctcatc ctattattta tcgcacctac gttcaatatt
  181 acaggcgaac atacttacta aagtgtgtta attaattaat gcttgtagga cataataata
  241 acaattgaat gtctgcacag ccActttcca cacagacatc ataacaaaaa atttccacca
  301 aacccccct CCCCCgcttc tggccacagc acttaaacac atctctgcca aaccccaaaa
  361 acaaagaacc ctaacaccag cctaaccaga tttcaaattt tatcttttgg cggtatgcac
  421 ttttaacagt caccccccaa ctaacacatt attttcccct cccactccca tactactaat
  481 ctcatcaata caacccccgc ccatcctacc cagcacacac acaccgctgc taacccccata
  541 ccccgaacca accaaacccc aaagacaccc cccacagttt atgtagctta cctcctcaaa
  601 gcaatacact gaaaatgttt agacgggctc acatcacccc ataaacaaat aggtttggtc
  661 ctagcctttc tattagctct tagtaagatt acacatgcaa gcatccccgt tccagtgagt
15961 gaaaaagtct ttaactccac cattagcacc caaagctaag attctaattt aaactattct
16021 ctgttctttc atggggaagc agatttgggt accacccaag tattgactca cccatcaaca
16081 accgctatgt atttcgtaca ttactgccag ccaccatgaa tattgtacgg taccataaat
16141 acttgaccac ctgtagtaca taaaaaccca atccacatca aaacccccctc cccatgctta
16201 caagcaagta cagcaatcaa ccctcaacta tcacacatca actgcaactc caaagccacc
16261 cctcacccac taggatacca acaaacctac ccacccttaa cagtacatag tacataaagc
16321 catttaccgt acatagcaca ttacagtcaa atcccttctc gtccccatgg atgacccccc
16381 tcagataggg gtcccttgac caccatcctc cgtgaaatca atatcccgca caagagtgct
16441 actctcctcg ctccgggccc ataacacttg ggggtagcta aagtgaactg tatccgacat
16501 ctggttccta cttcagggtc ataaagccta aatagcccac acgttccccct taaataagac
16561 atcacgatg
```

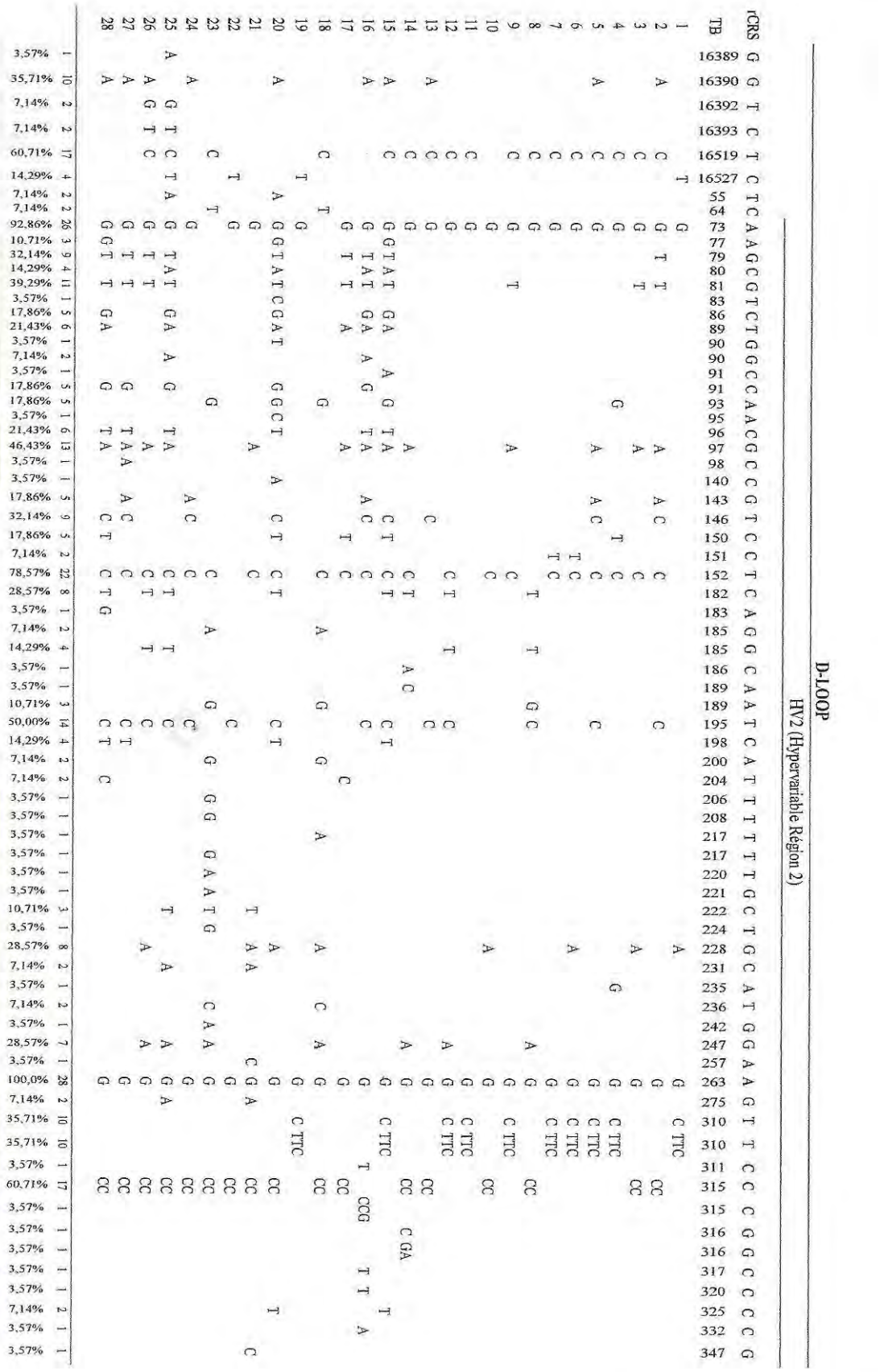
Annexe 10: Séquençage de l'ADN par la méthode enzymatique aux di-déoxynucléotides de Sanger



Annexe 11 : Variants de la région de control de la (*D-Loop)* dans les tissus sains (1)



Annexe 11: Variants de la région du control de la *(D-Loop)* dans les tissus sains (2)



Annexe 12: Publications issues de la thèse :

Daniel Doupa[1], Jean Luc Faye[1], Fatimata Mbaye[1, 2], Sidy Ka[3], Ahmadou Dem[3], Mamadou Kane[2], Mbacke Sembene[1, 2]

Daniel Doupa[1], Badji Marc Noël[1], Fatimata Mbaye[1,2], Sidy Ka[3], Ahmadou Dem[3], Mamadou Kane[2], Mbacké Sembène[1,2]

International Journal of Genetics and Genomics
2015; 3(4): 36-42
Published online July 30, 2015 (http://www.sciencepublishinggroup.com/j/ijgg)
doi: 10.11648/j.ijgg.20150304.11
ISSN: 2376-7340 (Print); ISSN: 2376-7359 (Online)

Implication of the Cytochrome b Mutations in the Evolution of Breast Benign Tumors Among Senegalese Women

Daniel Doupa[1], Jean Luc Faye[1], Fatimata Mbaye[1, 2], Sidy Ka[3], Ahmadou Dem[3], Mamadou Kane[2], Mbacké Sembène[1, 2]

[1]Department of Biology Animal, Faculty of Science and Technology, Cheikh Anta Diop University, Dakar, Senegal
[2]Sudanian Sahel Animal Populations Biology (BIOPASS), Research Institute for Development, IRD / Bel-Air, Senegal
[3]Cancer Institut, Faculty of Medicine, Pharmacy and Odontology, Cheikh Anta Diop University, Dakar, Senegal

Email address:
mameluc03knb@gmail.com (J. L. Faye)

To cite this article:
Daniel Doupa, Jean Luc Faye, Fatimata Mbaye, Sidy Ka, Ahmadou Dem, Mamadou Kane, Mbacké Sembène. Implication of the Cytochrome b Mutations in the Evolution of Breast Benign Tumors Among Senegalese Women. *International Journal of Genetics and Genomics*. Vol. 3, No. 4, 2015, pp. 36-42. doi: 10.11648/j.ijgg.20150304.11

Abstract: While the studies linking the germ line mtDNA mutations to cancer raise many ambiguities because of its high genetic variability, the study of somatic mutations of this one, is proved to be decisive in the identifying of mutations involved in the genesis and evolution of tumors. In the present study, we determined the implication of the Cytochrome b mutations in the evolution of breast benign tumors among Senegalese women. This one is about, with the sequencing-PCR, to research mutations of Cytochrome b, to evaluate their importance among a benign tissues group compared to another healthy tissues group; and thence, to determine the effect of the natural selection on the observed variability. The analysis of mutations profiles of Cytochrome b in benign tissues allowed seeing that 50% of them have led to a change in amino acid and 12.5% to a shift in the reading frame. Moreover, the analysis of selection signature indicated that these mutations were subjected to a positive selection. The results also revealed that the population of benign cells was growing rapidly from an ancestral population sparse. These observations have enabled to accept the hypothesis that Cytochrome b mutations would be involved in the evolution of breast benign tumors among Senegalese women.

Keywords: Breast, Benign, Tumors, *Cytochrome b*, Variability, Evolution, Senegal

1. Introduction

Beside the degenerative diseases that dominate the sanitary table of our societies, cancer (or rather cancers) still remains one of the more complex challenges proposed to medicine in terms of understanding of these pathologies, diagnosis and treatments. Known since Antiquity, the tumors has been for a long time black boxes of which no explanatory key seemed able to open the doors. Very long, the table of tumors is confined itself to descriptions certainly accurate but getting obstinate on the absence of testable hypothesis. It was necessary to wait the beginning of 20th century with the combined advances of cell biology and molecular biology for seeing appear the concepts by which could be apprehended the notion of cell transformation.

Indeed, the second half of the 20th century has been dominated by genetic models of tumors that provided conceptual tools explaining tumor genesis and its evolution. Thus breast cancer in women, occupying the first place in terms of incidence and mortality in the world [1], was at the heart of the fundamental research. It therefore constitutes a major concern of public health.

In Senegal, apart from breast cancer, which occupies the second place after gynecological cancers in women [2] and making the subject of multiple research, many women suffer during their life from non-cancerous breast disease but whose development of some of them constitutes a risk factor to breast cancer [3]. It's indeed, the multiplication of these benign tumors and their eventual risk of malignancy that have aroused our interest and ever since this question is asked: the process is it linked to a genetic event that able at term to favor the occurrence of breast cancer?

Thus, cancers being ruled by mutation-selection process [4], specific to our evolution, the study of the importance of these forces will enable us to better understand the story of the tumor cells, the distribution of genetic and phenotypic

variability of tissues and ultimately to facilitate the identification of genes involved in tumorigenesis. The understanding of this mutation-selection process that influences the variability of the human genome is a subject of fundamental interest in population genetics and evolutionary biology. On the other hand, we put the focus on the influence of natural selection on the genetic variability of Cytochrome b in the evolution of benign breast tumors.

Thus, on the premise that the evolution of tumors related to their genetic patrimony, we put forth the assumption according to which mutations of Cytochrome b would be involved in the evolution of breast benign tumors.

The general objective of this study is to determine the implication of genetic alterations of Cytochrome b in the evolution of benign breast tumors among Senegalese women. From this general objective, it results from it like specific objectives to research for mutations of interest of Cytochrome b, to evaluate their importance among a benign tissues group compared to another healthy tissues group; and thence, to determine the effect of the natural selection on the observed variability.

2. Materials and Methods

2.1. Subjects

This study was carried out from benign tissue cells of a group of patients presenting a breast benign tumor and normal tissue cells of another group of individuals being used as controls. Subjects were taken care of at the Cancer Institute of Aristide Le Dantec hospital in Dakar. On the whole, forty-four (44) of benign tissue samples and thirty-four (34) of healthy tissues samples were obtained at the time of surgery, then convey to the Sudanian Sahel Animal Populations Biology (BIOPASS) laboratory of the Research Institute for Development of Senegal, where they were frozen and stored in alcohol 96°.

2.2. DNA Extraction, PCR Amplification and Sequencing

The total DNA of breast tissue was extracted by the standard method of "Qiagen DNeasy Tissue Kit". The extraction protocol was described by Mbaye et al. in [5]. After extraction we have proceeded to the amplification of our interest gene: the Cytochrome b.

Indeed, the Cytochrome b, a region of more than a thousand of basic pair of mitochondrial genome situated in position 14747 and 15887 in the human sequence [6], belongs to one of four complex that provide the transfer of electrons in the mitochondrial respiratory chain. It is the only one of the 11 subunits of cytochrome c oxidoreductase complex (complex III or cytochrome bc1 complex, EC 1.10.2.2) to be encoded by mtDNA [7, 8]. It forms, with cytochrome c1 and the Rieske iron-sulphur protein, the catalytic core of the cytochrome bc1 complex. Thus, significant changes in its amino acid sequence would have therefore a high probability to induce significant alteration of the catalytic function of this complex III. Consequently, Cytochrome b mutations affecting its structure, could be one of the causality factors of tumorous development. This is what justifies its choice for this study.

The amplification was performed in a reactional volume of 50 µl composed of 42 µl of PCR mix containing: 23.8 µl of MilliQ water, 5 µl Buffer (10X) containing Mg^{2+} ions at an initial concentration of 15 mM, 1 µl of supplementary $MgCl_2$, 2 µl of dNTP, 5 µl of each primer which are: H15915 (TCT-CCA-TTT-CTG-GTT-TAC-AAG-AC) and L14723 (ACC-AAT-GAC-ATG- AAA-AAT-CAT-GGT-T) and 0.2 µl of polymerase Taq and of 8 µl of DNA extract diluted to 1/10. It was made in a thermocyclor of Eppendhorf type under the following conditions: an initial denaturation at 94° C for 3 minutes, followed of 40 cycles of denaturation at 94° C for 45 seconds; an hybridization at 50° C for 1 minute characterized by the fixing of the primers and elongation at 72° C for 1 minute 30 seconds and at the end a final elongation at 72° C for 10 minutes, followed of a hold of 10° C at infinity. These stages thus enumerated constitute one cycle and provide a multiplication by 2 of the target DNA at each cycle 40 in number for this study.

The Cytochrome b sequencing was performed from 30 µl of PCR products for each sample with the way-primer.

2.3. Analyzes of the Sequences of Cytochrome b

The data processing or sequence alignment enables to obtain a correct data set underlining the similarity between sequences. The Cytochrome b sequences of the two tissue groups were aligned with the Bio Edit software version 7.0.5.3 [9] by using the Clustal W multiple Alignment algorithm [10]. After their alignment, the sequences were carefully checked and corrected manually before proceeding to the research of mutations.

The research of mutations enables to establish their profiles in order to determine the processes of order genomic which are the basis of variability. For that, the sequences of two groups of healthy and benign tissue first aligned, were submitted to the MITOMAP database in order to compare them with the revised Cambridge Reference Sequence [11]. The differences of sequences identified between the reference sequence and the two tissue groups were registered as somatic mutations of Cytochrome b. Besides, the type of mutation was listed according to whether it is about transition, transversion, insertion or deletion. Mutations were also reported according to whether or not they have been registered in the database. However, variations of sequences common to both healthy and benign tissue groups were marked as neutral polymorphisms. The significance of sequence variations between healthy and benign tissue groups was underlined by the Fisher exact test available in Mito Tool version 1.1.2 [12] with a level significance (P - value) of 0.05 and a 95% confidence interval.

In order to evaluate the functional relevance of the detected mutations, their nature was highlighted according to whether it was about synonymous mutation, non-synonymous or mutation causing a displacement of the reading frame.

The haplogroups associated to different mutations were also highlighted in both tissue groups. Besides, the significance of differences between them was also evaluated by the Fisher exact test available in Mito Tool version 1.1.2 [12] with a significance level of 0.05 and a 95% interval confidence.

In order to give an account of local variations of DNA sequences of Cytochrome b (alleles), the indices of diversity and divergence such as the haplotype (Hd) and nucleotide (Pi) of Nei in [13] diversity were underlined under DnaSP Version 5.10.01 [14]. Following this one, we passed to the analysis of the inter-tissue genetic differentiation.

The analysis of genetic differentiation enables to give an account of the inter-tissue genetic structure of Cytochrome b. For this, two parameters were highlighted: the index of genetic differentiation (Fst) and the index of dissimilarity or genetic distance.

The determination of the index of genetic differentiation (Fst) of Cavalli-Sforza in [15] consists to measure the variations in allele frequency of SNP between tissues in order to detect positive selection events. It was done under Arlequin version 3.1 [16]. Its value is always included between 0 (when there is no structuring) and 1 (if there is genetic structure). Indeed, at a value of Fst corresponds a P-value enabling to assess according that this one is significant or not. Besides, the level of significance of Fst which was retained is 0.05.

As for the determination of genetic distances of Nei in [13], it consists to evaluate the number of replacements of alleles which are intervened at the locus during evolution. It was done under MEGA 6 version 6.05 [17]. After that, we have proceeded to the highlighting of amino acid variations in inter-tissue level.

The highlighting of amino acid variations enables to evaluate the inter-tissue protein diversity. This one was based on the comparison of the frequencies of amino acids in the two tissue groups. Thus the Cytochrome b being an encoding gene, the nucleotide sequences of the tissues were translated into protein sequences under MEGA 6 version 6.05 [17]. Indeed, the translation was done by using the most appropriate reading frame. For a given RNA sequence, there are three possible reading frames corresponding to the sequence of base triplets along the portion. Thus, the best reading frame is the one that presents the least stop codon compared to the two other. Besides, the significance of amino acid frequency variations between healthy and benign tissue groups was highlighted by the Fisher exact test available in Mito Tool version 1.1.2 [12] with a level of significance (P value) of 0.05 and a 95% confidence interval. After the highlighting of amino acid variations, we passed to the last stage of analyzes, corresponding to the detection of selection molecular signature at tumorous level.

The detection of selection molecular signature enables to determine the selective order processes that are at the base of genetic variability, of its maintenance and of its evolution in the time and in the tumorous microenvironment. This one is based on tests that determine whether the mutations frequency spectrum is in accordance with expectations of the standard neutrality model. For this, different statistics were highlighted in order to measure the deviations in relation to neutrality in the distribution of allele frequencies within the tissues. These include, D of Tajima in [18], D and F of Fu & Li in [19]. These tests were highlighted under Arlequin version 3.1 [16]. Thus, negative values of D of Tajima and D and F of Fu & Li indicate generally an excess of rare alleles, coherent with a positive or negative selection; whereas positive values of these statistics reflect generally an excess of alleles at intermediate frequency, had to the balancing selection. Besides, to discriminate between the positive and negative selection we have used the test of dN/dS which detects the selection acting on loci encoding for proteins by comparing the ratio of non-synonymous substitutions (dN) to the one of synonymous substitutions (dS). Thus, in case of neutrality, synonyms and non-synonymous substitutions should occur at the same rate and we should find $dN/dS = 1$. The negative selection of non-synonymous variants would result in $dN/dS < 1$; whereas positive selection of such variants would result in $dN/dS > 1$ [20]. Whole of manipulations and analyzes made, have enabled to obtain the following results.

3. Results and Discussion

Several somatic mutations were described as well in healthy tissue sequences as in benign tissue sequences. On the whole, 40 mutations were identified (Table 1) witch 16 specific to healthy tissue, 22 to benign tissue and 2 common to both healthy and benign tissue groups being able to be defined like neutral polymorphisms. Among these variations described, 21 were already reported in the database and 19 news variations. These variations of sequences testifies thus of the great variability of Cytochrome b like its genetic instability. Our observations confirm the results of the work of Legros et al. in [8] relating to the functional characterization of novel mutations in the human Cytochrome b gene and those of Mbaye et al. in [5] relating to the penetrance of Cytochrome b in breast cancer in Senegalese women. In order to evaluate the functional relevance of these mutations, we have examined indirect criteria such as the nature of the mutation and the conservation of mutated amino acids in the tumor cell population.

In the healthy tissue sequences 64.71% (22/34) of these have undergoes several mutations, with a frequency of 5.54% witch 72.22% are transitions and 27.78% transversions. Indeed, 66.67% of these are synonymous mutations (silent) and 33.33% non-synonymous mutations leading to an amino acid change.

However, in the benign tissue sequences, 72.73% (32/44) of them have undergoes several mutations, with a frequency of 6.59% which 58.33% are transitions, 29.17% transversions, 4.17% insertions and 8.33% deletions. Indeed, 37.5% of these are silent mutations, 50% missense mutations leading to a change in amino acid and 12.5% shifting

mutations leading to a change in the reading frame.

Comparatively in healthy tissues sequences where only 33.33% of the mutations have led to an amino acid change, in benign tissues sequences, 50% of the mutations have led to an amino acid change and 12.5% to a change in the reading frame. Among these mutations, six (A15824G, C15849T, C15839T, C15849A, T15519C and G15521A) with significant differences were already reported in the MITOMAP database by others authors and were associate to breast cancer [5, 21]. These observations let think that these mutations are of functional importance in the evolution of benign breast tumors. However, extensive biochemical and molecular studies would be necessary in order to determine their effect in the energy metabolism of tumor cells.

Table I. *Cytochrome b mutations in breast tissues.*

Mutations	Type of mutation	Nature of mutation	Healthy tissues (34)	Benign tissues (44)	P-value	Odds Ratio	Reported mutation
T15784C	Transition	syn:P=>P	6 (17.65%)	8 (18.18%)	0.579	0.768421	+
A15824G	Transition	non-syn:T=>A	0	10 (23.73%)	5.6^{e-10} *	-	+
C15849T	Transition	non-syn:T=>I	0	4 (9.09%)	0.001 *	-	+
C15839T	Transition	syn:L=>L	0	2 (4.54%)	0.016 *	-	+
C15849A	Transversion	non-syn:T=>N	0	2 (4.54%)	0.016 *	-	+
T15519C	Transition	non-syn:L=>P	0	6 (13.64%)	6.7^{e-06} *	-	+
G15521A	Transition	non-syn:A=>T	0	2 (4.54%)	0.016 *	-	+
C15577CC	Insertion	Frmshft	0	1 (2.27%)	0.197	-	
C15582d	Deletion	Frmshft	0	1 (2.27%)	0.197	-	
G15596d	Deletion	Frmshft	0	1 (2.27%)	0.197	-	
C15789G	Transversion	non-syn:T=>S	0	1 (2.27%)	0.197	-	
C15604T	Transition	syn:N=>N	7 (20.59%)	0	1.9^{e-05} *	-	+
T15622G	Transversion	syn:L=>L	10 (29.41%)	0	1.1^{e-08} *	-	
T15541C	Transition	syn:P=>P	2 (5.88%)	0	0.034 *	-	+
A15546C	Transversion	non-syn:H=>P	4 (11.76%)	0	0.001 *	-	
C15569T	Transition	syn:L=>L	4 (11.76%)	1 (2.27%)	0.023 *	5.28713	
A15613G	Transition	syn:G=>G	3 (8.82%)	0	0.004 *	-	+
C15608A	Transversion	non-syn:L=>M	2 (5.88%)	0	0.034 *	-	
A15794T	Transversion	non-syn:I=>F	0	1 (2.27%)	0.197	-	
A15799T	Transversion	syn:G=>G	0	1 (2.27%)	0.197	-	
A15802T	Transversion	non-syn:Q=>H	0	1 (2.27%)	0.197	-	
G15553A	Transition	syn:K=>K	0	1 (2.27%)	0.197	-	+
C15641T	Transition	non-syn:L=>F	0	1 (2.27%)	0.197	-	+
C15832G	Transversion	non-syn:I=>M	0	1 (2.27%)	0.197	-	
T15512C	Transition	non-syn:Y=>H	0	1 (2.27%)	0.197	-	+
T15530C	Transition	syn:L=>L	0	1 (2.27%)	0.197	-	+
C15838T	Transition	syn:I=>I	1 (2.94%)	0	1	-	
C15608T	Transition	non-syn:L=>F	1 (2.94%)	0	1	-	
C15577A	Transversion	non-syn:L=>M	1 (2.94%)	0	1	-	
C15580T	Transition	syn:S=>S	1 (2.94%)	0	1	-	
C15589A	Transversion	syn:L=>L	1 (2.94%)	0	1	-	+
T15586C	Transition	syn:I=>I	1 (2.94%)	0	1	-	+
C15587T	Transition	non-syn:L=>F	1 (2.94%)	0	1	-	
C15595T	Transition	syn:S=>S	1 (2.94%)	0	1	-	+
C15577T	Transition	syn:L=>L	1 (2.94%)	0	1	-	
G15734A	Transition	non-syn:A=>T	1 (2.94%)	0	1	-	+
C15574T	Transition	syn:F=>F	0	1 (2.27%)	0.197	-	+
A15851G	Transition	non-syn:I=>V	0	1 (2.27%)	0.197	-	+
T15629C	Transition	syn:L=>L	0	1 (2.27%)	0.197	-	+
A15835T	Transversion	syn:L=>L	0	1 (2.27%)	0.197	-	

syn : synonym mutation
non-syn : non synonym mutation
+ : reported mutation
* : significant difference

Nevertheless, Dasgupta et al. in [22] in a study relating to mutations of Cytochrome b in tumor growth of bladder cancer, have shown by a murine xenograft and human model of bladder cancer, the functional effect of overexpression of a 21-bp deletion mutation of Cytochrome b. They have been able to demonstrate that this on induced significant tumor growth by triggering rapid cell cycle progression through up-regulation of the nuclear factor-kB2 signaling pathway.

The mutations detected in the two groups of healthy and benign tissue were associated to different haplogroups (Table 2). Thus, 5 haplogroups were described which 3 (H, M and L)

common to the two tissue groups. However, the L haplogroup is in the majority in benign tissue with a significance level lower than 0.05 for an Odds Ratio of (0.054) and confidence intervals (CI) of (0.006-0.451). This predominance can be explained by the functional importance that its haplotypes could play in the evolution of benign breast tumors.

Table 2. Haplogroups associated to different mutations.

Haplogroups	Healthy tissues	Benign tissues	P-value	Odds Ratio	C.I
H	16	14	0.051	3.428	1.064-11.043
R	4	0	0.023 *	-	-
M	1	2	1	0.714	0.061 - 8.398
L	1	15	0.001 *	0.054	0.006 - 0.451
B	0	1	1	-	-

The analysis of the Cytochrome b genetic structure in the two groups of tissue (Table 3) has revealed low intra-tissue genetic distances of (0.046) and (0.016) respectively in healthy tissue and benign tissue. This one shows also a low inter-tissue genetic distance of (0.049). In addition to low intra-tissue genetic distances observed, we note also a significant Fst of (0.36942) with a P-value lower than 0.05 corresponding to the level of significance of the Fst. The low inter-tissue genetic distance and the significant Fst are characteristic of a beginning of genetic differentiation between healthy and benign tissue; which besides express the benign state of tumor cells. The low intra-tumorous genetic distance (0.016) can be explained by the monoclonal origin of mammary tumors [23] of which development rests on a succession of waves of clonal expansions. Indeed, a tumor is composed of different subpopulations of abnormal cells having for common points the alterations occurred precociously and whose genesis follows the laws of an evolutionary continuum spatiotemporal [24].

However, in spite of this differentiation between healthy and benign tissue, no significant difference could be noted in the frequency distribution of amino acids between the two tissue groups.

Table 3. Genetic distances and index of differentiation (Fst).

Group of tissues	Intra-tissular genetic distances	Inter-tissular genetic distances	Fst
Healthy tissues	0.046	0.049	0.36942
Benign Tissues	0.016		P-value=0

The detection of signature of natural selection in benign tissue based on the spectrum of allele frequencies (Table 4), indicates that the D of (Tajima) tests corresponding to (-2.39301) and the D and F of (Fu & Li) respectively (-4.01614) and (-4.07023) are significantly negative. This is characteristic to an excess of rare alleles, coherent with a positive or negative selection. We note also that the dN/dS ratio that was used to discriminate according to it's about a positive or negative selection, indicates a value of 1.33333 higher to 1, characteristic of a positive selection [20].

Table 4. Neutrality tests in benign tissues.

Statistique tests	Benign tissues	P-value
D of Tajima	-2.39301	0
D of Fu and Li	-4.01614	0.02
F of Fu and Li	-4.07023	0.02
dN/dS	1.33333	-

This positive selection, called also adaptive selection causes the increase in frequency of variants that confer an advantage in the tumorous microenvironment [25]. This can be explained by an adaptation of tumorous cells to the stroma become permissive. Indeed, the Cytochrome b being a key component of oxidative phosphorylation system, had confer by its mutations, to tumorous cells a selective advantage in their adaptation, survival and proliferation mechanisms. This is besides confirmed by the evolution state of the tumorous cell population, which reveals a rapid growth of population from an ancestral population to low numbers, characterized by a strong haplotype diversity (Hd) of (0.949) for a low nucleotide diversity (Pi) of (0.02438) (Table 5).

Table 5. Indices of diversity and divergence.

	h	Hd	Pi (π)	$\theta\pi$
Healthy tissues	26	0.982 ± 0.012	0.04504 ± 0.00224	0.04792
Benign tissues	27	0.949 ± 0.019	0.02438 ± 0.00604	0.02520

h: number of haplotypes
Hd: haplotype diversity
Pi(π): nucleotide diversity of Nei
$\theta\pi$: theta per site from Pi

Our observations confirm the results of a great number of researchers as for the correlation between mtDNA mutations and tumorigenesis; and yet controverted by another group of researchers. To this effect, two theories are contrasted: the first stipulate that the mtDNA mutations simply arise by chance in tumor progenitor cells without any physiological advantage or tumorigenic requirement. By contrast, the other theory states that these mtDNA mutations stimulate tumor and contribute to tumorigenesis and tumor progression.

In the first theory the authors have hypothesized that the mtDNA mutations in cancerous cells originated from tumorigenesis. Some authors such as Beckman & Ames in [26]) assert that many mtDNA mutations occur at random further to oxidative damage generated by tumor cells. Others such as Warburg in [27] pioneered the study of mitochondrial changes in tumor cells, Coller et al. in [28], and Chinnery et al. in [29] assert that mtDNA mutations do not damage the energy metabolism of cells and that these mutations had the ability to fix or disappear in cells through the mechanism of genetic drift. Moreover, Vega et al. in [30] postulated that the mtDNA mutations in tumor cells were hitchhike mutations and did not play a role in tumorgenesis.

However, the authors of the second theory suggest that the mtDNA mutations in tumor cells acted as a stimulus for tumors and contributed to tumorigenesis and tumorous progression. Indeed, some of them such as Hayashi et al. in

[31] and Dani et al. in [32] have showed that the dysfunction of the mitochondrial genome greatly affected the survival and the proliferation of tumorous cells. Others have also demonstrated that the increasing of ROS caused by mtDNA mutations contributed to tumorigenesis and tumorous progression [33, 34].

Finally, it agree upon admit that mitochondria play an important role in cellular energy metabolism, in the production of free radicals and in apoptosis. Thus, all dysfunction of the mitochondria further to mutations in its genome, affecting its function, could be one of the causality factors of tumorigenesis. However, although the role of mtDNA mutations in tumorigenesis has been studied in detail by various approaches, the conclusions to date remain controverted.

4. Conclusion

In this study, we successfully highlighted the functional importance of Cytochrome b mutations in the evolution of breast benign tumors. 50% of the mutations identified in benign tissues have led to an amino acids change and 12.5% to a change of the reading frame. Moreover, these mutations are subject to a positive selection and that the demographic of benign tissue indicates a rapid growth of population from an ancestral population to low number. These results have allowed accepting the hypothesis of this study that the genetic changes of Cytochrome b would be involved in the evolution of benign breast tumors.

However, it does not remain about it less than the all variants (mutations) identified in this study as being potentials targets of positive selection, could have a functional impact in the evolution of benign breast tumors. Indeed, though it exist many reports on Cytochrome b mutations in divers tumors of different anatomical origin, the functional effect of these in metabolism and cell growth is not clearly elucidated. Thus, this study having a predictive role, our results open the way for future biochemical, proteomic and clinical studies in order to determine the effect of these somatic mutations in the energy metabolism of tumor cells.

Nevertheless, populations genetic, via the detection of selection signature at genomic level, constitute a good alternative to clinical and epidemiological studies in the research of genes or variants implicated in cancers and in human diseases.

References

[1] IARC: International Agency for Research on Cancer (2012) World Estimate Cancer Incidence, All Ages, Female. IARC Press.

[2] Dem A, Traoré B, Dieng MM., Diop PS, Ouajdi T, Lalami MT, Diop M, Dangou JM, Touré P (2008) Gynaecological and breast cancers in Cancer Institut of Dakar. French-speaking Journal of Studies and Reseach / Health 18 (1): 25-29.

[3] Desjardins S (2010) Analyze genes candidates to breast cancer implicated in the interactions with brca1 and brca2. Thesis of doctorate, Physiology-Endocrinology. Québec: Laval University, 234 p.

[4] Bénard J, Larsen CJ (2013) Explicative models of cancer biology: an enlarged vision. Bulletin of Cancer 100: 697-713.

[5] Mbaye F, Dem A, Fall M, Sembène M (2012) Implication of the Cytochrome b nucleotide and protein mutations in the occurrence of breast cancer in Senegal. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology 3(2): 107-114.

[6] Anderson S, Bankier AT, Barrel BG, DE Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier, Smith AJ, Staden R, Young IG (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature 290: 457-465.

[7] Iwata S, Lee JW, Okada K (1998) Complete structure of the 11 subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex. Science 281: 64-71.

[8] Legros F, Chatzoglou E, Frachon P, Ogier de Baulny HA, Laforêt P, Jardel C, Godinot C, Lombès A (2001) Functional characterization of novel mutations in the human Cytochrome b gene. European Journal of Human Genetics 9: 510-518.

[9] Hall TA (1999) Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium 44: 211-232.

[10] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22:4673-4680.

[11] Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N (1999) Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. Nature Genetics 23 (2): 147.

[12] Long F, Yong-Gang Y (2013) An update to MitoTool: Using a new scoring system for faster mtDNA haplogroup determination. Mitochondrion 3: 360-363.

[13] Nei M (1987) Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York.

[14] Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics 25: 1451-1452.

[15] Cavalli-Sforza LL (1966) Population structure and human evolution. Proceedings of the Royal Society of London B: Biology Science 164: 362-379.

[16] Excoffier L, Laval LG, Schneider S (2005) Arlequin V3.1: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online 1: 47-50.

[17] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology & Evolution 28 (10): 2731-2739.

[18] Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics 123 (3): 585-595.

[19] Fu YX, Li W H (1993) Statistical tests of neutrality of mutations. Genetics 133: 693-709.

[20] Vasseur E, Quintana-Murci L (2013) The impact of natural selection on health and disease: uses of the population genetics approach in humans. Evolutionary Applications 6 (4): 596–607.

[21] Elliott HR, Samuels DC, Eden JA, Relton CL, Chinnery PF (2008) Pathogenic Mitochondrial DNA Mutations Are Common in the General Population. The American Journal of Human Genetics 83: 254-260.

[22] Dasgupta S, Hoque MO, Upadhyay S (2008) Mitochondrial Cytochrome b Gene Mutation Promotes Tumor Growth in Bladder Cancer. Cancer Research 68:700-706.

[23] Nkondjock A, Ghadirian P (2005) Risk Factors to breast cancer. Medicine/Sciences 21(2): 175-180.

[24] Guinebretière JM, Menet E, Fourme E (2007) The histological risk, report of the French-speaking higher course of cancerology. Saint paul de Vence. Springer-Verlag France, edition 2007, Paris.

[25] Sabeti PC, Schaffner SF, Fry B, Lohmueller J, Varilly P, Shamovsky O, Palma A, Mikkelsen TS, Altshuler D, Lander ES (2006) Positive natural selection in the human lineage. Science 312: 1614-1620.

[26] Beckman KB, Ames BN (1997) Oxidative decay of DNA. Journal of Biological Chemistry 272: 19633-19636.

[27] Warburg O (1956) On the origin of cancer cells. Science 123: 309-314.

[28] Coller HA, Khrapko K, Bodyak ND, Nekhaeva E, Herrero-Jimenez P, Thilly WG (2001) High frequency of homoplasmic mitochondrial DNA mutations in human tumors can be explained without selection. Nature Genetics 28: 147-150.

[29] Chinnery PF, Samuels DC, Elson J, Turnbull DM (2002) Accumulation of mitochondrial DNA mutations in ageing, cancer, and mitochondrial disease: is there a common mechanism? Lancet 360: 1323-1325.

[30] Vega A, Salas A, Gamborino E, Sobrido MJ, Macaulay V, Carracedo A (2004) mtDNA mutations in tumors of the central nervous system reflect the neutral evolution of mtDNA in populations. Oncogene 23: 1314-1320.

[31] Hayashi J, Takemitsu M, Nonaka I (1992) Recovery of the missing tumorigenicity in mitochondrial DNA-less HeLa cells by intro- duction of mitochondrial DNA from normal human cells. Somatic Cell Molecular Genetics 18: 123-129.

[32] Dani MA, Dani SU, Lima SP (2004) Less deltamtDNA4977 than normal in various types of tumors suggests that cancer cells are essentially free of this mutation. Genetics Molecular Research 3: 395-409.

[33] Esposito LA, Melov S, Panov A, Cottrell BA, Wallace DC (1999). Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96: 4820-4825.

[34] Bostwick DG, Alexander EE, Singh R (2000) Antioxidant enzyme expression and reactive oxygen species damage in prostatic intraepithelial neoplasia and cancer. Cancer 89:123-134.

Open Access Library Journal

Benign Breast Tumors among Senegalese Women: Diversity and Genetic Evolution of D-Loop

Daniel Doupa[1], Badji Marc Noël[1], Fatimata Mbaye[1,2], Sidy Ka[3], Ahmadou Dem[3], Mamadou Kane[2], Mbacké Sembène[1,2]

[1]Department of Biology Animal, Faculty of Science and Technology, University Cheikh Anta Diop, Dakar, Senegal
[2]Sudanian Sahel Animal Populations Biology (BIOPASS), Research Institute for Development (IRD), Bel-Air, Senegal
[3]Cancer Institut, Faculty of Medicine, Pharmacy and Odontology, Cheikh Anta Diop University, Dakar, Senegal
Email: badjimarcnoel@gmail.com

Received 25 July 2015; accepted 11 August 2015; published 20 August 2015

Copyright © 2015 by authors and OALib.
This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).
http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Open Access

Abstract

Subsaharan Africa, as in Senegal, breast cancer is the second after that of cervical in women. However, although most of the studies on breast pathology for cancer, the overwhelming majority of breast lesions, palpable or not are benign and some of them can become cancerous. So this research is done to understand the impact of diversity and genetic evolution of the D-loop in benign breast lesions in senegalese women. The variability of the D-loop was investigated by PCR-sequencing, in twenty eight patients with benign breast tumor. The results revealed a significant presence of specific variants for breast benign tissue, as well as control tissues. The C150T mutation was associated with protection to the presence of benign breast tumors and G247A mutation implicated in an increased risk. Patients of mitochondrial haplogroup L would be significantly more susceptible to these benign breast lesions. And the study of the genetic evolution of breast benign tumors revealed that the D-Loop is not under selection. Finally, a significant correlation was associated with haplotypes C309CC and witnessed the D310, which respectively constitute increased risk groups and susceptible to the contraction of benign breast lesions. All these results allowed to have a global view on the influence of pathogenic mutations on diversity and genetic evolution of the D-Loop observed in senegalese patients with benign breast tumor.

Keywords

Tumor, Benign, Breast Cancer, D-Loop, Diversity, Genetic Evolution, Senegal

Subject Areas: **Genetics**

How to cite this paper: Doupa, D., Noël, B.M., Mbaye, F., Ka, S., Dem, A., Kane, M. and Sembène, M. (2015) Benign Breast Tumors among Senegalese Women: Diversity and Genetic Evolution of D-Loop. *Open Access Library Journal*, **2**: e1758.
http://dx.doi.org/10.4236/oalib.1101758

1. Introduction

In Subsaharian Africa, as in Senegal, breast cancer is the second cancer after that of the cervix in women [1]. This taboo being a wreaking scourge in Africa, is making its prognosis more difficult. Besides, his affections are generally associated with a fear of mutilation, loss of sexual attractiveness and death [2]. With all this information in the media, revealing among other things that one woman in eight will be infected during his life [3], one can easily understand that breast pathologies are a source of anxiety for many women, especially when their mammogram requires additional investigation. However, although most studies on breast cancer pathology concern the process, the overwhelming majority of breast lesions are benign or not palpable [3] [4].

In the body, cells accumulate over time mutations that can alter their behavior, especially their proliferation. Thus mutant cells can evolve and form tumors. Already in 1976, the oncologist Peter Nowell advanced the idea that tumors follow the laws of evolution discovered by Darwin. When most tumors are benign and go unnoticed, some, however, degenerate into cancer when growth becomes uncontrolled. The disease is even worse when the tumor cells, as a result of new mutations, become mobile and metastasize [5].

Benign tumors are not cancerous; they do not proliferate in the body and include a number of diverse and heterogeneous diseases whose nomenclature varies according to the authors [6]. Of these tumors we can distinguish those unrelated to breast cancer (gynecomastia, fibrotic disease) and benign breast diseases that can be associated to the cancer [7]. Among the most studied of the benign tumors, it can be cited: cysts, fibroadenomas, lipomas, intraductal papillomas or the phyllodes tumors. These last two may become cancerous tumors [8]. And one of the biggest challenges in the diagnosis and prevention of breast cancer is early and specific detection of the precancerous lesions.

It is in this context that fits the approach of population's genetic that can be very helpful in such a study of benign breast tumors, and in different ways. Through these multiple analytical tools, population's genetic allows among others to identify variants displaying an unusual level of genetic differentiation between human populations and to determine to what extent the different genomic order process, demographic and selective as well and socio-cultural forces involved in the initiation of tumor observed profiles. It can also help to better understand the evolution of a mutation that confers a greater risk of developing benign breast tumor and those involved in the development to cancer or those involved in resistance to these different pathologies, while completing the clinical and epidemiological approaches in the search for genes and polymorphisms involved in these human diseases.

Our understanding of the development of these tumors and the identification of mutations that determine the properties of the tumor cells are essential in order to reach unambiguous diagnoses or more targeted therapies.

So to better understand the implications of changes in the D-loop in diversity and the genetic evolution of benign breast tumors in the Senegalese population, this research has the following specific objectives: assess the diversity and genetic evolution of the D-loop in breast benign tumors and look for correlations between changes in the D-loop and benign breast tumors.

2. Materials and Methods

2.1. Patients

Thirty-one (31) Senegalese patients with benign breast tumor, supported by the Joliot Curie Cancerology Institute of Aristide Le Dantec hospital of Dakar, were the subject of this study. This study also included a group of 30 Senegalese women as controls.

The clinical and pathological data on the age of patients, the type, size of the tumor, as well as the location of benign breast tumors were obtained from clinical records. Thus patients whose age is known, are between 15 and 25 years, suffering for most of fibroadenoma (76.47%) and samples were most often taken (42.11%) in left breast or (36.84%) in both breasts with a tumor size ranging between 0.5 and 3 cm.

NB: All precautions to respect the anonymity and confidentiality of information are strictly followed and these data are made available only to the study personnel.

Following informed consent of patients, the study was approved by the ethics committee of the University Cheikh Anta Diop of Dakar.

2.2. Extraction, Amplification, PCR and Sequencing

DNA extractions mammary tissues were performed using two protocols: the Puregene DNA Purification method

and Standard Qiagen method.

The extraction protocol previously described by Mbaye *et al.* in 2012 [9].

Polymerase chain reaction (PCR) allow to generate a considerable number of fragments and identical to the target sequence, here the D-loop, facilitating sequencing. This step is based on the ability of Taq polymerase to synthesize the complementary strand by using the matrix, with fragments of oligonucleotides complementary to the template strand, and thus serving as specific primers elongation (2.5 µl of H408: TGTTAAAAGTGCATAC-CGCCA and 2.5 µl of L16340: AGCCATTTACCGTACATAGCACA), and that in the presence of 2 µl of dNTP (deoxyribonucleotide), 1 ul of additional $MgCl_2$, 5 µml of 10X buffer, and 34.9 µl of Milli Q water until the synthesis double-stranded DNA. PCR was carried out either with a volume of 2 µl or concentrated DNA 4 µl or with 8 µl of DNA diluted in order to reach the optimum concentration.

This cyclical process is carried with the following amplification conditions: 15 min of denaturation at 95°C followed by 35 cycles, each cycle consisting of a denaturation (30 sec at 95°C), hybridization (30 sec at 62°C) and elongation (2 min at 72°C) followed by a final elongation period (10 min at 72°C). At the end of the cycles, the amplification products are maintained in a temperature of 10°C in a thermocycler.

The D-loop was sequenced with primer L16340.

2.3. Analysis

The obtained sequences of TS and TB are cleaned and corrected using the v BioEdit software. 5.0.6 [10]. These steps permit to verify the correspondence between the chromatograms and the sequences of each individual to avoid any errors. Then these sequences are aligned using the ClustalW multiple editor Alignment [11] to highlight the similarities, letting then the position of insertions appear, deletions or substitutions.

The frequency distribution of the variants between TS and TB was studied according to the Fisher's exact test with the MitoTool software v. 1.1.2 [12] in order to see the different mutations of the D-loop conferring a greater risk of developing benign breast tumor and those involved in resistance to these various benign pathologies breast. To realize this, the sequences of TS and TB were compared to the revised Cambridge Reference Sequence (RCRS) of the MITOMAP [13] databank under No. NC_012920 accession gi: 251831106.

Then these sequences were ranked according to the haplogroups studied and compared to the controls in order to highlight the different haplogroups associated or not to the risk of developing benign breast tumor, with the Fisher exact test with MitoTool software v 1.1.2 [12]. These haplogroups divided into different families very common in certain geographic areas or even in some populations [14] are combinations of the various mutations in the DNA sequence (or haplotypes) grouped according to their phylogenetic relationships.

In order to study the genetic diversity of the D-loop between benign tumors and control tissues, the nucleotide sequences of compositions, their frequencies, as well as the nature of mutations and the report transversion/transition were performed on MEGA6 [15].

Specific diversity of population parameters (FST) were calculated with Arlequin [16] and obtaining the genetic distances within and between populations (TS and TB) with MEGA 6 [15]. These parameters that reflect the differentiation and the structuring of the D-loop were made, initially for each population and then for different groups divided into individuals belonging or not to haplogroup Saharan L. The latter found to be the most common haplogroup in Senegal [17], as well as throughout West Africa [14].

To study the genetic evolution of the D-loop of benign breast tumors, the number of haplotypes, the diversity and divergence indices and neutrality tests and "Mismatch distributions" or number of pairwise differences were made with DnaSP [18]. These tests are intended to distinguish sequences which evolution follows a neutral progression model to those progressing in a nonrandom process.

Subsequently the study on the incidence of tumors was performed. First by a comparison between haplogroups and age of patients, and a comparison of these haplogroups compared to the typology of diagnosed benign tumors. It was followed by a statistical study based on the chi 2 test ($\chi 2$), conducted using the XLSTAT-Pro 6.1.9 software [19]. Finally, a study was conducted of the frequency distribution of different haplotypes identified based on mutations revealed between positions 303 and 316 of mtDNA, as the Fisher exact test conducted using the MitoTool v 1.1.2 software [12].

For all statistical tests the level of significance (P-value) was chosen at 5%, and the odds ratio which is interpreted as relative risk, was also carried out in some of these analyzes. To this end, the "risk factor" increases when studied Odds ratio is greater than 1, while a preventive factor is rather noted an odds ratio less than.

3. Results

3.1. Nucleotide Sequences Obtained

After alignment and correction and removal of sequences having a very large genetic difference, twenty-eight (28) of the thirty-one (31) sequences from benign tissue, with a length of 560 bp were retained. To these were added twenty-nine (29) to the portion corresponding sequences of the D-loop studied, the same size, obtained from healthy breast tissue. Thus, in total fifty-seven (57) sequences will be considered in genetic analyzes.

3.2. Variability and Structuring of the D-Loop

3.2.1. Mutations in the D-Loop

The portion mtDNA studied extends from position 16374 to position 366, including all of the hypervariable region II (HV2) of the D-loop. The results of the search for mutations in patients and controls are summarized in Table 1.

The results obtained for the benign tissue (Table 1) indicate the presence of 72 variants with 58.33% of transitions, transversions of 36.11% and 5.56% of insertions against 62 variants for healthy tissue with fewer transitions (56.45%) and more than transversions (43.55%). However, these results show that there has 29 variants in common (VC) between healthy tissue (*i.e.* 46.77% of TS variants) and studied benign tissue (*i.e.* 40.28% of TB variants).

Among the most representative of the common variants (present in over 28% of the sequences studied) may be cited: G16390A; T16519C; A73G; T146C; T152C; T195C; A263G; C315CC, in addition to the C150T mutation which is present very significantly ($p = 1.0E-5$) in healthy individuals (41.38%) than in patients (17.86%), unlike the mutation G247A more present significantly ($p = 0.0486$) in patients (28.57%) than in healthy individuals (10.34%). The most represented specific variants to benign tissue are: G79T (34.14%, $p = 3.73e-08$); G81T (39.29%, $p = 9.65e-10$); G97A (46.43%, $p = 2.75e-11$); G228A (28.57%, $p = 2.32e-07$); T310C (35.71%, $p = 6.72e-09$) and healthy tissue: C16478A (10.34%, $p = 0.0002$); C151G (10.34%, $p = 0.0002$); T204G (13.79%, $p = 4.17e-6$); G207A (13.79%, $p = 4.17e-6$) with a very significant presence.

3.2.2. Haplogroups of the D-Loop

Of the fifty-seven (57) individuals sequenced a total of eight (8) haplogroups (B, D, H, L, M, T, U, X) was found. Only haplogroups L, U, B, and M are shown in patients, while haplogroups B, D, H, L, M, T and X are present in the controls (Table 2).

Haplogroup Saharan L, covers more than half of the individuals studied is 54.39%, with a significant difference ($p = 0.0104$; OR = 2.1728) between benign tissue (64.29%) and tissues healthy (44.83%). Asian haplogroups B, D, and M followed with 28.07%, and appear to be more present in patients (32.14%) than in healthy subjects (24.14%). Conversely, the European haplogroups and Berber origin (H, U, T, and X) are in much less very significantly ($p = 4.05e-07$; OR = 0.0927) in patients (3.57%) than in healthy Senegalese women where they are well represented with 31.03%.

The analysis of haplogroups in the L line revealed the presence of L1 (with its sub branches L1c and L1b) that appears both in patients than in controls, unlike under haplogroup L0 only present significantly in patients (7 14%; $p = 0.014$). The sub haplogroup L2 alone occupies nearly 55% of the family L, 29.82% of the studied while under Senegalese Afro-Eurasian haplogroup L3 was observed at significant frequencies, with its subhaplogroups L3K and L3x for patients and L3e with a witness. Of these sub-branches of the family L, the most frequent in patients is L2a (21.43%) with a moderately significant difference ($p = 0.052$) compared with controls (10.34%), while L2b is most present in controls (13.79%) and revealed a significant difference ($p = 0.0125$) for patients with (3.57%). The sub branches and B4a M6a Asian, observed only in patients are also well represented with 17.86%, respectively ($p = 3.67e-06$) and 10.71% ($p = 0.0008$). Among haplogroups in European and Berber origin, H1, H2 and T2 are observed and only significantly in the controls.

3.2.3. Diversity DNA Sequences Benign Breast Tumors and Genetic Structure of Populations

1) Genetic Diversity

The 560 bp of the D-loop analyzed in the twenty-eight (28) patients suffering from benign tumors have 12.14% of variable sites and among them more than half, or 57.36% parsimony are informative, whereas for

Table 1. Positions and frequencies of variants of the D-loop in benign tissue matched to control tissues.

Mutations in the D-loop					Listed on	Type of mutation			Frequencies variants			
rCRS	Positions	VB	VC	VH	Mitomap	Transition	Transversion	Insertion	HT (n = 29)	BT (n = 28)	P-Value	OR
G	16389	A			+	s			-	3.57%	0.1466	-
G	16390		A		+	s			27.59%	35.71%	0.7013	0.9081
T	16392	G					v		-	7.14%	*0.0461	-
C	16393	T			+	s			-	7.14%	*0.0461	-
C	16395			G			v		3.45%	-	0.0711	-
C	16411			A			v		3.45%	-	0.0711	-
A	16421			C			v		3.45%	-	0.0711	-
T	16422			C	+	s			3.45%	-	0.0711	-
T	16468			G			v		3.45%	-	0.0711	-
T	16469			G			v		6.90%	-	*0.0021	-
G	16477			A	+	s			3.45%	-	0.0711	-
C	16478			A			v		10.34%	-	*0.0002	-
T	16479			A			v		3.45%	-	0.0711	-
C	16501			G			v		3.45%	-	0.0711	-
C	16511			T	+	s			3.45%	-	0.0711	-
T	16519		C		+	s			65.52%	60.71%	*0.0155	0.6366
T	16522			A			v		3.45%	-	0.0711	-
A	16525			G	+	s			3.45%	-	0.0711	-
C	16527		T		+	s			6.90%	14.29%	0.5106	1.4215
C	11			A			v		3.45%	-	0.0711	-
C	29			A	+		v		3.45%	-	0.0711	-
T	55	A			+		v		-	7.14%	*0.0461	-
C	33			G	+		v		3.45%	-	0.0711	-
C	61			T	+	s			6.90%	-	*0.0021	-
C	64		T		+	s			6.90%	7.14%	0.5904	0.7067
A	73		G		+	s			93.10%	92.86%	*0.0155	0.6844
A	77	G				s			-	10.71%	*0.0037	-
G	79	T			+		v		-	32.14%	*3.73e–08	-
C	80	A				s			-	14.29%	*0.0006	-
G	81	T			+		v		-	39.29%	*9.65e–10	-
T	83	C				s			-	3.57%	0.1466	-
C	86	G					v		-	17.86%	*0.0001	-
T	89	A					v		-	21.43%	*1.59e–05	-

Continued

G	90	T			+		v	-	3.57%	0.1466	-
G	90	A			+	s		-	7.14%	*0.0461	-
C	91	A					v	-	3.57%	0.14661	-
C	91	G			+		v	-	17.86%	*0.0001	-
A	93		G		+	s		17.24%	17.86%	0.3929	0.7463
A	95		C		+		v	10.34%	3.57%	*0.0287	0.2810
C	96	T			+	s		-	21.43%	*1.60e–05	-
G	97	A			+	s		-	46.43%	*2.75e–11	-
C	98	A					v	-	3.57%	0.1466	-
C	114			G	+		v	6.90%	-	*0.0021	-
C	120			A			v	3.45%	-	0.0711	-
C	140	A					v	-	3.57%	0.1466	-
G	143		A		+	s		10.34%	17.86%	0.5692	1.2791
T	146		C		+	s		27.59%	32.14%	0.4268	0.8044
C	150		T		+	s		41.38%	17.86%	*1.01e–05	0.3007
C	151		T		+	s		3.45%	7.14%	0.5371	1.6565
C	151			G	+		v	10.34%	-	*0.0002	-
T	152		C		+	s		55.17%	78.57%	0.9281	1.0186
C	182		T		+	s		27.59%	28.57%	0.2755	0.7272
A	183		G		+	s		3.45%	3.57%	1	0.9443
G	185		A		+	s		6.90%	7.14%	0.5904	0.7067
G	185		T		+		v	6.90%	14.29%	0.5106	1.4215
G	185			C	+		v	3.45%	-	0.0711	-
C	186		A		+		v	3.45%	3.57%	1	0.9443
A	189		C		+		v	3.45%	3.57%	1	0.9443
A	189		G		+	s		3.45%	10.71%	0.1746	2.6117
T	195		C		+	s		51.72%	50.00%	0.0502	0.6675
A	197			C			v	3.45%	-	0.0711	-
C	198		T		+	s		24.14%	14.29%	*0.0075	0.4064
A	200	G			+	s		-	7.14%	*0.0461	-
T	204		C		+	s		3.45%	7.14%	0.5371	1.6565

Continued

T	204			G	+		v	13.79%	-	*4.17e−6	-
T	206	G			+		v	-	3.57%	0.1466	-
G	207			A	+	s		13.79%	-	*4.17e−6	-
T	208	G			+		v	-	3.57%	0.1466	-
T	217	A					v	-	3.57%	0.1466	-
T	217	G			+		v	-	3.57%	0.1466	-
T	220	A					v	-	3.57%	0.1466	-
G	221	A				s			3.57%	0.1466	-
G	221			C	+		v	3.45%	-	0.0711	-
C	222	T			+	s		-	10.71%	*0.0037	-
T	224	G					v	-	3.57%	0.1466	-
G	228	A			+	s		-	28.57%	*2.32e−7	-
C	231	A					v	-	7.14%	*0.0461	-
A	232			C			v	3.45%	-	0.0711	-
A	235	G			+	s		-	3.57%	0.1466	-
T	236	C			+	s		-	7.14%	*0.0461	-
A	240			T			v	3.45%	-	0.0711	-
G	242	A				s		-	3.45%	0.2715	-
G	247		A		+	s		10.34%	28.57%	*0.0486	2.0798
C	256			T	+	s		3.45%	-	0.0711	-
A	257	C					v	-	3.45%	0.2715	-
A	263		G		+	s		100%	100.0%	*0.0104	0.6824
G	275	A			+	s		-	7.14%	*0.0461	-
T	279			C	+	s		3.45%	-	0.0711	-
T	292			A	+		v	3.45%	-	0.0711	-
A	297			G	+	s		3.45%	-	0.0711	-
C	309			T	+	s		3.45%	-	0.0711	-
T	310	C			+	s		-	35.71%	*6.72e−9	-
T	310	TTC			+		i	-	35.71%	*6.72e−9	-
C	311	T			+	s		-	3.57%	0.1466	-
C	315		CC		+		i	93.10%	60.71%	*8.16e−7	0.4365
C	315	CCG			+		i	-	3.57%	0.1466	-
G	316		C		+		v	3.45%	3.57%	1	0.9443
G	316		GA				i	3.45%	3.57%	1	0.9443
C	317	T			+	s		-	3.57%	0.1466	-

Continued

C	320	T			+	s			-	3.57%	0.1466	-
C	325		T		+	s			3.45%	7.14%	0.5371	1.6565
C	332			T	+	s			3.45%	-	0.0711	-
C	332	A			+		v		-	3.57%	0.1466	-
G	347	C					v		-	3.57%	0.1466	-
A	357		G		+	s			10.34%	14.29%	1	0.9916
Mutations		43	29	33	73 (69.52%)	53 (50.48%)	48 (45.72%)	4 (3.81%)				
TB	72	59.72%	40.28%	-	**53** (73.61%)	**42** (58.33%)	**26** (36.11%)	**4** (5.56%)	*: Significant P-value, p < 0.050			
TS	62	-	46.77%	53.23%	**47** (75.81%)	**35** (56.45%)	**27** (43.55%)	-				

Table 2. Frequency and diversity of haplogroups and sub-haplogroups found among Senegalese women.

Distribution areas	Haplogroups		%HT	%BT	P-value	%HT	%BT	P-value	%HT	%BT	P-value	OR (95% CI)
Sub-Saharan	**L0**	L0a	0.00	7.14	*0.014	0.00	7.14	*0.0140	44.83	64.29	*0.0104	2.1728 (1.232 - 3.832)
	L1	L1b	10.34	14.29	0.5181	13.79	17.86	0.5634				
		L1c	3.45	3.57	1							
	L2	L2a	10.34	21.43	0.0520	27.59	32.14	0.6436				
		L2b	13.79	3.57	*0.0125							
		L2c	3.45	7.14	0.3327							
	L3	L3e	3.45	0.00	0.1140	3.45	7.14	0.3311				
		L3k	0.00	3.57	0.1217							
		L3x	0.00	3.57	0.1217							
Asian	**B2**	B2g	6.90	0.00	*0.0058	13.79	21.43	0.2640	24.14	32.14	0.2702	1.4902 (0.7999 - 2.7763)
	B4	B4a	0.00	17.86	*3.67e-6							
		B4c	6.90	3.57	0.3640							
	D4	D4j	3.45	0.00	0.1140	3.45	0.00	0.2462				
	M6	M6a	0.00	10.71	*0.0008	6.90	10.71	0.4595				
	M56	M56	6.90	0.00	*0.0058							
European and Berber	**H1**	H1a	6.90	0.00	*0.0058	13.79	0.00	*7.49e-5	31.03	3.57	*4.05e-07	0.0927 (0.0313 - 0.2748)
	H2	H2a	6.90	0.00	*0.0058							
	T2	T2b	10.34	0.00	*0.0006	13.79	0.00	*7.49e-5				
		T2c	3.45	0.00	0.1140							
	U5	U5b	0.00	3.57	0.1217	0.00	3.57	0.1212				
	X3	X3a	3.45	0.00	0.1140	3.45	0.00	0.2462				

*: significant p-value. p < 0.05.

twenty-nine (29) healthy controls (560 bp) 16.99% of sites are variable, with only 29.47% of parsimony informative sites. Thus the percentage of informative sites in parsimonies is higher in BD than in the TS. Another parameter tested is the nature of the mutations and the results obtained show that the level of the benign mammary tissues 32.24% of mutations are compared transversions to TS level where 30.99% are transversions. In all cases we will notice that the transitions are always the majority. This results in a transition/transversion report of 2.049 and 2.2267 for TB and TS respectively. The genetic diversity parameters of TS and TB are reported in Table 3.

Table 4 shows that frequency nucleotide bases A and C are more frequent with 30.12% and 27.69% respectively for TB and 30.01% and 27.44% for TS. It has the same torque T + C which is higher than the combination A + G for TB as with TS.

2) Differentiation and Genetic Structure of Populations

Genetic distances (d), which account for the genetic differences within and between tissues were calculated (Table 5), initially for each population and then for different groups divided into individuals belonging or not to haplogroup L. The genetic distance between benign tissues of Senegalese women studied (0.024) is slightly higher than that observed between healthy tissues (0.023). However, the genetic distance intergroup TS nLand TB nL (0.017) is smaller than that between TS L and TB L (0.025).

Table 6 reveals a no significant FST equal to 0 that can illustrate a very little differentiation between healthy people and affected populations. While values between populations divided according haplogroup, appear moderate and significant, with values existing between tissue groups from populations (TS L and TB L) belonging to

Table 3. Genetic diversity parameters of healthy tissue and benign tissue.

		Healthy Tissue	Benign Tissue
Sample size, **N:**		29	28
Length sequence without gaps, **L:**		560	560
Polymorphic sites, **V:**		95 (16.99%)	68 (12.14%)
Informative variable sites, **Pi** :		28 (29.47%)	39 (57.36%)
Total number of mutations, **Eta**:		102 (18.25%)	73 (13.06%)
Nature mutations	Transitions. **s**:	69.01%	67.76%
	Transversion. **v**:	30.99%	32.24%
Transversion/Transition, **R**:		2.267	2.049

Table 4. Frequencies of nucleotide sequences.

	T%	C%	A%	G%	(T+C)%	(A+G)%
Healthy Tissue	24.99	30.01	27.44	17.56	55.00	45.00
Benign Tissue	24.95	30.12	27.69	17.24	55.07	44.93

Table 5. Genetic distances of populations and population groups.

Groups		Genetic distances Intragroup			Genetic distances Intergroup			
HT	HT L	0.015	**0.023**		HT nL	HT L		**HT**
	HT nL	0.024						
BT	BT L	0.030	**0.024**	BT nL	0.017		**BT**	**0.025**
	BT nL	0.008		BT L		0.025		

HT L: healthy tissue belonging to haplogroup L; BT nL: benign tissue not belonging to haplogroup L.

Table 6. Values of genetic differentiation (FST) between populations and population groups.

	HT		HT L	HT nL
BT	0.0000 (p = 0.991)	BT L	0.077*	
		BT nL		0.067*

TS = Healthy Tissue; TB = Benign Tissue

* P-value = 0.000

haplogroup L (FST = 0.077) and between groups populations of tissue (TS nL and TB nL) not belonging to haplogroup L (FST = 0.067) lower.

3) Evolution of the D-loop

A high haplotype diversity (Hd) and a low nucleotide diversity (Pi) were observed with 1 and 0.0238 for benign tissues, and 0.998 and 0.022 for healthy tissue, respectively. These results also show that the Hd and Pi indices benign tissue are slightly higher than those of healthy tissues. In Table 7 there are recorded values of genetic diversity indices (Hd and Pi) TS and TB.

D Tajima (−1.1134), D * (−1.2926) and F * (−1.4558) Fu and Li, show for all benign tissue, negative and non-significant values. The H Fay and Wu is null and non-significant while the Fs of Fu (-18.22) is negatively significant (Table 8).

Graphical representations of the distribution of genetic distances between benign tissues of patients taken in pairs or Mismath distribution (Figure 1), according to the hypothesis of a constant population or growing population, show a multimodal distribution.

3.2.4. Study on the Incidence of Benign Tumors

Table 8 shows a significant difference in the presence of benign tumors, among the very young patients, aged under 20, whose age is known (38.09%) of those at least 20 years (28 57%), belonging to haplogroup L, while in the overall 52.38% (p = 0.011) were 20 years or older. Among patients whose tumor type is known, 76.47% (p = 0.026) are suffering from fibroadenoma which 52.94% are of haplogroup L, with a significant presence of cystic tumors, epithelial, and HSTP good rating (11.77%, p < 0.05) in patients of Asian haplogroup (B & M).

For the microsatellite located between positions 303 and 316 of the noncoding region of the mtDNA molecule, three (3) haplotypes were observed in two patients and (2) in healthy subjects. A control sequence was obtained for Senegalese Women for D310 region. It consists of 7C in the first section and 6C in the second section. It is identified in almost all (96.55%) healthy subjects in this study. Haplotype C309CC identified only in patients shows a very significant presence (with 35.71%; p = 6.42e−13). Comparison of the haplotype frequencies between the control patients (60.71%) and healthy subjects (96.55%) gives a p-value value highly significant (p = 4.41e−11) associated with an Odd ratio value equal to 0.0472. Haplotype C309T is carried by only one healthy individual, while haplotype C311T is present in a single patient. All these polymorphic differences noted in Table 9, are characterized by substitution of a base C by a T basis, except for the insertion C309CC.

4. Discussion

Mutations and polymorphisms of mtDNA have been the subject of intense research for over a decade, in an attempt to understand how they affect fundamental processes such as cancer and aging [20].

The D-loop is the primary replication site of control of mitochondrial DNA and its transcribed [21]. In several of these studies of mtDNA polymorphisms were mainly found in two hypervariable regions of the D-loop: HV1 (16024-16383) and HV2 (57-333) [22]. Indeed, among the changes reported in the literature during recent years, the D310, area located between nucleotides 303 and 315 and interrupted by a T at position 310, has been frequently studied in breast tumor samples [23]-[25]. And it was found that in approximately 42.18% of the region mutated [26].

This poly-C portion [27] (CCCCCCC..TCCCCC), involved in the formation of a persistent RNA-DNA hybrid, which led to the opening of mtDNA during replication of the strand heavy [28] [29], is highly polymorphic in particular the section between C-7 and C-9, with the most common sequence represented by the 7-C [30]-[32]. D310 some variations have also been reported as common variants in normal human tissues (Torroni *et al.*, 1999). An in vitro analysis revealed that the D-loop, especially the D310, is more susceptible to oxidative damage and electrophilic attack compared to other regions of mtDNA [33].

Table 7. Haplotype diversity (Hd) and nucleotide (Pi) of healthy tissue and benign tissue.

	Healthy Tissue	Benign Tissue
Number of haplotypes, h	28	28
Haplotype diversity, **Hd ± sd**	0.998 ± 0.01	1 ± 0.01
Nucleotide diversity, **Pi ± sd**	0.0220 ± 0.0058	0.0238 ± 0.0031

Table 8. Tests of neutrality.

	Benign Tissue
D de Tajima	−1.1134
P-value	p > 0.1
D* de Fu and Li	−1.2926
P-value	p > 0.1
F* de Fu and Li	−1.4558
P-value	p > 0.1
H de Fay and Wu	0.00
P-value	p > 0.1
Fs de Fu	−18.22
P-value	0.000

Table 9. Comparison between haplogroups D-loop, age of patients and types of benign tumors.

Haplogroups BT		Age				Typology			
		<20 years	≥20 years	ND	P-Value	Fibroadenoma	Other	ND	P-Value
L	64.29%	8 (38.09%)	6 (28.57%)	4	p < 0.05	9 (52.94%)	2 (11.77%)	7	p > 0.10
B & M	32.14%	2 (9.52%)	4 (19.04%)	3	p > 0.10	3 (17.65%)	2 (11.77%)	3	p < 0.05
U	3.57%	-	1 (4.76%)	-	0.05 < p <0.1	1 (5.88%)	-	-	p > 0.10
Total	100%	10 (47.61%)	11 (52.38%)	7	0.011	13 (76.47%)	4 (23.53%)	10	0.026

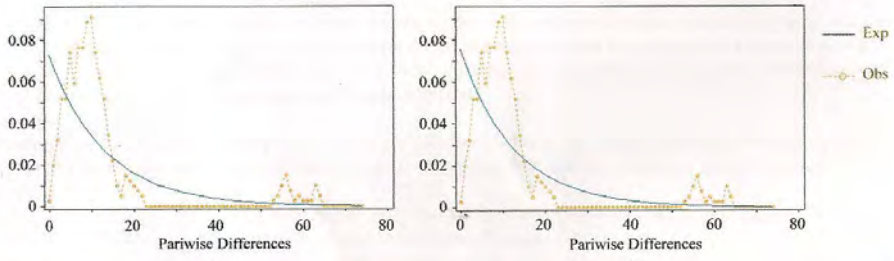


Figure 1. Curves mismatch distribution of the D-loop of benign tissue under the assumption of a constant population (a) and an expanding population (b).

Table 10. Comparison of mitochondrial microsatellite haplotypes 303-316 (D310).

Pattern	Sequence between 303 - 316 bp	HT (n = 29)	BT (n = 28)	P-value	OR	95% CI
Witness	CCCCCCC|CCCCCC	28 (96.55%)	17 (60.71%)	*4.41e−11	0.0472	0.0140 - 0.1592
C309CC	CCCCCCC**C**|CCCCCC	-	10 (35.71%)	*6.42e−13	-	-
C309T	CCCCCC**T**|CCCCCC	1 (3.45%)	-	0.1213	-	-
C311T	CCCCCCC|**T**CCCCC	-	1 (3.57%)	0.1213	-	-

Polymorphisms of mitochondrial DNA are widely used at present as molecular markers in evolutionary biology and population genetics in studies on the distribution of genetic variability levels within and between population-the relatedness between individuals, etc.

In addition to cytoplasmic localization of mitochondria and high copy number of mtDNA molecules, add its quasi-native transmissibility and replicative segregation experienced by mitochondria during cell divisions. Several recent studies of mtDNA in the tumor reported high mutation rate of the non-coding region of the D-loop.

The identification of these mutations of the mitochondrial DNA considered pathogenic in benign lesions, as well as their early onset, may be particularly interesting.

In this present study, a total of 28 patients with benign breast tumors and 29 control subjects were analyzed in order to determine the genetic diversity and evolution of the D-loop in benign tumors of the breast in Senegalese women. Among the more common variants, the mutations G16390A; T16519C; A73G; T146C; C182T; T195C; A263G; C315CC have less than 1 Odd ratio (OR < 1) that mean a reduction in the relative risk RR, and therefore a preventive factor to the presence of benign tumors of the breast, with the exception of the T152C mutation more present in a non-significant way (p = 0.9281) in patients (78.57%) than in healthy subjects (55.17%). Two common variants have also been identified, C150T, associated in some studies with longevity [34], more frequent significantly (p = 1.01e−05) in normal tissues than in benign tissues with an OR = 0.3007, unlike the G247A mutation (p = 0.0486, OR = 2.0798). And the C150T mutation could be associated with protection in the presence of benign breast tumor while the G247A mutation is involved in an increased risk. A very significant difference (p < 2.32e−07) was observed for all the most common mutations specific to patients (G79T, G81T; G97A, G228A, T310C) compared to the control group. These can be found to be associated with a risk of benign breast tumor among Senegalese women, while C16478A mutations, C151G, T204G and G207A would be associated with an absence of tumor present in a significant way (p < 0.0002) in healthy subjects.

Many studies have identified several mutations detected in both the genes of the human mitochondrial DNA and in the main non-coding region (D-loop). In literature, some studies suggest the involvement of mutations of this mtDNA control region containing the main promoters in human carcinogenesis [35]-[37]. Several studies have even reported the presence of the mutations T146C, T152C, C150T and other polymorphisms in the tumor cells [38] [39] and in various body tissues and fluids [40]-[43]. The C150T mutation in particular was significantly indicated for an increased risk of cervical cancer among Chinese women [44] while T16519C is recognized to increase the risk of breast cancer [45]. Thus these results show that these specific mitochondrial polymorphisms may be useful for the development of biomarkers for early detection of tumors.

The study of patients with some of these mitochondrial mutations, was continued to distinguish haplogroups which are more apt of developing a benign breast tumor.

And a prevalence of the presence of benign tumors in, higher and significant (p = 0.0104) with OR = 2.1728 in a confidence interval 95% CI = (1.2320 - 3.8322) for mitochondrial haplogroups d Sub-Saharan origin (mainly L) and a significantly lower prevalence (p = 4.05e−07) with OR = 0.0927 in a 95% CI = (0.0313 - 0.2748) for the origins of European haplogroups and Berber, have been noticed in patients compared to controls group. Despite the non-significant higher prevalence observed for haplogroups Asian origin, one is tempted to say that the more Senegalese women's breast tissue are from L mitochondrial haplogroup, the higher is the risk of getting benign breast tumor , while haplogroups (H and T in particular) of Berber and European origins have a protective effect in this study population.

The mitochondrial haplogroup composition of this population revealed a broad spectrum of different geographical origins haplogroups. It turned out that in the first human settlements, people from Europe and Asia

have brought with them a fraction of their genetic variability, leaving appear in SSA non-African haplogroups [46]-[49], as demonstrated in this study of Senegalese population. In fact, Chen *et al.* [17] in a study of mtDNA variation in African populations, remarked that "in addition to haplogroup L, other haplogroups that were more similar to those noted in the European and Asian were present in Senegal". It is because of the long cultural and economic interactions that occurred with saharan and north african people, and genetic exchanges with European populations. However, according Torroni *et al.* [50]-[53], African haplogroup L is the most divergent and the oldest to the specific haplogroups regarding the Asian, European and Native American. Thus this high prevalence recorded for subjects belonging to haplogroup L may suggest that it may be the result of this high divergence. Studying these different variants observed today in these different haplogroups and sub haplogroups, particularly those of the line L, will allow certainly to better identify the mutations responsible for benign breast disease, but also to understand the evolution history of senegalese people.

To examine the effect of these evolutionary forces in this studied population, several parameters were investigated. Thus, it has been noticed in the results, the parsimony informative sites as well as the number of transversions are higher in TB than in TS. This leads to a value of the genetic distance intra higher benign tissue at the level of TS.

The FST obtained allowed also to observe a moderate genetic differentiation between populations (TS L and L TB) belonging to haplogroup L (FST = 0.077) and that between populations (TS nL and TB nL) not belonging to haplogroup L (FST = 0.067). These results correlated with the values of genetic distances inter populations belonging to haplogroup L (d = 0.025) and between populations that do not belong to haplogroup L (d = 0.017) illustrate the existence of a difference Genetic between healthy tissue and benign tumors, but also supports the fact that the risk of benign breast tumor is associated with Senegalese women whose mitochondrial haplogroup is L, which have a genetic distance inter populations and higher TSP than those observed for people not belonging to haplogroup L.

The analysis of the genetic variability of the D-loop of breast tissues showed high haplotype diversity (Hd) and low nucleotide diversity (Pi), both in benign tissue than in control tissue with a slight superiority Hd and Pi clues in TB. This would suggest a rapid growth of breast cells, more accentuated in benign breast tumors. Typically the tumor cells are characterized by a more rapid cell proliferation, due to the presence of alterations in genes that regulate the proliferation in normal cells (or proto-oncogenes), which is then activated in oncogenes and suppressor genes tumor (or anti-oncogenes), associated with dysfunction of the DNA opposite the regulation of the cell cycle and genome repair system [54] [55]. These are actually mutations which are the ultimate source of genetic variation at the origin of diversity for all organisms, thus playing the role of engine of evolution [56] [57]. However, according to the model of Motoo Kimura called "theory of mutation and random drift": most of the genetic variability is neutral and polymorphisms are removed or fixed in people under the influence of effects environmental genetic drift [58].

In order to estimate the influence of neutral processes and selective processes, the study of the evolution of the D-loop in Senegalese patients has been continued. And the results show for negative values of neutrality and non-significant tests of Tajima D, D * and F * Fu and Li, rejecting then the idea of a possible selection of the D-loop. This trend was confirmed by the Fu' Fs value that is significantly negative, as the H Fay and Wu which turned null and unsignificant. Indeed for non-coding sequences such as mitochondrial DNA control region, a gap regarding neutrality is most likely explained by recent demographic changes than by selection [59], in other words this evolution would be due to an excess of recent changes, the cause of this presence of benign legions in breast. These findings on the D-loop's evolution seem to confirm the non-lethal benign tumors unlike cancerous tumors for which it has been shown that D-Loop is under selection [60]. The curves of mismatch distributions that have shown a multimodal distribution for benign tissue with a deviation of the observed distribution compared to that expected, suggest the signing of a moderate growth of a given population.

In the study on the incidence of benign breast tumors in Senegalese women, the linkage of haplogroups and clinic pathological parameters in this case the age and typology found in patients of haplogroup L, a significant prevalence for younger patients, aged under 20, while overall a significant prevalence was observed for patients aged 20 years or more. Furthermore a significant incidence of fibroadenomas was observed among benign breast present in this sample.

The analysis of microsatellite polymorphism located between positions 303 and 316 of the D-loop, found that of all 28 patients studied, 17 (or 60.71%) have in common haplotype indicator with the majority healthy individuals (96.55%) and almost one third of patients (35.71%) have specific haplotype C309CC to TB. After com-

parison of the distribution of haplotype frequencies between the carriers of benign tumors in healthy women and a highly significant p-value value (p = 4.41e−11) associated with a value of 0.0472 was OR = the witness observed haplotype and for the reason C309CC a very significant presence (p = 6.42e−13) was noted. These correlate results would mean that among the Senegalese with haplotype witness, nearly 2/3 are likely to get a breast tumor while those with haplotype C309CC would constitute an increased risk group. However, the study of a large group of patients and controls should be considered to confirm these results.

V. Conclusion

Examining the process of tumorigenesis by molecular analysis of mtDNA remains at present a great challenge because many factors must be taken into account, increasing the complexity and difficulties of analysis and interpretation of results.

With the aim to establish a correlation between changes in the D-loop of mtDNA and the appearance among Senegalese women of benign tumors, we observed initially a genetic diversity of the population assigned with respect to the normal. Thus, in addition to the big haplotype diversity recorded for all individuals studied, the results revealed the existence of a genetic difference between healthy tissue and benign tumors, and a significant presence of specific variants with benign breast tumors, as well as healthy tissue.

Therefore we can state that the D-loop is a good molecular marker for early and specific detection of benign and precancerous lesions.

References

[1] Ly, M., Antoine, M., André, F., Callard, P., Bernaudin, J.F. and Diallo, D.A. (2011) Le cancer du sein chez la femme de l'Afrique sub-saharienne: Etat actuel des connaissances. *Bulletin du Cancer*, **98**, 797-806.

[2] Badid, N. (2012) Stress oxydatif et profil nutritionnel chez une population de femmes atteintes de cancer du sein dans la région de Tlemcen. Thèse Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, Algérie, 200 p.

[3] Boisvert, G. (2013) Les lésions bénignes du sein. Spécial cancer du sein. *Le patient*, **7**, 38-41.

[4] Chauvet, M.P., Jafari, M., Lambaudie, E. and Giard, S. (2006) Benign Tumors and Complex Lesions: Surgeon's Point of View. 28èmes journées de la Société française de sénologie et de pathologie mammaire (SFSPM), Lille, 355-360.

[5] [illegible]

[6] www.novartis.fr/

[7] Picard, S.F. (2003) Rôle de l'instabilité génétique dans la réponse aux traitements dans une population de cancers du sein localement avancés et traités par chimiothérapie première. Mémoire école pratique des hautes études, France, 41 p.

[8] [illegible]

[9] Mbaye, F., Dem, A., Fall, M. and Sembène, M. (2012) Implication of the Cytochrome Bull Nucleotide and Protein Mutations in the Occurrence of Breast Cancer in Senegal. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, **3**, 107-114.

[10] Hall, T. (2001) BioEdit Version 5.0.6. North Carolina State University, Raleigh.

[11] Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. *Nucleic Acids Research*, **22**, 4673-4680. http://dx.doi.org/10.1093/nar/22.22.4673

[12] Long, F. and Yong-Gang, Y. (2013) An Update to MitoTool: Using a New Scoring System for Faster mtDNA Haplogroup Determination. *Mitochondrion*, **13**, 360-363. http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2013.04.011

[13] [illegible].

[14] Coudray, C., Torroni, A., Achilli, A., Pala, M., Olivieri, A., Larrouy, G. and Dugoujon, J.M. (2009) Les lignées mitochondriales et l'histoire génétique des populations berbérophones du nord de l'Afrique. *Antropo*, **18**, 63-72. www.didac.ehu.es/antropo

[15] Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. (2013) MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, **30**, 2725-2729. [illegible]

[16] Excoffier, L., Laval, G. and Schneider, S. (2005) Arlequin Version 3.0: An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**, 47-50.

[17] Chen, Y.-S., Torroni, A., Excoffier, L., Santachiara-Benerecetti, A.S. and Wallace, D.C. (1995) Analysis of mtDNA

Variation in African Populations Reveals the Most Ancient of All Human Continent Specific Haplogroups. *American Journal Human Genetics*, **57**, 133-149.

[18] Rozas, J., Librado, P., Sánchez-Del Barrio, J.C., Messeguer, X. and Rozas, R. (2010) DnaSP Version 5 Help Contents (Help File). http://www.ub.edu/dnasp/

[19] [illegible].

[20] Czarnecka, A.M. and Bartnik, E. (2011) The Role of the Mitochondrial Genome in Ageing and Carcinogenesis. *Journal of Aging Research*, **2011**, Article ID: 136435.

[21] Suzuki, M., Toyooka, S., Miyajima, K., Iizasa, T., Fujisawa, T., Bekele, N.B. and Gazdar, A.F. (2003) Alterations in the Mitochondrial Displacement Loop in Lung Cancers. *Clinical Cancer Research*, **9**, 5636-5641.

[22] Klemba, A., Kowalewska, M. and Kukwa, W. (2010) Mitochondrial Genotype in Vulvar Carcinoma-Cuckoo in the Nest. *Journal of Biomedical Science*, **17**, 73. http://dx.doi.org/10.1186/1423-0127-17-73

[23] Parrella, P., Seripa, D., Matera, M.G., Rabitti, C., Rinaldi, M., Mazzarelli, P., Gravina, C., Gallucci, M., Altomare, V., Flammia, G., Casalino, B., Benedetti-Panici, P.L. and Fazio, V.M. (2003) Mutations of the D310 Mitochondrial Mononucleotide Repeat in Primary Tumors and Cytological Specimens. *Cancer Letters*, **190**, 73-77. http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3835(02)00578-5

[24] Aral, C., Kaya, H., Ataizi-Celikel, C., Akkiprik, M., Sonmez, O., Gulluoglu, B.M. and Ozer, A. (2006) A Novel Approach for Rapid Screening of Mitochondrial D310 Polymorphism. *BMC Cancer*, **6**, 21.

[25] Xu, C., Tran-Thanh, D., Ma, C., May, K., Jung, J., Vecchiarelli, J. and Done, S.J. (2012) Mitochondrial D310 Mutations in the Early Development of Breast Cancer. *British Journal of Cancer*, **106**, 1506-1511. [illegible]

[26] Santos Jr., G.C., Góoes, A.C., Vitto, H.D., Moreira, C.C., Avvad, E., Rumjanek, F.D. and Gallo, C.V. (2012) Genomic Instability at the 13q31 Locus and Somatic mtDNA Mutation in the D-Loop Site Correlate with Tumor Aggressiveness in Sporadic Brazilian Breast Cancer Cases. *Clinics* (*Sao Paulo*), **67**, 1181-1190. [illegible]

[27] Yacoubi-Loueslati, B., Troudi, W., Baccar, A., Cherni, L., Ben Rhomdhane, K. and Ben Ammar Elgaaied, A. (2009) Polymorphism of the Mitochondrial Microsatellite 303-315 in Breast Cancer in Tunisia. *Bulletin du Cancer*, **96**, 337-342.

[28] Kang, D., Miyako, K., Kai, Y., Irie, T. and Takeshige, K. (1997) *In Vivo* Determination of Replication Origins of Human Mitochondrial DNA by Ligation-Mediated Polymerase Chain Reaction. *Journal of Biology and Chemistry*, **272**, 15275-15279. [illegible]

[29] Lee, D.Y. and Clayton, D.A. (1998) Initiation of Mitochondrial DNA Replication by Transcription and R-Loop Processing. *Journal of Biology and Chemistry*, **273**, 30614-30621. [illegible]

[30] Jin, X., Zhang, J., Gao, Y., Ding, K., Wang, N., Zhou, D., Jen, J. and Cheng, S. (2007) Relationship between Mitochondrial DNA Mutations and Clinical Characteristics in Human Lung Cancer. *Mitochondrion*, **7**, 347-353. http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2007.06.002

[31] Yu, M., Zhou, Y., Shi, Y., Ning, L., Yang, Y., Wei, X., Zhang, N., Hao, X. and Niu, R. (2007) Reduced Mitochondrial DNA Copy Number Is Correlated with Tumor Progression and Prognosis in Chinese Breast Cancer Patients. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, **59**, 450-457. http://dx.doi.org/10.1080/15216540701509955

[32] Chatterjee, A., Dasgupta, S. and Sidransky, D. (2011) Mitochondrial Subversion in Cancer. *Cancer Prevention Research*, **4**, 638-654. http://dx.doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-10-0326

[33] Mambo, E., Gao, X., Cohen, Y., Guo, Z., Talalay, P. and Sidransky, D. (2003) Electrophile and Oxidant Damage of Mitochondrial DNA Leading to Rapid Evolution of Homoplasmic Mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 1838-1843. [illegible]

[34] Chen, A., Raule, N., Chomyn, A. and Attardi, G. (2012) Decreased Reactive Oxygen Species Production in Cells with Mitochondrial Haplogroups Associated with Longevity. *PLoS ONE*, **7**, e46473. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0046473

[35] Lee, H.-C., Li, S.H., Lin, J.C., Wu, C.C., Yeh, D.C. and Wei, Y.-H. (2004) Somatic Mutations in the D-Loop and Decrease in the Copy Number of Mitochondrial DNA in Human Hepatocellular Carcinoma. *Mutation Research*, **547**, 71-78. [illegible]

[36] Van Trappen, P.O., Cullup, T., Troke, R., Swann, D., Shepherd, J.H., Jacobs, I.J., Gayther, S.A. and Mein, C.A. (2007) Somatic Mitochondrial DNA Mutations in Primary and Metastatic Ovarian Cancer. *Gynecologic Oncology*, **104**, 129-133. http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2006.07.010

[37] Sharawat, S.K., Bakhshi, R., Vishnubhatla, S. and Bakhshi, S. (2010) Mitochondrial D-Loop Variations in Paediatric

Acute Myeloid Leukaemia: A Potential Prognostic Marker. *British Journal of Haematology*, **149**, 391-398. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08084.x

[38] Chen, J.Z. and Kadlubar, F.F. (2004) Mitochondrial Mutagenesis and Oxidative Stress in Human Prostate Cancer. *Journal of Environmental Science and Health, Part C: Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*, **22**, 1-12.

[39] Yoneyama, H., Hara, T., Kato, Y., Yamori, T., Matsuura, E.T. and Koike, K. (2005) Nucleotide Sequence Variation Is Frequent in the Mitochondrial DNA Displacement Loop Region of Individual Human Tumor Cells. *Molecular Cancer Research*, **3**, 14-20.

[40] Fliss, M.S., Usadel, H., Caballero, O.L., Wu, L., Buta, M.R., Eleff, S.M., Jen, J. and Sidransky, D. (2000) Facile Detection of Mitochondrial DNA Mutations in Tumors and Bodily Fluids. *Science*, **287**, 2017-2019.

[41] Jerónimo, C., Nomoto, S., Caballero, O.L., Usadel, H., Henrique, R., Varzim, G., Oliveira, J., Lopes, C., Fliss, M.S. and Sidransky, D. (2001) Mitochondrial Mutations in Early Stage Prostate Cancer and Bodily Fluids. *Oncogene*, **20**, 5195-5198. http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1204646

[42] Zhu, W., Qin, W., Wessel, A., Puckett, C.L. and Sauter, E. (2005) Mitochondrial DNA Mutations in Breast Cancer Tissue and in Matched Nipple Aspirate Fluid. *Carcinogenesis*, **26**, 145-152. http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgh282

[43] Wang, C., Zhang, F., Fan, H., Peng, L., Zhang, R., Liu, S. and Guo, Z. (2011) Sequence Polymorphisms of Mitochondrial D-Loop and Hepatocellular Carcinoma Outcome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **406**, 493-496.

[44] Zhai, K., Chang, L., Zhang, Q., Liu, B. and Wu, Y. (2011) Mitochondrial C150T Polymorphism Increases the Risk of Cervical Cancer and HPV Infection. *Mitochondrion*, **11**, 559-563.

[45] Bai, R.K., Leal, S.M., Covarrubias, D., Liu, A. and Wong, L.J. (2007) Mitochondrial Genetic Background Modifies Breast Cancer Risk. *Cancer Research*, **67**, 4687-4694.

[46] Cann, R.L., Stoneking, M. and Wilson, A.C. (1987) Mitochondrial DNA and Human Evolution. *Nature*, **325**, 31-36.

[47] Excoffier, L. (2002) Human Demographic History: Refining the Recent African Origin Model. *Current Opinion in Genetics and Development*, **12**, 675-682.

[48] Jakobsson, M., Scholz, S.W., Scheet, P., Gibbs, J.R., VanLiere, J.M., Fung, H.C., Szpiech, Z.A., Degnan, J.H., Wang, K., Guerreiro, R., Bras, J.M., Schymick, J.C., Hernandez, D.G., Traynor, B.J., Simon-Sanchez, J., Matarin, M., Britton, A., Van De Leemput, J., Rafferty, I., Bucan, M., Cann, H.M., Hardy, J.A., Rosenberg, N.A. and Singleton, A.B. (2008) Genotype, Haplotype and Copy-Number Variation in Worldwide Human Populations. *Nature*, **451**, 998-1003. http://dx.doi.org/10.1038/nature06742

[49] Li, J.Z., Absher, D.M., Tang, H., Southwick, A.M., Casto, A.M., Ramachandran, S., Cann, H.M., Barsh, G.S., Feldman, M., Cavalli-Sforza, L.L. and Myers, R.M. (2008) Worldwide Human Relationships Inferred from Genome-Wide Patterns of Variation. *Science*, **319**, 1100-1104.

[50] Torroni, A., Chen, Y.-S., Semino, O., Santachiara-Benerecetti, A.S., Scott, R.C., Lott, M.T., Winter, M. and Wallace D.C. (1994) Mitochondrial DNA and Y-Chromosome Polymorphisms in Four Native American Populations from Southern Mexico. *The American Journal of Human Genetics*, **54**, 303-318.

[51] Torroni, A., Lott, M.T., Cabell, M.F., Chen, Y.-S., Lavergne, L. and Wallace, D.C. (1994) Mitochondrial DNA and the Origin of Caucasians: Identification of Ancient Caucasian-Specific Haplogroups, One of Which Is Prone to a Recurrent Somatic Duplication in the D-Loop Region. *The American Journal of Human Genetics*, **55**, 760-776.

[52] Torroni, A., Miller, J.A., Moore, L.G., Zamudio, S., Zhuang, J., Droma, T. and Wallace, D.C. (1994) Mitochondrial DNA Analysis in Tibet. Implications for the Origin of the Tibetan Population and Its Adaptation to High Altitude. *American Journal of Physical Anthropology*, **93**, 189-199.

[53] Torroni, A., Neel, J.V., Barrantes, R., Schurr, T.G. and Wallace, D.C. (1994) A Mitochondrial DNA "Clock" for the Amerinds and Its Implications for Timing Their Entry into North America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **91**, 1158-1162. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.91.3.1158

[54] Poehlmann, A. and Roessner, A. (2010) Importance of DNA Damage Checkpoints in the Pathogenesis of Human Cancers. *Pathology Research and Practice*, **206**, 591-601. http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2010.06.006

[55] Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, **144**, 646-674. http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013

[56] Parent, G.J. (2008) Acclimatation thermique de la palourde américaine, *Mercenaria mercenaria*: Expérimentation en jardin commun. Mémoire Université du Québec à Rimouski, 76 p.

[57] William, M. (2011) Diversité génétique et adaptation au milieu chez les arbres forestiers tropicaux: Etude chez le genre Virola (Myristicaceae). Thèse génétique écologique, Université des Antilles et de la Guyane, Guadeloupe, 178 p.

[58] Bergeault, K. (2010) Identification de deux genes NPR1 chez les Vitaceae, analyse de leur diversite de sequences et interactions avec les facteurs de transcription VVTGA. Thèse, Universite de Haute-Alsace, Mulhouse, 173 p.

[59] Razafindrazaka, H. (2010) Le peuplement humain de Madagascar: Anthropologie génétique de trois groupes traditionnels. Thèse Biotechnologie, Anthropobiologie, Université Toulouse III—Paul Sabatier, Toulouse, 277 p.

[60] Mbaye, F. (2015) Le cancer du sein chez les femmes senegalaises: Impact de la variabilite nucleotidique et de l'instabilite de loci microsatellites. Thèse Génétique des Populations, Universite Cheikh Anta Diop de Dakar, Dakar, 131 p.