

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. RESULTATS

III.1.1. Alignement de séquences nucléotidiques

Les séquences des deux groupes de tissus mammaires obtenues après séquençage font un total de 57 séquences alignées dont 22 tissus témoins (T) et 35 tissus Cancéreux (CS). Le numéro qui est affecté au tissu coïncide avec celui de l'individu échantillonné. La taille des séquences de tissus sains comme cancéreux est de 513 pb (paires de bases). La figure 5 ci-dessous montre une portion de l'alignement de séquences nucléotidiques du *Cyt b*.

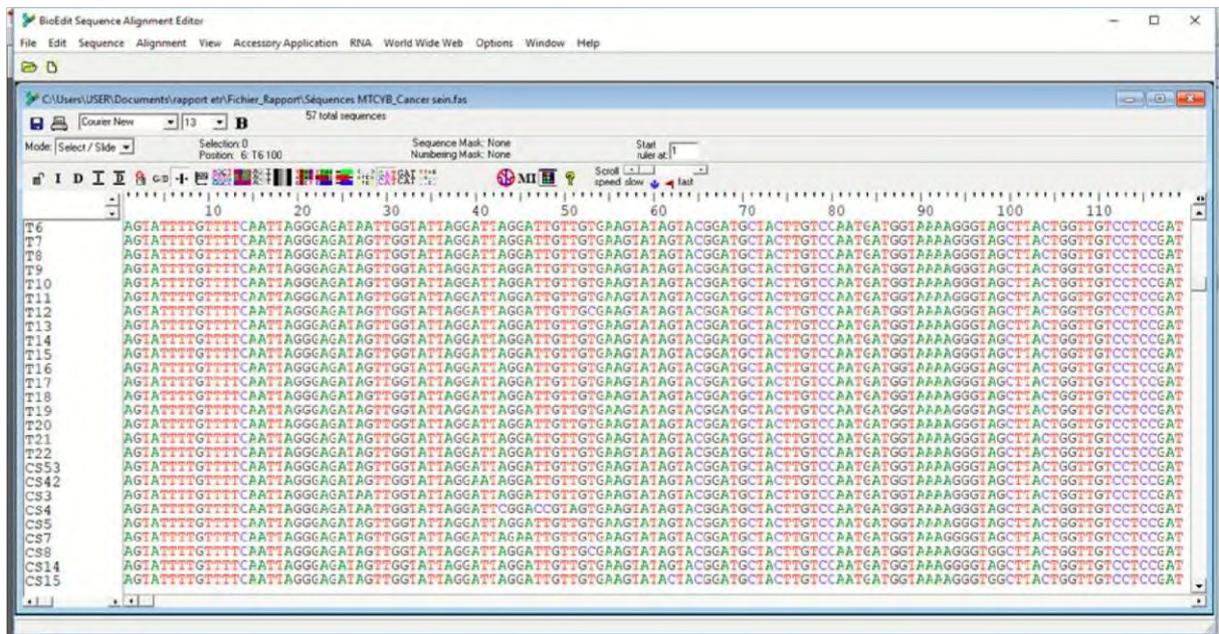


Figure 5 : Exemple de séquences corrigées et alignées par l'éditeur BioEdit version 7.0.5.3. (Hall, 1999)

III.1.2. Variabilité génétique

III.1.2.1. Paramètres basiques de la diversité génétique

L'analyse du polymorphisme des séquences des deux groupes de tissus, révèle une très grande variabilité du *Cyt b* au niveau des tissus cancéreux, mais faible au niveau des tissus sains (Tableau I). En effet, sur 513 sites seulement 7 sont variables pour les tissus sains alors que 141 le sont chez les tissus cancéreux (dont 98 sites informatifs). Si on considère le nombre total de mutation, on constate qu'il y en a 173 pour les tissus cancéreux, versus 7 pour les tissus sains. Le polymorphisme

des séquences de tissus cancéreux est très net en observant le nombre d'haplotypes : 34 haplotypes sur 35 taxa pour les tissus cancéreux, alors qu'il y en a 7 pour 22 taxa chez les tissus sains. On peut ajouter la faible différence nucléotidique chez ces derniers (0.874), alors qu'elle est relativement élevée chez les tissus cancéreux (31.116). On note que chez les 2 groupes de tissus les transitions sont supérieures aux transversions. En effet, les transitions sont largement supérieures aux transversions avec 99,67% contre 0,34% chez les tissus sains (presque pas de transversions) avec un taux de mutation de 249,34% ; et 65,23% contre 34,77% chez les tissus cancéreux avec un taux de mutation de 1,88%.

Tableau I : diversité génétique intra-tissulaire

Paramètres	Tissus témoins	Tissus cancéreux
Nombre de sites (N)	513	
Taille échantillon (n)	22	35
Sites conservés (C)	506	372
Sites variables (V)	7	141
Sites singletons (S)	5	43
Sites informatifs (Pi)	2	98
Nombre total de mutation (ETA)	7	173
Nombre d'haplotypes (h)	7	34
Nombre moyen de différences nucléotidiques (k)	0,874	31,116
Pourcentage de transitions	99,67	65,23
Pourcentage de transversions	0,34	34,77
Taux de mutation (R) (en %)	249,34	1,88

❖ Types de substitution

Vu qu'il n'y a très peu de mutations au niveau des tissus sains, les taux de substitution synonyme (Ks) et non-synonyme (Kns) sont étudiés avec les tissus cancéreux (Tableau II). Les résultats nous montrent une supériorité des substitutions non-synonymes (0.059) (favorisant des changements d'acides aminés) par rapport aux substitutions synonymes (0.036). Ainsi le ratio Kns/Ks utilisé pour discriminer selon qu'il s'agit d'une sélection positive ou négative, indique une valeur de 1,639 supérieur à 1.

Tableau II : types de substitution au niveau des tissus cancéreux

paramètres	Tissus cancéreux
Substitution synonyme (Ks)	0.036±0.009
Substitution non-synonyme (Kns)	0.059±0.008
Rapport Kns/Ks	1,639

❖ Variations d'acides aminés

L'analyse de la diversité protéique inter-tissulaire (Tableau III) par la mise en évidence des variations d'acides aminés, indique qu'il y a de manière générale de faibles variations de fréquences d'acides aminés entre les deux groupes de tissus. On note cependant l'absence de 4 acides aminés chez les tissus témoins alors qu'ils sont présents chez les tissus cancéreux. Il s'agit de l'acide aspartique (Asp), l'histidine (His), la proline (Pro), et la thréonine (Thr).

Tableau III : Fréquence des acides aminés (en %)

Acides aminés	Tissus témoins	Tissus cancéreux
Ala	0,637	0,495
Cys	5,125	3,302
Asp	0	0,146
Glu	3,764	3,798
Phe	3,822	4,256
Gly	21,054	19,669
His	0	0,403
Ile	2,548	2,110
Lys	1,911	2,422
Leu	20,388	19,834
Met	5,734	5,559
Asn	2,548	2,073
Pro	0	0,862
Gln	1,911	2,091
Arg	7,008	6,183
Ser	3,185	4,550
Thr	0	0,990
Val	10,194	11,321
Trp	8,253	7,596
Tyr	1,911	2,330
Total	156,954	155,714

III.1.2.2. Diversité génétique

L'analyse des indices de diversité génétique des tissus (Tableau IV), révèle une forte diversité haplotypique (0,998) contre une faible diversité nucléotidique (0,06) chez les tissus cancéreux. Pour les tissus sains, on a une diversité haplotypique moyenne (0,541), et une diversité nucléotidique très faible (0,001).

Tableau IV : Indices de diversité génétique

Indices	Tissus cancéreux	Tissus sains
Diversité haplotypique (hd)	0,998	0,541
Diversité nucléotidique (Pi)	0,06	0,001

III.1.3. Structure génétique

III.1.3.1. Différenciation génétique tissulaire

L'analyse de la différenciation génétique du Cyt b au niveau des deux groupes de tissus sains et cancéreux (Tableau V) a révélé une très faible distance génétique au niveau des tissus sains (0,001) et une distance génétique un peu plus élevée au niveau des tissus cancéreux (0,136). Celle-ci montre également une distance génétique inter-tissulaire assez élevée de 0,152.

En plus des distances génétiques intra et inter-tissulaires observées, on note également un F_{st} élevée de 0,477.

Tableau V : Indices de différenciation génétique entre tissus

Indices	Tissus sains	Tissus cancéreux
Distances génétiques	Intra-tissulaire	0,001
	Inter-tissulaires	0,136
F_{st}		0,152
		0,477

F_{st} = degrés de différenciation génétique

III.1.3.2. Structure génétique des tissus cancéreux selon l'âge

Le tableau VI montre l'impact de l'âge sur la structuration génétique des tissus cancéreux. En regardant le pourcentage d'AMOVA, on constate que 2,58% de la structuration génétique est dû à ce facteur (l'âge). Aussi faible que le Fst global soit (0,02), il y a une différenciation génétique entre nos sous populations 1,2 et 3 (1 = Inférieur à 35 ans ; 2 = Entre 35 et 50 ans ;

3 = Supérieur à 50 ans). On voit qu'il n'y a presque pas de différence entre celles qui ont un âge entre 35 et 50 ans et celles qui ont un âge supérieur à 50 ans d'où la valeur de Fst négative de - 0,02. Au contraire, ces deux classes d'âge sont génétiquement très différentes de celles qui ont un âge inférieur à 35 ans, traduit par les valeurs de Fst de 0,06 (entre 1 et 2), et de 0,09 (entre 1 et 3) ; mais la grande différence se trouve entre celles qui sont âgées ans de 50 ans et plus et celles qui ont un âge inférieur à 35 ans, d'où la plus grande valeur de Fst (0,09). Cependant on note une non significativité des résultats car ayant des P-values supérieur à 0,05 ou 5% (seuil de significativité) ; dû peut être à la faible taille de la population.

Tableau VI : Structure génétique selon l'âge

	1	2	3	Moyenne
Fst	1	0		
	2	0,06949	0	0,0258
	3	0,09503	-0,02797	0
P-value Fst	1	-		
	2	0,10811	-	0,21701
	3	0,17117	0,77477	-
% Amova		2,58		

1 = Inférieur à 35 ans 2 = Entre 35 et 50 ans 3 = Supérieur à 50 ans

Comme pour les Fst, les distances génétiques étudiées selon l'âge (Tableau VII), nous montre que la distance génétique entre les femmes âgées de moins de 35 ans et celles âgées de plus de 50 ans, est la plus élevée (0,165). Entre ces dernières et celles qui ont un âge entre 35 et 50 ans, on trouve la distance la plus faible (0,134). Pour ce qui est des distances génétiques à l'intérieur des groupes, la plus grande distance génétique se trouve entre les femmes âgées de plus de 50 ans (0,154) ; ensuite vient la distance génétique entre les femmes ayant un âge inférieur à 35 ans (0,129) et en dernier la distance génétique entre celles qui ont entre 35 et 50 ans est la plus faible (0,122).

Tableau VII : Distances génétiques selon l'âge

Groupes	Distance génétique intragroupes	inter-groupes		
		1	2	3
Inférieur à 35 ans (1)	0,129			
Entre 35 et 50 ans (2)	0,122	0,136		
Supérieur à 50 ans (3)	0,154	0,165	0,134	

III.1.3.3. Structure génétique des tissus cancéreux selon le nombre de gestation

Le tableau VIII montre l'impact du nombre de gestation sur la structuration génétique des tissus cancéreux. En observant le pourcentage d'AMOVA, on constate que 1,21% de la structuration génétique est dû à la différence de nombre de gestation. Aussi faible que le Fst global soit (0,012), il y a une différenciation génétique entre nos sous populations 1, 2 et 3 (1 = Pas de gestation ; 2 = moins de 5 gestations ; 3 = 5 gestations et plus). Avec un Fst négatif

(-0,03), on voit qu'il y a une faible différence entre les femmes qui n'ont jamais eu de grossesse et celles qui en ont eu 5 et plus. Avec un Fst de 0,007, qui est très faible on peut dire qu'il y a peu de différences entre les femmes ayant moins de 5 gestation et celles ayant 5 gestation et plus. La plus grande valeur de Fst (0,102) est trouvée entre celles qui n'ont pas eu de grossesse et celles qui ont moins de 5 gestations. Cependant, nos valeurs de P-value ne sont pas significatives pour confirmer ou non les résultats.

Tableau VIII : Structure génétique selon le nombre de gestation

	1	2	3	Moyenne
Fst	1	0		
	2	0,10201	0	0,012
	3	-0,03002	0,00791	0
P-value Fst	1	-		
	2	0,07207	-	0,30792
	3	0,67568	0,31532	-
% Amova	1,21			

Les distances génétiques étudiées selon le nombre de gestation (Tableau IX), nous montre que la distance génétique entre les femmes ayant moins de 5 gestations et celles ayant un nombre de gestation supérieur ou égal à 5, est la plus élevée (0,141). Entre ces dernières et celles qui n'ont pas eu de grossesse, on trouve la distance la plus faible (0,126). Pour ce qui est des distances génétiques à l'intérieur des groupes, la plus grande distance génétique se trouve entre les femmes ayant un nombre de gestation supérieur ou égal à 5 (0,151) ; ensuite vient la distance génétique entre les femmes ayant moins de 5 gestations (0,122) et en dernier la distance génétique entre celles qui n'ont pas eu de grossesse est la plus faible (0,109).

Tableau IX : Distances génétiques selon le nombre de gestation

Groupes	Distance génétique intrag roupes	inter-groupes		
		1	2	3
Pas de gestation (1)	0,109			
moins de 5 gestations (2)	0,122	0,134		
5 gestations et plus (3)	0,151	0,126	0,141	

III.1.4. Evolution démographique

III.1.4.1.a. Tests démo-génétiques avec le facteur âge

Le tableau X nous indique que pour les tests de neutralité avec le facteur âge, le D de Tajima et le Fs de Fu sont négatifs et non significatifs, avec les valeurs respectives de -0,25169 et de -1,75921.

Tableau X : Test de neutralité avec le facteur âge

Test statistiques	Tissus cancéreux	P-value
D de Tajima	-0,25169	0,39800
Fs de Fu	-1,75921	0,20133

III.1.4.1.b. Tests démo-génétiques avec le facteur nombre de gestation

Le tableau XI nous indique que pour les tests de neutralité avec le facteur nombre de gestation, le D de Tajima et le Fs de Fu sont négatifs et non significatifs, avec les valeurs respectives de -0,22925 et de -1,69536.

Tableau XI : Test de neutralité avec le facteur nombre de gestation

Test statistiques	Tissus cancéreux	P-value
D de Tajima	-0,22925	0,43233
Fs de Fu	-1,69536	0,14967

III.1.4.2. Analyse de Mismatch distribution

La représentation graphique de la distribution des distances génétiques existant entre les tissus cancéreux des patientes pris deux à deux ou Mismatch distribution (fig. 6), déduit d'une hypothèse de population en croissance – déclin, montre une distribution multimodale. Le graphe est conforté par les indices SSD et Rag, qui ne sont pas significatifs, indiquant qu'il n'existe pas d'écart entre les valeurs observées et celles espérées.

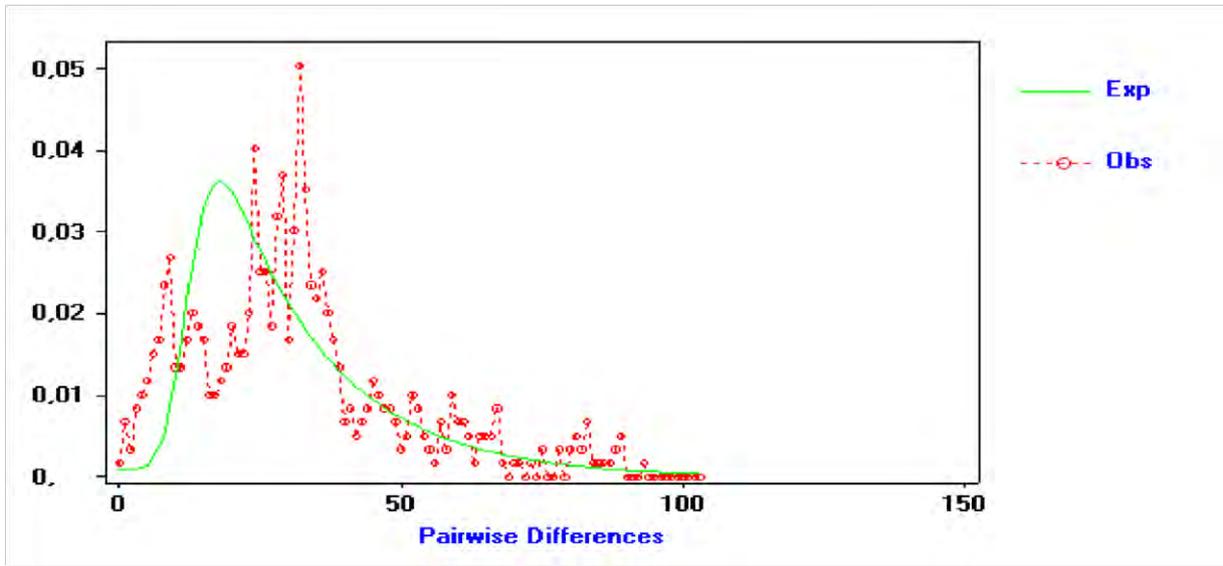


Figure 6 : Graphe de Mismatch distribution

	Stat	P-value
SSD	0,02356	0,83333
Rag	0,04051	0,88667

III.2.DISCUSSION

L'objectif de cette étude étant de déterminer l'implication des altérations génétiques du Cytochrome b et les facteurs à risque dans l'évolution des cancers 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. Pour atteindre notre objectif général, nous nous sommes fixés un certain nombre d'objectifs spécifiques parmi lesquels l'évaluation de la variabilité génétique du *Cyt b* entre tissus sains et cancéreux, afin de déterminer si le *Cyt b* présente des mutations sur la population étudiée. De ce fait, nous avons entrepris l'analyse du *Cyt b* chez 35 patientes sénégalaises présentant un cancer du sein, comparée à un groupe de 22 individus sains servant de témoins.

L'analyse des paramètres basique nous a révélé l'instabilité génétique du cytochrome b chez les sujets cancéreux, en raison d'un certain nombre de mutations trouvés. Nos observations confirment les résultats de Mbaye *et al.* (2012) portant sur la pénétrance du *Cyt b* dans le cancer du sein chez les femmes sénégalaises. On note aussi une grande variabilité du *Cyt b* au sein même des tissus cancéreux, pouvant peut-être s'expliquer par les différents stades de cancer du sein. L'analyse de la différenciation génétique nous montre également la grande variabilité au sein des tissus cancéreux avec la distance génétique élevée chez eux (0,136) et faible chez les tissus sains (0,001). Les valeurs élevées de distance génétique et du Fst inter-tissulaire mettent aussi en exergue la variabilité du *cyt b*.

Afin d'évaluer la pertinence fonctionnelle de ces mutations, nous avons examiné des critères indirects tels que le type de substitution et la conservation des acides aminés mutés dans la population de cellules cancéreuses.

Avec les tissus cancéreux, nous avons déterminé les types de substitutions qui montrent la supériorité des substitutions non-synonymes, favorisant un changement d'acides aminés. En plus de cela, le ratio k_{ns}/k_s supérieur à 1 nous permet d'affirmer qu'il y a une sélection positive avec changement d'acides aminés, confirmé par la significativité du Z-test ($prob = 0,022$). La distribution des fréquences des acides aminés entre les deux groupes de tissus (sains et cancéreux), montre quelques variations ; marqué surtout par la présence d'acides aminés (Asp, His, Pro, Thr) qui était absent chez les tissus sains. Ceci confirme l'hypothèse d'une sélection positive. Ces observations laissent penser que ces mutations sont d'une importance fonctionnelle dans l'évolution

des cancers du sein. Cependant, des études biochimiques et moléculaires extensives seraient nécessaires afin de déterminer leur effet dans le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses.

En étudiant la structure génétique des tissus cancéreux selon l'âge, la non significativité du P-value nous indique que l'âge n'aurait pas d'impact sur la structuration génétique des femmes ayant le cancer ; ce qui n'est pas en adéquation avec d'autres études. Cependant on a pu voir que c'est qu'à partir de 50 ans que le cancer est plus susceptible de survenir ; on peut aussi voir cela chez de jeunes femmes ayant 35 et 50 ans. De même en étudiant la structure génétique des tissus cancéreux selon le nombre de gestation, la non significativité du P-value nous indique que ce facteur n'aurait pas d'impact sur la structuration génétique des femmes ayant le cancer.

L'étude du test de neutralité nous indique des valeurs de D de Tajima et de F_s de F_u négatives et non significatives, ce qui traduit une population en équilibre démographique. Ce qui est confirmé par la distribution multimodale de la courbe de Mismatch, signifiant que c'est une population stable. Cependant les P-values non significatifs de SSD et de Raggedness nous indiquent que la population est expansion démographique. On peut donc émettre l'hypothèse que la population stable au départ serait en début d'expansion. En plus les valeurs de H_d et P_i nous montre un signal d'une croissance démographique rapide.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'étude génétique du cancer du sein fut longtemps mener sur le génome nucléaire. Ainsi l'étude de la variabilité du cytochrome b qui est un gène mitochondriale nous a permis de mieux comprendre l'histoire des cellules cancéreuses, la distribution de la variabilité génétique entre tissus sains et cancéreuses , et de conclure sur l'implication du *Cyt b* dans la survenue du cancer. En effet dans le cadre de notre étude, les mutations observées ont entraîné des changements d'acides aminés. Ces affirmations peuvent être étayées par le fait que ces mutations du *Cyt b* sont soumises à une sélection positive. De ces résultats, il convient d'accepter l'hypothèse de cette étude selon laquelle, les altérations génétiques du Cytochrome b seraient impliquées dans l'évolution des tumeurs bénignes du sein. De même les facteurs étudiés pourraient influencer la survenue de ce cancer.

Cependant, une étude ultérieure avec une population de taille plus grande pourrait nous permettre d'avoir une significativité des résultats. De plus l'étude d'autres facteurs à risques pourrait se faire ultérieurement.

Bibliographie :

1. Dia, C.M, 2016, INSTABILITE DES TUMEURS BENIGNES DU SEIN CHEZ LES FEMMES SENEGALAISES : IMPACT DE LA VARIABILITE NUCLEOTIQUE DU CYTOCHROME B ET DE LA D-LOOP, Sénégal Mémoire Université Cheikh Anta DIOP 39p.
2. Doupa et al, 2015, Implication of the Cytochrome b Mutations in the Evolution of Breast Benign Tumors Among Senegalese Women, International Journal of Genetics and Genomics.
3. **Keneme, B. 2016.** Implication du gène med12 dans les fibromes utérins et les adénofibromes du sein chez les femmes sénégalaises. Mémoire de Diplôme de Master II en Biologie Animale, Génétique des populations. Dakar : UCAD/FST, 47 pages.
4. **Mbaye, F. 2011.** Pénétrance des mutations du Cytochrome B dans l'occurrence du cancer du sein au Sénégal. Mémoire de Diplôme de Master II en Biologie Animale, Génétique des populations. Dakar : UCAD/FST, 57 pages.
5. **Mbaye, F., Dem, A., Fall, M., et Mbacké, S. 2012.** Implication des mutations nucléotidiques et protéiniques du cytochrome b dans l'apparition du cancer du sein au Sénégal. *Journal international de biologie appliquée et de la technologie pharmaceutique.*
6. **Sultana GNN, Shahinuzzaman ADA, Begum R, Jahan I et Rahman MM. 2014.** Variations génétiques du Cytochrome B mitochondrial et cancer du sein. *Austin publishing group.* 1 (2): 5.
7. **Yadav, N. et Chandra, D. 2013.** Mutations de l'ADN mitochondrial et la tumorigenèse mammaire. *National institut of health.*
8. Zhu. W et al, 2004, Mitochondrial DNA Mutations in Breast Cancer Tissue and in Matched Nipple Aspirate Fluid^{1,2}, Carcinogenesis Advance Access.

Webographie :

1. **Espié, M. et Sasco, A. 1998.** Risque génétique et épidémiologie du cancer du sein. Consulté le 24 janvier 2018. Disponible sur http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/201/expcol_1998_risques_02ch.pdf?sequence
2. OMS in : le cancer aide-mémoire N°297. Février 2018. Consulté le 24 janvier 2018 .disponible sur <http://origin.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/>
3. (<http://www.soscancerdusein.org/sos-cancer-du-sein-cancer-du-sein-32.html>) Consulté le 24 janvier 2018
4. (<http://athina-alice.over-blog.com/2015/02/i-l-anatomie-et-le-fonctionnement-dusein.html>) Consulté le 25 janvier 2018
5. (https://www.researchgate.net/figure/Kinetic-parameters-of-the-tyrosylation-reactionof-human-mitochondrial-tRNA-Tyr_tbl2_30518642) Consulté le 27 janvier 2018