

Codon 72 du gène p53 dans le cancer du sein familial au Sénégal

REMERCIEMENTS

A mes parents :

Je ne saurais traduire par ces mots l'attachement et la gratitude que je porte en vous. Je vous admire pour votre piété, votre sens de l'honnêteté et votre goût pour le travail bien fait. Que Dieu vous garde encore longtemps parmi nous.

A mes frère et sœurs : J'ai toujours apprécié l'estime que vous me portez. L'atmosphère familiale a été toujours sincère et très agréable. Que Dieu vous comble de ses biens faits ;

A tous mes amis : Merci pour votre soutien et votre grande disponibilité.

Aux personnels de l'unité d'immunogénétique de l'IPD et à tous mes camarades étudiants. Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi.

Au Professeur Alioune Dieye pour l'accueil et les conseils

A tous mes maîtres et juges :

Professeur Mbacké Sembène, Dr Malick Fall, Dr Gora Diop, Dr Babacar Mbengue,

Dr Rokhaya Ndiaye Diallo .Merci pour tous les efforts fournis pour que ce travail soit bien fait.

Au professeur Mbacké Sembène

Nous avons constaté tout le bien qu'on disait de vous. A vos qualités pédagogiques s'ajoutent la rigueur, la courtoisie, la disponibilité et le charme qui suscitent l'admiration et le respect. L'honneur et la joie que vous nous faites en acceptant de présider ce jury sont immenses. Permettez nous de vous témoigner toute notre gratitude et notre affection.

Au Dr Rokhaya Ndiaye Diallo

Vos qualités de cœur n'ont pas d'égal. Nous ne saurions trouver les mots adéquats pour vous exprimer nos profonds sentiments. Votre disponibilité exemplaire, votre rigueur dans le travail et votre accessibilité nous ont beaucoup séduits. Vos enseignements très riches d'expérience, fait de rigueur et de clarté, votre modestie et votre simplicité font de vous une personne hautement appréciée, qui a gagné la sympathie de tous vos collaborateurs. Nous gardons de vous l'image d'une femme exemplaire.

Liste des figures et tableaux

Figure 1: Structure du gène et de la protéine p53

Figure 2: Protéine p53 dans la régulation du cycle cellulaire

Figure 3: Régulation des gènes suppresseurs de tumeur : exemple de p53

Figure 4: Mutations du gène p53

Figure 5: Séquence du fragment d'ADN amplifié par PCR

Figure 6 : Arbre généalogique de la famille AS

Figure 7 : Arbre généalogique de la famille AB

Figure 8 : Arbre généalogique de la famille FY

Figure 9 : Photo de la PCR du gène p53 visualisé après électrophorèse sur gel d'agarose à 1%.

Figure 10 : Photo de digestion des produits PCR avec l'enzyme BstUI

Figure 11 : Ségrégation de l'allèle Arg dans la famille AB

Figure 12 : Ségrégation de l'allèle Arg dans la famille FY

Tableau I : Classification histologique des cancers du sein selon l'OMS

Liste des abréviations

ADN Acide désoxyribonucléique

ASK1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase1)

CDKN1A: Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A

Daxx: (Death-domain associated protein)

HALD: Hôpital Aristide le Dantec

JNK : (Jun N-terminal)

MDM2: Mouse Double Minute 2

pb : Paire de base

PCR: Polymerase chain reaction

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

SNPs: single-nucleotide polymorphisms

Table Des Matières

Introduction.....	1
Chapitre I. Synthèse Bibliographique	2
I.1.Le cancer du sein.....	2
I.1.1. Aspects macroscopiques des tumeurs.....	2
I.1.2. Aspects cytopathologiques et classification des carcinomes.....	2
I.1.2.1. Classification histologique.....	3
I.1.2.2. Classification clinique	4
I.1.2.3.Classification SBR ou histopronostique.....	5
I.1.2.4.Classification prédictive.....	5
I.1.3. Diagnostic et traitement.....	6
I.1.3.1.Diagnostic.....	6
I.1.3.2. Le Traitement.....	6
I.1.4. Epidémiologie du cancer du sein.....	7
I.1.4.1. Epidémiologie descriptive.....	7
I.1.4.2.Les Facteurs de risque.....	7
I.2. Gène p53.....	8
I.2.1. Généralités sur le gène p53.....	8
I.2.2. Structure du gène et de la protéine p53	8
I.2.3. Fonction de la protéine p53.....	9
I.2.4. Mutations du gène p53.....	10
Chapitre II. Population et Méthodes.....	13
II.1. Population d'étude.....	13
II.2. Méthodes.....	13
II.2.1-Extraction de l'ADN génomique.....	13
II.2.2-Génotypage du polymorphisme du codon 72 du gène p53.....	14
Chapitre III. Résultats et Discussion.....	15
III.1. Résultats.....	15
III.1.1.Caractéristiques de la population d'étude.....	15
III.1.2. Codon 72 du gène p53 dans les familles étudiées.....	21
III.2.Discussion.....	26
CONCLUSION.....	28
Références bibliographiques.....	29

Introduction

L'impact des cancers à l'échelle mondiale devient de moins en moins soutenable, tant le nombre de malades et de décès ont augmenté au cours des dernières années. Dans les pays développés, le cancer du sein est le premier cancer de la femme tandis qu'il occupe le second rang dans les pays en voie de développement. Il représente donc un problème de santé publique dans le monde. En 2010, selon l'Organisation Mondiale de la Santé, le nombre de nouveaux cas serait estimé à 97.743 en Afrique avec une mortalité estimée à 52.855 (Adesunkanmi et *al.*, 2006; IARC, 2011).

Au Sénégal, à l'image des pays en voie de développement, la population subit les affres de ce cancer en termes d'incidence et de mortalité. Selon l'agence internationale de recherche sur le cancer, on dénombre plus de 853 cas de cancer du sein par an avec un taux de mortalité avoisinant les 50%. La plupart des femmes sont dépistées tardivement à un stade très avancé. De plus l'épidémie prend une allure particulière, avec un diagnostic à un âge de plus en plus jeune et sous une forme très agressive.

La majorité des cancers du sein sont sporadiques cependant 5 à 10% sont héréditaires et sont dus à une prédisposition génétique (Beghin, 2007). Le mécanisme de la cancérogénèse dans les formes héréditaires implique le plus souvent des gènes suppresseurs de tumeur parmi lesquels le gène p53. L'identification de ces gènes dont certaines mutations confèrent un risque élevé de développer un cancer du sein a permis une meilleure compréhension des formes familiales de cancer du sein. Plusieurs mutations du gène p53 ont été associées au cancer du sein sur différentes populations (Zhou et *al.*, 2007). Ces mutations ont été décrites sur les populations européennes, américaine, asiatique, mais rarement chez les populations africaines (Hou et *al.*, 2013).

L'identification de mutations prédisposant au cancer du sein chez une patiente ayant une histoire familiale de cancer devrait orienter vers une consultation d'oncogénétique pour une meilleure prise en charge mais surtout pour prévenir la survenue de ce cancer chez les autres membres de la famille porteurs de la mutation. Cette consultation est en routine dans les pays développés mais n'existe pratiquement pas en Afrique.

L'objectif de ce travail est d'étudier le rôle du codon 72 du gène p53 dans la prédisposition aux formes familiales de cancer du sein au Sénégal. La présente étude réalisée au laboratoire de Cytologie de l'Hôpital Aristide Le Dantec en collaboration avec l'Institut Joliot Curie de l'Hôpital Aristide Le Dantec et l'Unité d'Immunogénétique de l'Institut Pasteur de Dakar a consisté en premier lieu au recrutement des patientes et des membres de leur famille et en second lieu l'étude du codon 72 du gène p53 dans ces familles recrutées.

I. Synthèse Bibliographique

I.1.Le cancer du sein

Le cancer du sein est défini comme une croissance relativement autonome de tissu néoformé au niveau de la glande mammaire. Maladie génétique de la cellule, le cancer du sein est dû à des mutations de gènes qui surviennent pour la plus part au cours du processus tumoral.

I.1.1. Aspects macroscopiques des tumeurs

L'aspect des tranches mammaires prélevées est variable selon l'âge de la tumeur. La tumeur récente, est de petite taille, souvent enfouie dans un foyer dysplasique ou située sur un de ses bords. Lorsque la tumeur est plus grande, son examen à l'œil nu révèle jusqu'à un certain point sa tendance à l'invasion.

I.1.2. Aspects cytopathologiques et classification des carcinomes

L'examen anatomopathologique permet d'établir le diagnostic de malignité sur les prélèvements de cytologie, des biopsies et sur les pièces opératoires. Cet examen permet de faire une classification des tumeurs du sein. Cette classification est importante pour établir le pronostic et guider le traitement

La classification des cancers du sein a été réalisée par l'Organisation Mondiale de la Santé(OMS) en 2003. Il existe plusieurs classifications, une classification histologique, une classification clinique (TNM), une classification histopronostique et une classification prédictive

I.1.2.1. Classification histologique

Cette classification est présentée sur le tableau I.

Tableau I : Classification histologique des cancers du sein selon l'OMS (2003)(Tavassoéli F.A, 2003)

Tumeurs épithéliales
Tumeurs épithéliales non infiltrantes
Carcinome canalaire in situ (CCIS)
Carcinome lobulaire in situ (CLIS)
Tumeurs épithéliales infiltrantes
Carcinome infiltrant de type non spécifique (canalaire TNS)
• Carcinome de type mixte
• Carcinome pléomorphe
• Carcinome avec cellules géantes ostéoclastiques
• Carcinome avec aspects choriocarcinomateux
• Carcinome avec aspects mélanocytaires
Carcinome lobulaire infiltrant
Carcinome tubuleux
Carcinome cribriforme infiltrant
Carcinome médullaire
Carcinome produisant de la mucine
• Carcinome mucineux
• Cystadénocarcinome et carcinome à cellules cylindriques sécrétantes
• Carcinome à cellules en bague à chaton
Tumeurs neuroendocrines du sein
• Carcinome neuroendocrine de type solide
• Carcinoïde atypique
• Carcinome à petites cellules
• Carcinome neuroendocrine à grandes cellules
Carcinome papillaire infiltrant
Carcinome micropapillaire infiltrant
Carcinome apocrine
Carcinome métaplasique
• Carcinome métaplasique de type épithélial pur
◦ Carcinome épidermoïde
◦ Adénocarcinome avec métaplasie à cellules fusiformes
◦ Carcinome adénosquameux
◦ Carcinome mucoépidermoïde
• Carcinome métaplasique mixte à composante épithéliale et conjonctive
Carcinome à cellules riches en lipides
Carcinome sécrétant
Carcinome oncocytique
Carcinome adénoïde kystique
Carcinome à cellules acineuses
Carcinome à cellules claires (riches en glycogène)
Carcinome sébacé
Carcinome inflammatoire
Lésions myoépithéliales
Tumeurs mésenchymateuses
Tumeurs fibroépithéliales
Tumeurs du mamelon
Lymphomes malins
Tumeurs métastatiques

I.1.2.2. Classification clinique des cancers du sein

Cette classification est basée sur la taille de la tumeur (T), la présence de nodules (N) et enfin la présence de métastases (M). Actuellement c'est la classification TNM 6^e édition de 2002 qui est utilisée (Wittekind, 2002).

- Selon la taille de la tumeur primitive (T) on distingue:
 - **Tx**: détermination de la tumeur primitive impossible
 - **T0**: pas de signe de tumeur primitive (non palpable)
 - **Tis**: carcinome in situ: carcinome intra canalaire, ou carcinome intra lobulaire, ou maladie de Paget sans tumeur décelable
 - **T1**: tumeur ≤ 2 cm dans sa plus grande dimension
 - **T2**: tumeur > 2 cm et ≤ 5 cm dans sa plus grande dimension
 - **T3**: tumeur > 5 cm dans sa plus grande dimension
 - **T4**: tumeur de toute taille avec extension directe de la paroi thoracique (a) ou à la peau (b)
- Selon la présence d'adénopathies régionales détectées à l'examen clinique ou radiologique on distingue 5 stades:
 - **Nx**: appréciation impossible de l'atteinte ganglionnaire (du fait, par exemple d'une exérèse antérieure)
 - **N0**: absence de signe d'envahissement ganglionnaire régional
 - **N1**: ganglions axillaires homolatéraux mobiles
 - **N2**: ganglions axillaires homolatéraux fixés entre eux ou à d'autres structures, ou présence clinique d'adénopathies cliniques axillaires.
 - **N3**: envahissement d'au moins 10 ganglions axillaires ou envahissement des ganglions sous claviculaires ou envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux avec envahissement des ganglions sus- claviculaires homolatéraux.
- Selon la présence de métastases (M) on distingue 3 stades
 - **Mx**: renseignements insuffisants pour classer les métastases à distance
 - **M0**: absence de métastases à distance
 - **M1**: Présence de métastase à distance

I.1.2.3.Classification SBR ou histopronostique

L'importance du grade histopronostique en tant que facteur pronostique dans les cancers du sein n'est plus à démontrer. Le système le plus utilisé est le grade SBR (Scarff-Bloom-Richardson). Plus le grade SBR est élevé, plus le pronostic est péjoratif. Cette classification prend en compte trois critères histologiques, cotés de 1 à 3. Ces critères sont :

- L'architecture
- Les atypies cytonucléaires :
- Le nombre de mitoses

L'addition des trois critères permet de réaliser le grade : Ainsi on distingue : Grade I, Grade II, Grade III.

I.1.2.4.Classification prédictive

La connaissance de l'expression des récepteurs hormonaux et de l'oncoprotéine Her2 ou cerb-b2 au niveau de la tumeur est importante. L'évolution de ces paramètres est fortement corrélée au pronostic et représente un critère essentiel pour la détermination du traitement approprié.

-Évaluation des récepteurs hormonaux La connaissance du statut des récepteurs hormonaux (RH, RE) est indispensable pour toute tumeur invasive (valeur prédictive de réponse au traitement). L'évaluation par immunohistochimie est maintenant la technique standard et remplace le dosage biochimique.

-Evaluation de l'expression de HER2

Le statut du récepteur au facteur de croissance épidermique humain (HER2) permet avec le statut hormonal de déterminer différentes classes de carcinome mammaire avec un impact sur la prise en charge clinique. Her2 est un protooncogène dont le niveau d'expression varie en fonction des tumeurs.

L'évaluation de ces paramètres permet de distinguer trois classes prédictives:

- Le sous-type luminal A est caractérisé par une expression des récepteurs hormonaux (œstrogènes (RE+) et/ou progestérone (RP+) et l'absence de surexpression de l'oncoprotéine Her2.
- Le sous-type luminal B a la même caractéristique en ce qui concerne les récepteurs hormonaux (RE+ et/ou RP+) mais il y a le plus souvent, une surexpression de l'oncoprotéine Her2.
- D'autres formes de cancers n'expriment pas les récepteurs hormonaux mais sont caractérisées par la présence ou l'absence d'une surexpression de Her2.: soit (RE-, RP-, Her2 +) ou (RE-, RP-, Her2-) ou triples négatifs.

I.1.3. Diagnostic et traitement

I.1.3.1.Diagnostic

Le diagnostic du cancer du sein repose essentiellement sur les examens cliniques, radiologiques et anatomopathologiques. La mammographie est la seule technique dont l'efficacité est prouvée pour le dépistage et dont le rapport coût/efficacité est acceptable. Elle permet de dépister le cancer infraclinique. Sa sensibilité est comprise entre 68 et 88% maximale dans les seins graisseux mais diminuant avec l'augmentation de la densité. L'examen anatomopathologique est demandé après un diagnostic clinique suspectant une tumeur. Il sert à confirmer le diagnostic. On fait une biopsie ou un prélèvement sur pièce opératoire pour faire un examen histologique.

I.1.3.2. Le Traitement

Le traitement du cancer repose essentiellement sur la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie et l'hormonothérapie.

La chirurgie est la base de la prise en charge thérapeutique de la grande majorité des patientes, elle reste faisable quel que soit l'âge. Elle est le plus souvent réalisée en première intention et peut être suivie d'une chimiothérapie et ou d'une radiothérapie. Elle a pour objet d'enlever les tissus atteints par les cellules cancéreuses. Elle est parfois précédée d'un traitement médical qui peut permettre de réduire la taille de la tumeur afin de faciliter l'intervention.

La chimiothérapie est un traitement médicamenteux qui vise à éliminer les cellules cancéreuses soit en les détruisant directement, soit en les empêchant de se multiplier. Il s'agit d'un traitement systémique qui agit dans l'ensemble du corps ce qui permet d'atteindre les cellules cancéreuses quelle que soit leur localisation dans le corps. Les médicaments sont administrés le plus souvent par perfusion ou parfois par voie orale sous forme de comprimé.

La radiothérapie utilise des rayonnements ionisants pour détruire les cellules cancéreuses en bloquant leur capacité à se multiplier tout en préservant le mieux possible les tissus sains et les organes avoisinants. Elle cible uniquement les parties du corps où les cellules sont susceptibles de se développer : il s'agit d'un traitement locorégional.

L'hormonothérapie est un traitement du cancer du sein qui s'oppose à l'action des hormones féminines (œstrogènes et progestérones) au niveau des cellules cancéreuses. Les hormones féminines stimulent la croissance de certaines tumeurs dites hormonosensibles ou hormono-dépendantes. C'est-à-dire porteuses de récepteurs hormonaux. En s'opposant à ces hormones l'hormonothérapie vise à empêcher leur action stimulante sur les cellules cancéreuses des cancers du sein hormonosensibles.

I.1.4. Épidémiologie du cancer du sein

I.1.4.1. Épidémiologie descriptive

Le cancer du sein est une épidémie mondiale avec 1,38 millions de cas diagnostiqués et 458.000 décès en 2008 (IRAC, 2011). Si l'épidémie semble être contrôlée dans les pays développés (avec 18.900 décès, ratio décès/cas de 0,27), ce n'est absolument pas le cas dans les pays en voies de développement (avec 269.000 décès, ratio décès/cas de 0,38). La mortalité liée au cancer du sein est donc moins importante dans les pays développés. Cependant il reste toujours le cancer le plus mortel de tous les cancers dans le monde.

En Afrique subsaharienne, particulièrement au Sénégal, le cancer du sein pose un sérieux problème de santé publique. Son incidence et son taux de mortalité restent très élevés avec 20,8% et 16,9% respectivement. De plus l'épidémie prend une allure particulière, et survient à un âge de plus en plus jeune et sous une forme très agressive. Cette forme agressive ainsi que la survenue à un âge précoce sont corrélés avec le cancer triple négatif qui est retrouvé surtout chez les femmes africaines.

Le Sénégal est une parfaite illustration de l'épidémie dans les pays en voies de développement. Selon l'agence internationale de recherche sur le cancer, on dénombre plus de 853 cas de cancer du sein par an au Sénégal dont, 472 finissent par mourir soit un peu plus de la moitié des répertoriés. Les causes sont souvent liées au fait qu'au Sénégal non seulement les malades arrivent tardivement dans les structures de référence mais le taux de prise en charge est très faible.

I.1.4.2. Les Facteurs de risque

Bien que les causes exactes de nombreux cas de cancer du sein restent inconnues, plusieurs facteurs de risques ont été identifiés: il s'agit donc d'une maladie multifactorielle. Parmi les facteurs connus associés au risque de cancer du sein on peut noter l'âge, le sexe, les facteurs liés à la vie reproductive, les facteurs environnementaux (tabac, alcool, radiations ionisantes) et les facteurs génétiques.

Concernant ces facteurs génétiques, les études épidémiologiques ont presque toujours retrouvé une association entre le cancer du sein et la présence d'une histoire familiale. Ces agrégations familiales peuvent être imputées à deux causes :

- Soit la fréquence élevée des cancers du sein dans la population générale
- Soit une mutation germinale d'un gène conférant un risque élevé de développer un cancer du sein se transmettant dans la famille (gène de prédisposition).

L'identification de certains gènes tels que les gènes BRCA1 et BRCA2 a permis une meilleure compréhension des formes familiales de cancer du sein. Les gènes BRCA1 et

BRCA2 sont les premiers à être cités dans la survenue du cancer du sein familial. Mais il existe d'autres gènes qui sont impliqués à des degrés moindres dans la survenue de ce cancer comme le gène p53. Tous ces gènes interviennent dans moins de 25% des cancers du sein dits héréditaires. Il existe donc d'autres facteurs dont l'identification serait d'une grande importance dans la recherche des causes du cancer du sein héréditaire.

I.2 Gène p53

I.2.1. Généralités sur le gène p53

Le gène p53 encore noté TP53 est impliqué dans un large spectre de pathologies tumorales survenant chez l'enfant et l'adulte jeune. Il joue un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité du génome en régulant l'arrêt de la prolifération cellulaire et l'apoptose des cellules en réponse à divers stress génotoxique endogènes ou exogènes. A l'état normal la protéine p53 est instable, inhibée et dégradée via MDM2 (Mouse Double Minute 2) son principal inhibiteur. En réponse aux dommages de l'ADN, le taux de protéine p53 s'élève rapidement, essentiellement par stabilisation de la protéine permettant la formation de tétramères, par le biais du domaine d'oligomérisation et l'activation de la fonction de «DNA-binding protein ». L'activation de p53 induit ou inhibe l'expression de plus de 150 gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose ou la réparation des cassures d'ADN. p53 est muté ou inactivé dans plus de 50% des tumeurs. Des modifications post-traductionnelles de p53 par phosphorylation de résidus sérine ou thréonine dans les régions N-terminal ou C-terminal de la protéine représentent un mécanisme important de régulation de son activité.

I.2.2. Structure du gène et de la protéine p53

Le gène p53 humain est localisé sur le bras court du chromosome 17 en 17p13.1. Il comporte 11 exons avec l'exon 1 non-codant (**Figure 1**).

La protéine p53 est une phosphoprotéine de 393 acides aminés de poids moléculaire 53KDa. On la retrouve en très petite quantité dans les cellules normales, mais en grande abondance dans les cellules tumorales. Les principaux domaines de la protéine p53 sont:

- Un domaine amino-terminal (résidu 1-42) nécessaire à l'interaction avec les composants de l'appareil transcriptionnel.
- Une région riche en résidus proline (63-97) intervenant dans l'apoptose.

-Un domaine central hydromorphe (102-292) dont la structure tridimensionnelle permet la fixation spécifique à l'ADN et au sein duquel on retrouve la majorité des mutations inactivatrices mise en cause dans divers cancers humains.

-Un domaine impliqué dans la tétramérisation (323-356).

-Un domaine carboxyterminal (363-393) intervenant dans la régulation négative de p53 (**figure1**).

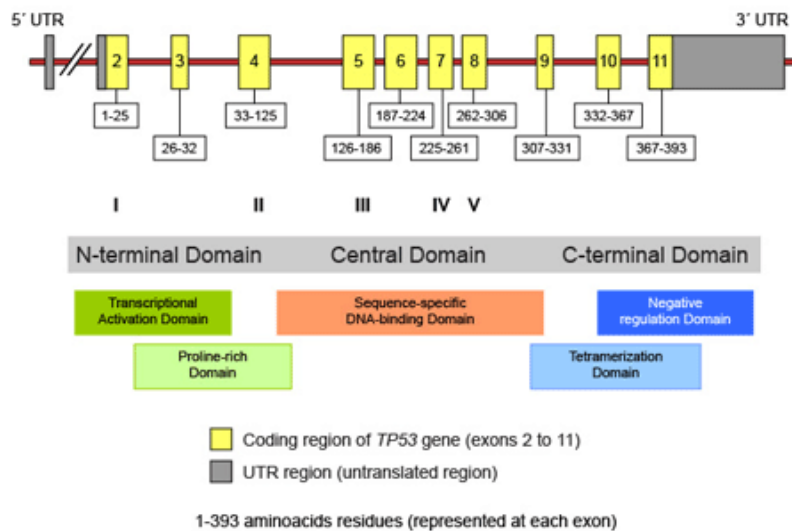


Figure : 1 Structure du gène et de la protéine p53

(<http://www.stjude.org/stjude/v/index.jsp?vgnextoid>)

I.2.3.Fonction de la protéine p53

La protéine p53 est un facteur de transcription qui régule l'expression d'une multitude de gènes permettant de moduler la réponse p53 (Vousden and Prives, 2009). Par sa capacité à arrêter la prolifération cellulaire en bloquant le cycle et en activant la mort apoptotique, p53 est un candidat évident comme gène suppresseur de tumeur d'autant qu'il est activé par différents stress cellulaires rencontrés lors de la progression tumorale (dommages à l'ADN, activation oncogénique, hypoxie...). Cependant, il apparaît que la réponse apoptotique n'est pas la seule arme de p53 pour cette activité suppresseur de tumeur. L'activation de la transcription de CDKN1A/p21 est extrêmement sensible à des élévations minimales de p53 et bloque le cycle cellulaire. Un arrêt prolongé du cycle est capable d'activer la sénescence cellulaire. Ce mécanisme serait un des moyens d'élimination des lésions précancéreuses (Vousden and Prives, 2009)(**figures 2 et 3**).

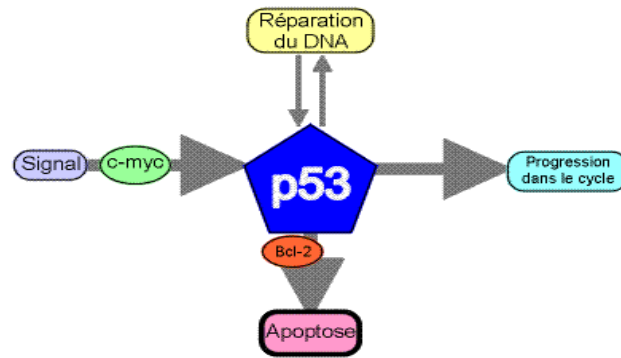


Figure 2: Protéine p53 dans la régulation du cycle cellulaire (<http://accres.ens-lyon.fr/biotic/gpe/dossiers/p53/html/mutasoma.htm>)

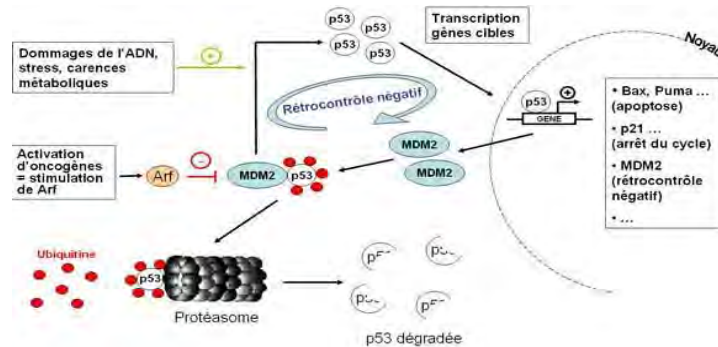


Figure3: Régulation des gènes suppresseurs de tumeur: exemple de p53
http://masterbiologie.fr/M1_web/index2.php?id=4&p=5

I-2.4 Mutations du gène p53

Le gène p53 est le gène suppresseur de tumeur le plus fréquemment muté dans les cancers humains. Plusieurs polymorphismes du gène p53 ont été décrits (Antoniou and Easton, 2006; Ford *et al.*, 1998). La plupart sont des SNPs touchant une seule base nucléotidique. La majorité de ces variants est localisée dans les introns et n'ont pas d'effet sur la protéine. Parmi les polymorphismes affectant les régions codantes plusieurs s'accompagnent d'un changement d'acide aminé. Il existe plusieurs hot spots sur les résidus proline en position 47 et 72 et sur les résidus Arginine en position 175, 248, 249, 273 qui contribuent à plus de 25% des mutations faux-sens identifiées dans les cancers humains (Hainaut and Hollstein, 2000) (**figure 4**).

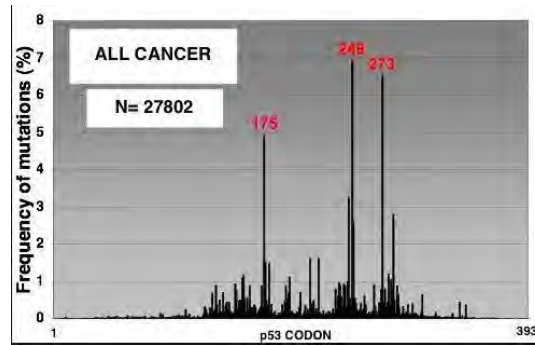


Figure4: Mutations du gène p53 (http://p53.free.fr/Database/p53_cancer/p53_breast.html)

En fonction de leur impact sur la structure et la fonction de p53 ces mutations peuvent être divisées en 2 catégories principales:

- Les mutations dites de contact (P47S, P72R, R248W et R273H) qui rompent directement la liaison de p53 sur les promoteurs cibles et entraînent des changements subtils de la conformation de la protéine.
- Les mutations dites structurales (R175H et R249S) qui altèrent franchement la conformation de la protéine ou dénaturent le domaine de liaison à l'ADN de sorte que les fonctions suppresseur de tumeur sont perdues (Joerger and Fersht, 2007).

En général, les mutants faux-sens gardent la possibilité de former des tétramères mais perdent tout ou une partie de la fonction de DNA-binding et d'activité transcriptionnelle (Kern *et al.*, 1992). C'est le cas du codon 72 qui est beaucoup plus fréquent avec des différences significatives de répartition en fonction des populations (Beckman *et al.*, 1994). Il s'accompagne d'un changement structural de la protéine, sur le résidu 72 une proline (P) est remplacée par une Arginine (R) (P72R). Il est situé dans une région riche en proline importante dans l'arrêt de la prolifération cellulaire et la fonction apoptotique de p53 (Sakamuro *et al.*, 1997; Walker and Levine, 1996). Le variant P72 aurait une capacité accrue d'arrêter le cycle cellulaire tandis que le variant R72 serait un inducteur de l'apoptose (Pim and Banks, 2004). Cependant l'activité du variant R72 pourrait varier en fonction du statut de p53: quand p53 est sauvage, R72 pourrait inhiber la croissance tumorale en augmentant la fonction apoptotique alors que lorsque p53 est muté il pourrait favoriser le développement tumoral par inactivation de p73. En effet p73 Interagit avec certaines formes mutantes de p53 et non avec la forme sauvage (Marin *et al.*, 2000). Chez les individus hétérozygotes, l'allèle R72 serait plutôt sujet aux mutations tandis que l'allèle P72 serait fréquemment perdu par délétion. Les formes mutantes ont également des fonctions oncogéniques. Plusieurs mécanismes d'action sont possibles:

- interférence de la protéine mutante avec la protéine normale résiduelle due à l'allèle non muté en formant des hétéro-dimères (effet inhibiteur dominant-négatif) et/ou gain de fonction conférant un avantage sélectif de prolifération aux cellules mutantes pour p53 (Hainaut and Hollstein, 2000; Vousden and Prives, 2009) ou conférant une résistance des cellules à l'apoptose p53-indépendante induite par les cytotoxiques (Li *et al.*, 1998).
- Certains mutants sont également capables d'interagir avec Daxx (Death-domain associated protein) inhibant l'activation Daxx-dépendante de ASK1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase1) et la Voie JNK, (Jun N-terminal Kinase) favorisant ainsi la prolifération (Ohiro *et al.*, 2003)

II. Population et Méthodes

II.1.Population d'étude

Il s'agit d'une étude pilote portant sur des patientes atteintes de cancer du sein et des membres de leur famille. Les patientes ont été identifiées et recrutées à l'Institut Curie de l'hôpital Aristide Le Dantec. Les membres de leur famille ont été contactés puis convoqués pour effectuer les prélèvements. Ils ont tous donné leur consentement éclairé. La déclaration de sujet et le consentement éclairé sont présentés en **annexe 1**.

Trois patientes atteintes de cancer du sein ayant chacune une histoire familiale, suivies à l'Institut Joliot Curie de l'Hôpital Le Dantec ont été recrutées. Une enquête familiale a été réalisée et des membres de chacune des familles ont également été inclus dans l'étude. Chez chaque individu recruté, un prélèvement de sang veineux a été réalisé sur tube EDTA pour l'extraction de l'ADN.

- La patiente AS : elle est décédée récemment. Son enquête familiale a révélée de nombreux cas de cancer du sein dans la famille. Il a aussi été noté des mariages entre proches parents faisant évoquer la notion de consanguinité. Dans cette famille 41 personnes ont été prélevées.
- La patiente AB : c'est une jumelle atteinte de cancer du sein bilatéral associé à un cancer de l'ovaire droit. Une enquête familiale a révélé la présence de plusieurs cas de cancer du sein et de l'utérus au sein de la famille. Sa sœur jumelle est décédée de cancer du sein. Dans cette famille des prélèvements de sang ont été effectués sur 9 personnes.
- La patiente FY : il s'agit d'une jeune fille de 25 ans atteinte d'une forme agressive de cancer du sein. L'enquête familiale a révélé la présence d'antécédents familiaux de cancer du sein. Pour cette famille 11 membres ont été recrutés.

II.2.Méthodes

II.2.1.Extraction de l'ADN génomique

L'ADN a été extrait à partir de sang total par la méthode phénol/chloroforme (Albarino and Romanowski, 1994) sur les 61 prélèvements de sang effectués. Après lyse des globules rouges par choc osmotique et des globules blancs par la protéinase K, l'ADN a été isolé en utilisant la différence de solubilité entre les acides nucléiques et les contaminants dans un mélange de phénol/chloroforme (Albarino and Romanowski, 1994). L'ADN est ensuite précipité avec de l'éthanol absolue puis dissout dans un milieu tamponné. Les réactifs utilisés ainsi que le mode opératoire sont présentés en **annexe 2**.

II.2.2. Génomotypage du polymorphisme du codon 72 du gène p53

Le génotypage du polymorphisme du codon 72 du gène p53 a été réalisé par la méthode PCR-RFLP (polymorphisme de longueur des fragments de restriction). Les amorces p53F (5'TCC CCC TTG CCG TCC CAA3') et p53R (5'CGT GCA AGT CAC AGA CTT3') encadrant le polymorphisme du codon 72 situé au niveau de l'exon 4 du gène p53 ont été choisies en utilisant la séquence de référence du gène p53 (NT_010718.16) et avec l'aide du logiciel Primer3 (Rozen and Skaletsky, 2000). La PCR a été réalisée en ajoutant à 50ng d'ADN, du MgCl₂ (1.5mM), 2.5µl de dNTPs à 10mM, 0.2U de Taq polymérase (Applied Biosystems, USA), le tampon PCR (1X), chacune des amorces à une concentration de 20nM et de l'eau stérile dans un volume final de 25µl. Le programme PCR utilisé a consisté en une dénaturation initiale à 94°C pendant 5 min, suivie de 35 cycles d'amplification comprenant chacun une dénaturation de l'ADN à 94°C pendant 30s, une hybridation des amorces à 57°C pendant 30s, et une élongation à 72°C pendant 30s ; une élongation finale a été ensuite réalisée à 72°C pendant 10mn. Le produit PCR a été visualisé sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium et d'un marqueur de poids moléculaire. Le génotypage du codon 72 du gène p53 a été réalisé par RFLP avec l'enzyme de restriction BstUI qui reconnaît une séquence d'ADN spécifique (5'CGCG3') et coupe la molécule d'ADN générant ainsi deux fragments. La digestion de 10µl du produit PCR a été réalisée par 2 unités de BstUI à 60°C pendant 3 heures. Le produit de digestion a été visualisé après migration sur gel d'agarose à 1%. en présence de bromure d'éthidium. La séquence du fragment amplifié est représentée sur la **figure 5**.

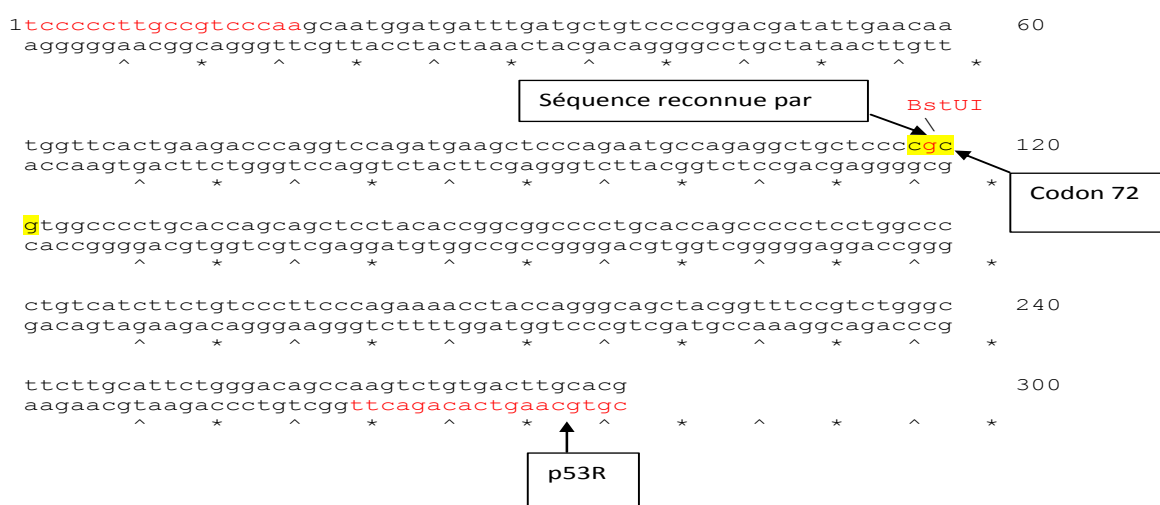


Figure 5: Séquence du fragment d'ADN amplifié par PCR

III. Résultats et Discussion

III.1. Résultats

III.1.1. Caractéristiques de la population d'étude

- La patiente AS

Il s'agit d'une femme de 53 ans atteinte de cancer du sein droit. Elle a comme histoire personnelle 11 gestes, 8 pares, 8 enfants vivants bien portant, date d'apparition des premières règles à 16 ans, l'âge de la première grossesse à 16 ans, le dernier jour des règles à Août 2010, la dernière grossesse à 38 ans. Elle prenait des contraceptions sous forme de pilules et d'injection.

Le cancer du sein a été diagnostiqué chez elle à l'âge de 53 ans. L'examen anatomopathologique a révélé un adénocarcinome canalaire moyennement différencié de grade clinique T4dN1M0 et pronostic SBRII. La tumeur n'est pas hormonodépendante avec absence de surexpression de l'oncoprotéine cerb-b2 (triple négatif).

Au cours de sa prise en charge thérapeutique à l'Institut Curie, elle a subi une chirurgie avec ablation du sein droit, 7 cures de chimiothérapie et quelques séances de radiothérapie. Elle est décédée récemment à la suite de métastases cérébrales.

Comme antécédents familiaux elle a :

- Une tante maternelle décédée de cancer du sein.
- Sa maman décédée de cancer du sein.
- Sa grande mère maternelle est également décédée de cancer du sein.

L'arbre généalogique de cette famille est représenté sur la **figure 6**.



Cancer du sein

I

II

III

IV

V

VI

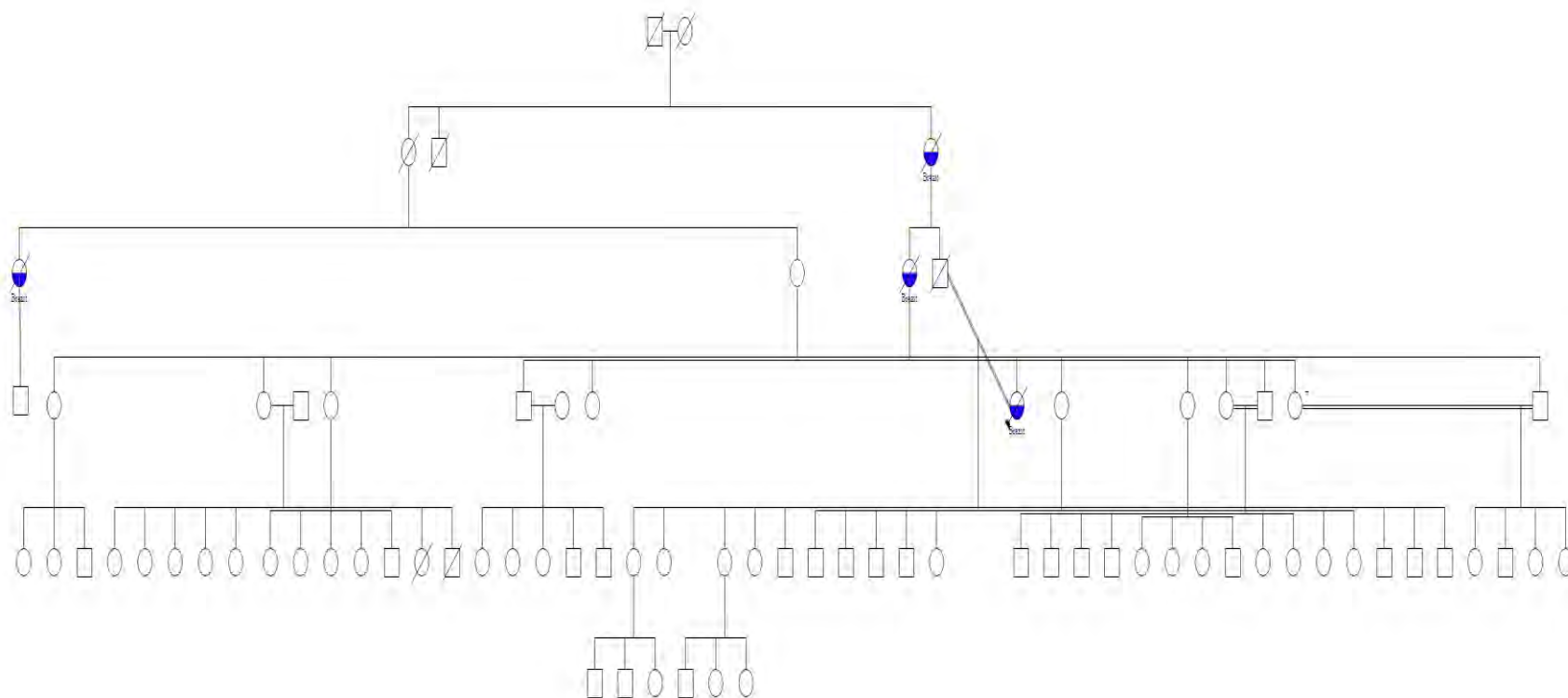


Figure 6. Arbre généalogique de la famille AS

- **La patiente AB**

Il s'agit d'une jumelle qui est en rémission d'un cancer du sein bilatéral associé à un cancer de l'ovaire droit. Elle a comme histoire personnelle 7 gestes 7 pares, 4 enfants vivants bien portant ; l'âge des premières règles à 15 ans, l'âge de la première grossesse à 17 ans. Elle n'a jamais été sous pilules contraceptives.

Le diagnostic a été établi à l'âge de 50 ans. L'examen anatomopathologique a montré un adénocarcinome canalaire moyennement différencié de grade histopronostique SBRII. La tumeur n'est pas hormonodépendante avec absence de surexpression de l'oncoprotéine cerb-b2 (triple négatif).

La prise en charge thérapeutique à l'Institut Curie a d'abord été chirurgicale avec une tumorectomie des seins, des ovaires et de l'utérus suivie de 7 cures de chimiothérapie.

La patiente a eu plusieurs antécédents de cancers dans sa famille.

- Sa sœur jumelle est décédée de cancer du sein.
- Sa maman est décédée de cancer de l'utérus.
- Sa tante maternelle est décédée de cancer du sein
- Une de ses cousines germaines est également décédée de cancer de l'utérus.

L'arbre généalogique de sa famille est représenté sur la **figure 7**.

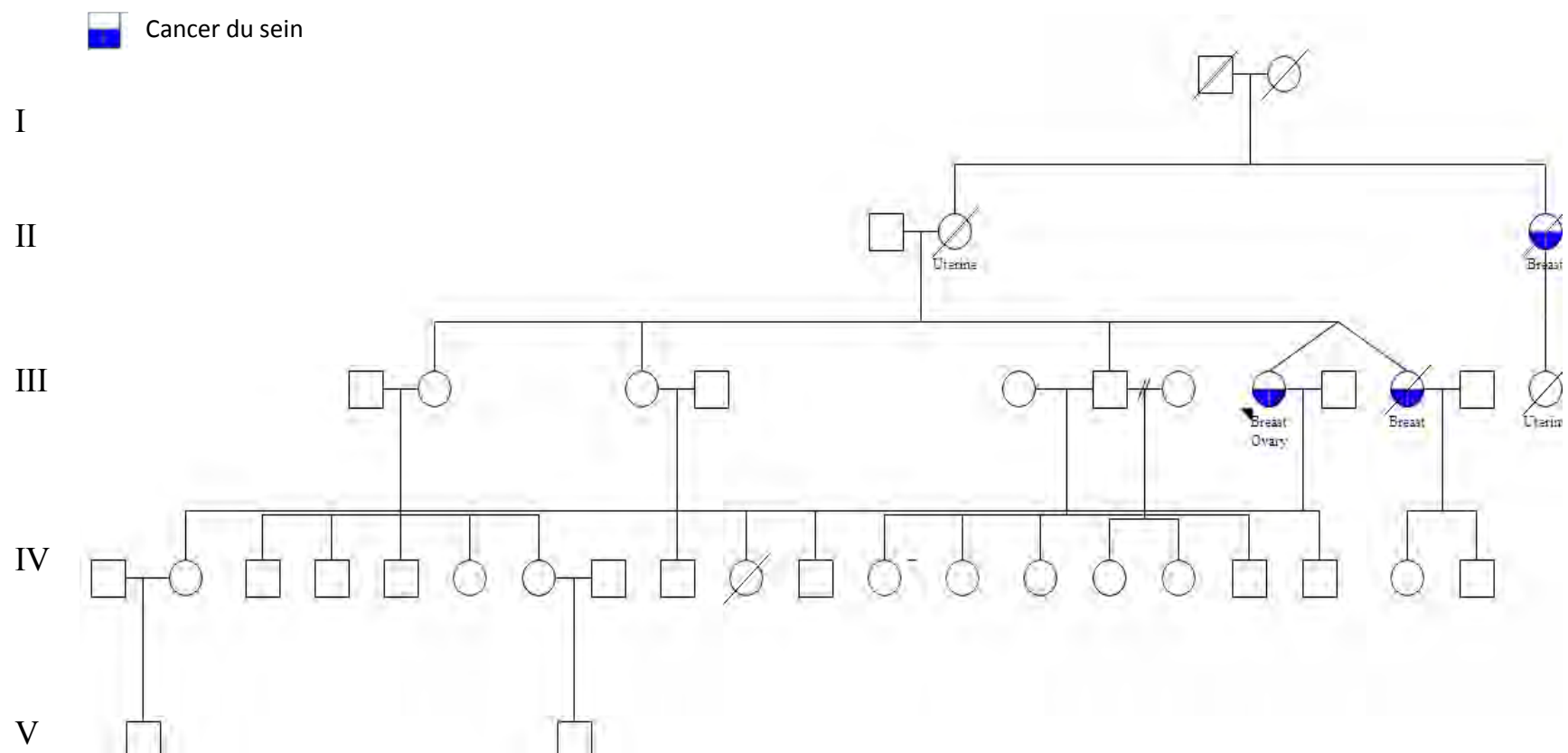


Figure 7. Arbre généalogique de la famille AB

- **La patiente FY**

Il s'agit d'une jeune fille de 25 ans qui a fait un cancer du sein droit. Elle a comme histoire personnelle 2 gestes 1 pare, 1 enfant vivant bien portant ; l'âge des premières règles à 13 ans, l'âge de la première grossesse à 19 ans. Elle prenait une contraception sous forme de pilules.

La tumeur est un carcinome canalaire infiltrant invasif moyennement différencié avec une composante intra-canalaire associée. Elle est cliniquement classée T4bN2M0 avec un grade histopronostique SBRI. Ceci montre l'aspect agressif de cette tumeur qui est également caractérisée par une surexpression des récepteurs œstrogéniques et progestéroniques et l'absence de surexpression de l'oncoprotéine Her2.

La patiente a subi 2 chirurgies comprenant une tumorectomie puis une exérèse ganglionnaire axillaire droite suivie de 6 cures de chimiothérapie. Elle est actuellement en rechute et doit refaire plusieurs cures de chimiothérapie.

L'enquête familiale a révélé que sa grand-mère maternelle est décédée de cancer du sein. L'arbre généalogique de la famille est présenté sur la **figure 8**.



II

III

IV

V

Figure 8. Arbre généalogique de la famille FY

III.1.2.Codon 72 du gène p53 dans les familles étudiées

- Génotypage du codon 72

Pour le génotypage du codon 72 du gène p53, l'exon 4 du gène p53 a été d'abord amplifié par PCR. Ceci a permis d'obtenir un fragment de 279pb correspondant à la taille attendue (**figure 9**).

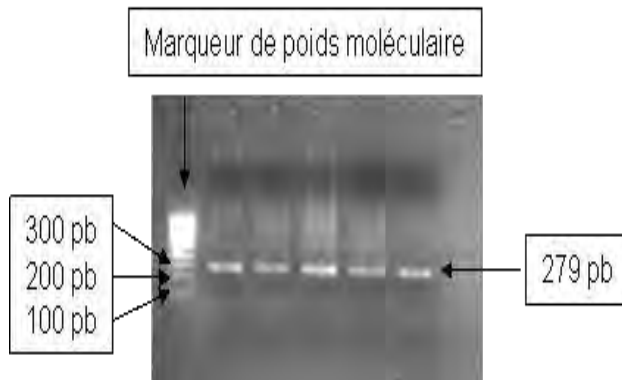


Figure 9 : Photo de la PCR du gène p53 visualisé après électrophorèse sur gel d'agarose à 1%.

Le codon 72 a ensuite été génotypé par une digestion des produits PCR avec l'enzyme de restriction BstUI. L'enzyme reconnaît une séquence d'ADN qui lui est spécifique (CGCG). Lorsqu'on fait agir BstUI sur le produit PCR obtenu, deux cas de figure sont observés :

- S'il y a présence d'une guanine (G) au niveau du codon 72 (CGC, allèle ARG), l'enzyme reconnaît sa séquence spécifique et coupe le produit PCR générant ainsi 2 fragments de taille respective 119 et 160 pb.
- S'il y a présence d'une cytosine (C) au niveau du codon 72 (CCC, allèle PRO), BstUI ne reconnaît pas sa séquence spécifique et donc ne coupe pas le produit PCR de 279pb.

Trois génotypes différents sont alors observés chez les patientes:

- Le génotype homozygote ARG/ARG : on visualisera deux bandes, l'une de taille 119pb et l'autre à 160pb
- Le génotype homozygote PRO/PRO : il apparaît une seule bande à 279pb
- Le génotype hétérozygotes ARG/PRO: on aura 3 bandes de tailles respectives 119pb, 160pb et 279pb (**figure 10**).

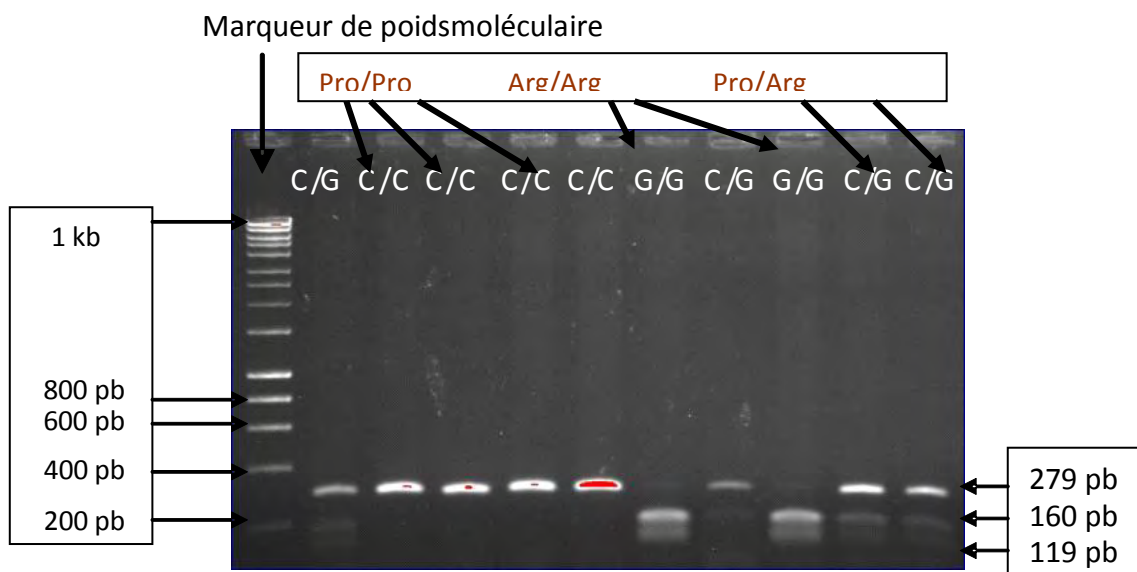


Figure 10 : Photo de digestion des produits PCR avec l'enzyme BstUI

- Ségrégation des allèles du codon 72 dans les familles

Les résultats obtenus ont montré la présence de l'allèle ARG chez les patientes AB et FY à l'état hétérozygote et homozygote respectivement (**figures 11 et 12**). Pour la famille AS, tous les individus étudiés étaient homozygotes pour l'allèle Proline (PRO /PRO).

L'étude de la ségrégation des allèles du codon 72 chez les différents membres de ces deux familles serait en faveur d'une co-ségrégation de l'allèle Arginine du codon 72 du gène p53 avec le cancer du sein.

Pour la famille AB, les génotypes obtenus chez les nièces du cas index (IV/10, IV/11, IV/12) prédisent le génotype Pro/Arg pour leur père (II/3) qui est un frère du cas index AB (III/4). Ceci laisse alors supposer que la mère du cas index qui est décédée du cancer du col de l'utérus (II/1) est probablement de génotype Pro/Arg et que sa sœur également décédée de cancer du sein (II/2) pourrait avoir le même génotype.

De plus, la nièce du cas index (IV/10) a été diagnostiquée de kystes de l'ovaire et elle est hétérozygote Pro/Arg ce qui renforcerait la thèse que l'allèle Arginine du codon 72 pourrait jouer un rôle dans la prédisposition au cancer du sein dans cette famille. Un suivi médical régulier de toutes les filles de cette famille possédant l'allèle Arg devrait être mis en place afin de prévenir le développement d'un cancer du sein, de l'ovaire ou de l'utérus (**Figure 11**).

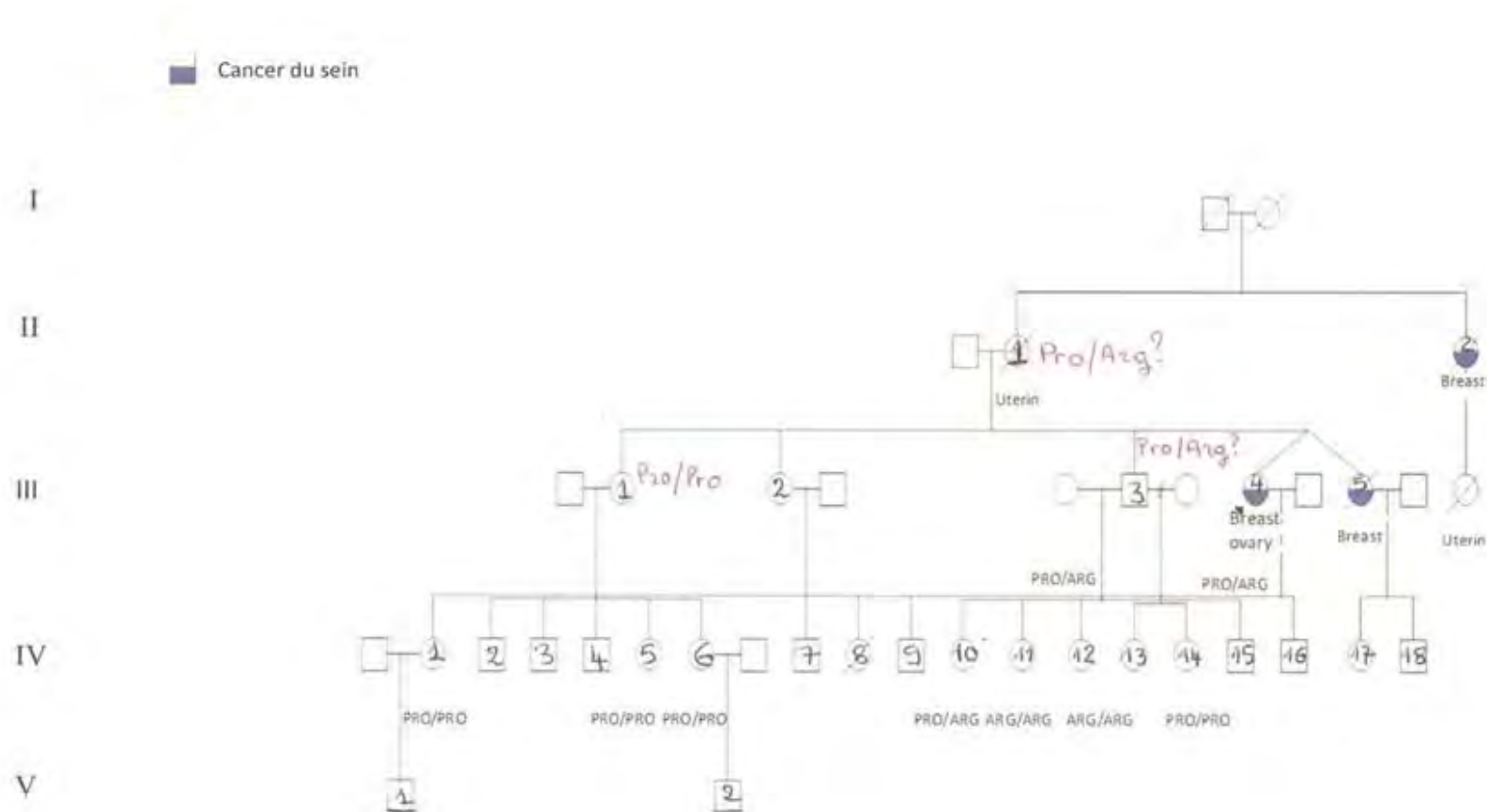


Figure 11 : Ségrégation de l'allèle Arg dans la famille AB

Pour la famille FY le cas index est homozygote pour l'allèle Arginine (IV/12). Ses deux parents sont hétérozygote Pro/Arg. L'étude de la ségrégation des allèles dans cette famille a montré que la tante du cas index est également hétérozygote Pro/Arg (III/1) ce qui suppose que sa mère (II/1) qui est décédée de cancer du sein est probablement de génotype Pro/Arg. Ceci serait en faveur d'un rôle que jouerait l'allèle arginine dans la prédisposition au cancer du sein (**Figure 12**). Un suivi médical devrait donc être instauré chez les membres de cette famille possédant l'allèle Arginine (III/1, III/2, IV/6, IV/10) pour prévenir le développement d'un cancer du sein.

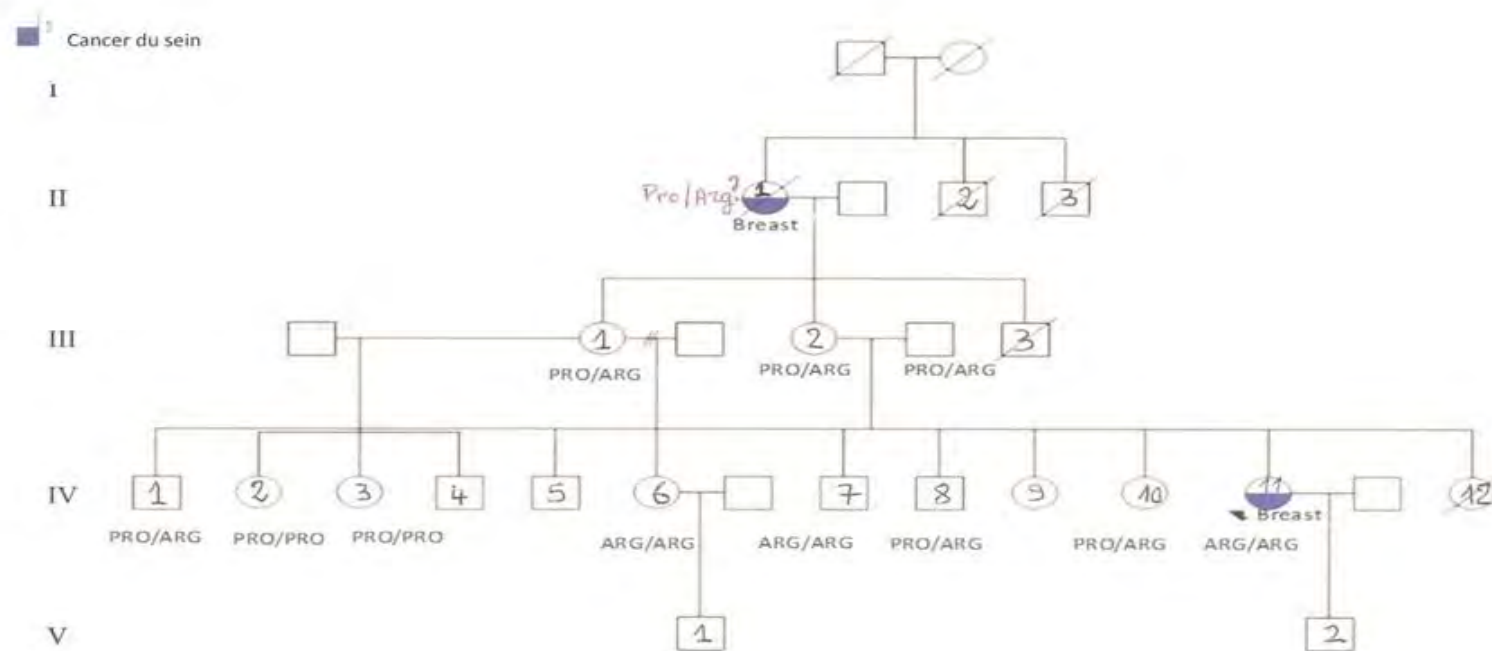


Figure 12 : Ségrégation de l'allèle Arg dans la famille FY

III.2.Discussion

- Prédilection génétique au cancer du sein familial et conseil génétique

Les cancers du sein, de l'ovaire et de l'utérus sont dus à une prédisposition héréditaire dans 5 à 10% des cas. Ces cancers se transmettent selon un mode autosomique dominant. L'identification des gènes de prédisposition à ces types de cancer a connu une avancée importante ces dernières années et a eu un impact majeur dans la prise en charge clinique des formes familiales. Une histoire familiale de cancer du sein, de l'ovaire ou de l'utérus doit conduire à une investigation plus poussée afin d'évaluer le risque génétique.

L'estimation du risque individuel de chaque femme dans les familles à risque nécessite une connaissance de l'histoire personnelle de chacune (âge au diagnostic, parité, âge des premières règles, âge de la ménopause) et de disposer de son arbre généalogique sur 3 à 4 générations (Christinat and Pagani, 2013). C'est le cas des trois patientes recrutées dans notre étude dont chacune a dans sa famille deux à plusieurs cas de cancers du sein parfois associé à celui de l'ovaire et/ou de l'utérus.

L'histoire personnelle de nos patientes a montré un âge précoce au diagnostic (< 55 ans). Ces données recoupent celles de Christinat et collaborateurs qui ont rapporté un âge au diagnostic inférieur ou égale à 60 ans dans les formes familiales de cancer du sein (Christinat and Pagani, 2013). Cet âge précoce au diagnostic serait associé à la présence de mutations géniques impliquées dans la prédisposition au cancer du sein (Ibrahim *et al.*, 2010). De même la multiparité et l'âge tardif à la ménopause (>55ans) ont été rapportés comme étant des facteurs de risque du cancer du sein (Stoppa-Lyonnet *et al.*, 2006). Deux de nos patientes AS et AB avaient un nombre de geste > 6. Seule la patiente FY est une primipare mais avec un diagnostic très précoce de cancer du sein à l'âge de 24 ans, en faveur d'une prédisposition génétique.

Les arbres généalogiques de nos patientes sont également tous informatifs dans la mesure où ils sont tous composés de plus de 4 générations (figure 12, 13, 14). Ceci permet en tenant compte des données personnelles de déterminer pour chaque femme de la famille le risque génétique lors d'une consultation oncogénétique. Le calcul du risque permettra d'identifier les individus à haut risque de cancer du sein. Il repose sur l'évaluation de l'histoire personnelle et familiale, la détermination de la probabilité de mutation génique et la mise en place d'un suivi psychosocial et d'une stratégie de surveillance. La réduction du risque se fera par la chirurgie prophylactique ou la prévention pharmacologique en particulier l'hormonothérapie.

- **codon 72 du gène p53 dans le cancer du sein familial**

Le codon 72 du gène p53 dont l'allèle Arginine est impliqué dans la prédisposition à plusieurs types de cancer chez différentes populations (Saranath *et al.*, 2002; Storey *et al.*, 1998). La ségrégation des allèles du codon 72 a montré que l'allèle Arginine serait associé à une prédisposition au cancer du sein dans les familles AB et FY ce qui serait en concordance avec les résultats obtenus dans des études d'association cas/contrôles rapportées chez les populations Caucasiennes et Asiatiques (Hrstka *et al.*, 2009; Noma *et al.*, 2004). Cependant cette association n'est pas toujours répliquée sur d'autres populations de même groupe ethnique. Ainsi l'absence d'association de l'allèle Arginine avec le risque de cancer du sein a été rapportée par différentes études (De Vecchi *et al.*, 2008; Hou *et al.*, 2013).

Par ailleurs il a été rapporté sur deux populations Tunisienne et Turc l'association entre un haplotype du gène p53 contenant l'allèle Arginine du codon 72 (Ins16bp-Arg72-G13964) avec un risque élevé de cancer du sein (Buyru *et al.*, 2007; Trifa *et al.*, 2010). Ces résultats corroborent ceux obtenus dans notre étude et confirment le rôle que jouerait l'allèle Arginine de p53 dans la prédisposition au cancer du sein. Une analyse systématique de toutes les mutations du gène ainsi que des différents haplotypes devrait permettre de confirmer ces résultats dans la population sénégalaise.

CONCLUSION

Le cancer constitue l'une des principales causes de mortalité et de morbidité à travers le monde. Le cancer du sein est actuellement le second cancer dans les pays en voie de développement et pose un véritable problème de santé publique. Si en Occident l'incidence de ce cancer tend à la réduction, tel n'est pas le cas en Afrique.

La majorité des cancers du sein diagnostiqués sont sporadiques cependant 5 à 10% sont héréditaires et sont dus à une prédisposition génétique. Les résultats obtenus dans ce travail ont montré que le cancer du sein familial est bien présent dans la population sénégalaise. L'identification des mutations sur les gènes impliqués et conférant une prédisposition génétique au cancer du sein dans les familles devrait permettre la mise en place d'une stratégie de prévention par un suivi médical régulier chez les patientes à risque. Le diagnostic sera donc plus précoce et la prise en charge thérapeutique plus adaptée, ce qui permettrait de réduire la mortalité et la morbidité dues au cancer du sein. Cette étude est une étude pilote que nous envisageons d'élargir par le recrutement d'autres familles. Elle devrait permettre la mise en place d'une consultation d'oncogénétique au Sénégal

Références bibliographiques

- 1 Adesunkanmi, A.R., Lawal, O.O., Adelusola, K.A., and Durosimi, M.A. (2006). The severity, outcome and challenges of breast cancer in Nigeria. *Breast* 15, 399-409.
- 2 Albarino, C.G., and Romanowski, V. (1994). Phenol extraction revisited: a rapid method for the isolation and preservation of human genomic DNA from whole blood. *Mol Cell Probes* 8, 423-427.
- 3 Antoniou, A.C., and Easton, D.F. (2006). Models of genetic susceptibility to breast cancer. *Oncogene* 25, 5898-5905.
- 4 Beckman, G., Birgander, R., Sjalander, A., Saha, N., Holmberg, P.A., Kivela, A., and Beckman, L. (1994). Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum Hered* 44, 266-270.
- 5 Beghin, A. (2007). Implications de la protéine Arl2 dans le phénotype tumoral et les mécanismes de chimiorésistance dans le cancer du sein. Thèse pour l'obtention du diplôme de doctorat université Claude Bernard - Lyon 1, 52-2007.
- 6 Buyru, N., Altinisik, J., Demokan, S., and Dalay, N. (2007). p53 genotypes and haplotypes associated with risk of breast cancer. *Cancer Detect Prev* 31, 207-213.
- 7 Christinat, A., and Pagani, O. (2013). Practical aspects of genetic counseling in breast cancer: lights and shadows. *Breast* 22, 375-382.
- 8 De Vecchi, G., Verderio, P., Pizzamiglio, S., Manoukian, S., Bernard, L., Pensotti, V., Volorio, S., Ravagnani, F., Radice, P., and Peterlongo, P. (2008). The p53 Arg72Pro and Ins16bp polymorphisms and their haplotypes are not associated with breast cancer risk in BRCA-mutation negative familial cases. *Cancer Detect Prev* 32, 140-143.
- 9 Dominique Stoppa-Lyonnet, M.G.-V., Isabelle Coupier, Pascale This1, Nadine Andrieu (2006). Diagnostic des patientes à risques de cancer du sein. *le sein*, 1- 10.
- 10 Ford, D., Easton, D.F., Stratton, M., Narod, S., Goldgar, D., Devilee, P., Bishop, D.T., Weber, B., Lenoir, G., Chang-Claude, J., *et al.* (1998). Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 62, 676-689.
- 11 Hainaut, P., and Hollstein, M. (2000). p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res* 77, 81-137.
- 12 Hou, J., Jiang, Y., Tang, W., and Jia, S. (2013). p53 codon 72 polymorphism and breast cancer risk: A meta-analysis. *Exp Ther Med* 5, 1397-1402.
- 13 Hrstka, R., Coates, P.J., and Vojtesek, B. (2009). Polymorphisms in p53 and the p53 pathway: roles in cancer susceptibility and response to treatment. *J Cell Mol Med* 13, 440-453.
- 14 Ibrahim, S.S., Hafez, E.E., and Hashishe, M.M. (2010). Presymptomatic breast cancer in Egypt: role of BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes mutations detection. *J Exp Clin Cancer Res* 29, 82.
- 15 IARC (2011). Cancer Incidence Mortality And Prevalence World Health Organisation.
- 16 Joerger, A.C., and Fersht, A.R. (2007). Structure-function-rescue: the diverse nature of common p53 cancer mutants. *Oncogene* 26, 2226-2242.
- 17 Kern, S.E., Pietenpol, J.A., Thiagalingam, S., Seymour, A., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1992). Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. *Science* 256, 827-830.
- 18 Li, R., Sutphin, P.D., Schwartz, D., Matas, D., Almog, N., Wolkowicz, R., Goldfinger, N., Pei, H., Prokocimer, M., and Rotter, V. (1998). Mutant p53 protein expression interferes with p53-independent apoptotic pathways. *Oncogene* 16, 3269-3277.

- 18 Marin, M.C., Jost, C.A., Brooks, L.A., Irwin, M.S., O'Nions, J., Tidy, J.A., James, N., McGregor, J.M., Harwood, C.A., Yulug, I.G., *et al.* (2000). A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. *Nat Genet* 25, 47-54.
- 19 Noma, C., Miyoshi, Y., Taguchi, T., Tamaki, Y., and Noguchi, S. (2004). Association of p53 genetic polymorphism (Arg72Pro) with estrogen receptor positive breast cancer risk in Japanese women. *Cancer Lett* 210, 197-203.
- 20 Ohiro, Y., Usheva, A., Kobayashi, S., Duffy, S.L., Nantz, R., Gius, D., and Horikoshi, N. (2003). Inhibition of stress-inducible kinase pathways by tumorigenic mutant p53. *Mol Cell Biol* 23, 322-334.
- 21 Pim, D., and Banks, L. (2004). p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. *Int J Cancer* 108, 196-199.
- 22 Rozen, S., and Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132, 365-386.
- 23 Sakamuro, D., Sabbatini, P., White, E., and Prendergast, G.C. (1997). The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene* 15, 887-898.
- 24 Saranath, D., Khan, Z., Tandle, A.T., Dedhia, P., Sharma, B., Contractor, R., Shrivastava, S., and Dinshaw, K. (2002). HPV16/18 prevalence in cervical lesions/cancers and p53 genotypes in cervical cancer patients from India. *Gynecol Oncol* 86, 157-162.
- 25 Storey, A., Thomas, M., Kalita, A., Harwood, C., Gardiol, D., Mantovani, F., Breuer, J., Leigh, I.M., Matlashewski, G., and Banks, L. (1998). Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 393, 229-234.
- 26 Tavassoéli F.A, D.P.W. (2003). Tumors of the breast and femal genital organs. pathology and genetics.
- 27 Trifa, F., Karray-Chouayekh, S., Mabrouk, I., Baccouche, S., Khabir, A., Sellami-Boudawara, T., Gargouri, A., and Mokdad-Gargouri, R. (2010). Haplotype analysis of p53 polymorphisms: Arg72Pro, Ins16bp and G13964C in Tunisian patients with familial or sporadic breast cancer. *Cancer Epidemiol* 34, 184-188.
- 28 Vousden, K.H., and Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 137, 413-431.
- 29 Walker, K.K., and Levine, A.J. (1996). Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 15335-15340.
- 30 Wittekind, L.H.S.A.C. (2002). Classification of Malignant Tumours. *TNM Classification of Malignant Tumours 6 ième édition.*
- 31 Zhou, Y., Li, N., Zhuang, W., Liu, G.J., Wu, T.X., Yao, X., Du, L., Wei, M.L., and Wu, X.T. (2007). P53 codon 72 polymorphism and gastric cancer: a meta-analysis of the literature. *Int J Cancer* 121, 1481-1486.

Références WEB

1. <http://www.stjude.org/stjude/v/index.jsp?vgnextoid> (consulté le 12 janvier 2014 à 11h45).
2. <http://acces.ens-lyon.fr/biotic/gpe/dossiers/p53/html/mutasoma.htm>, (consulté le 10 janvier 2014 à 12h25)
3. http://masterbiologie.fr/M1_web/index2.php?id=4&p=5, (consulté le 10 janvier 2014 à 13h40).
4. http://p53.free.fr/Database/p53_cancer/p53_breast.html, (10 janvier 2014 à 18h35).

Annexe 1

Institut du cancer, HALD
Laboratoire de Cytologie Cytogénétique et Biologie de la Reproduction, HALD
Faculté de Médecine, Pharmacie et Odontologie, UCAD

Codon 72 du gène p53 dans le cancer du sein familial au Sénégal

FICHE D'ENQUETE

N° de dossierN°

Date de l'enquête : □` : □` : □` : □` : □` : □`

ETAT CIVIL

Nom :

Prénoms :

Sexe : Féminin : □` : □`

Masculin : □` : □`

Date et lieu de naissance :

Age

Nationalité :

Ethnie

Niveau socio-économique

Profession :

Résidence :

Téléphone :

Antécédents

- Personnels

Age lors des premières menstruations

Nombre de grossesses (incluant fausse couche ou avortement)

Age lors du premier accouchement

-Pathologie :

Mère

-âge :

-Ethnie :

-Profession

-Notion de consanguinité :

-Intoxication : -tabac :

-alcool :

-utilisation de
déodorants en spray

-Pathologie :

Fratrie:

-numéro dans la fratrie :

Frères : -nombre :

Pathologies :

Sœurs :- nombre :

Pathologies

Arbre généalogique :

Histoire de la maladie

Age de révélation du cancer :

Durée des symptômes cliniques avant la première consultation :

Examen actuel

Clinique :

Coté où se trouve le cancer :

Type de tumeur :

Taille de la tumeur :

Grade du cancer :

Stade du cancer :

Atteinte ganglionnaire :

-Paraclinique :

Dosage des marqueurs tumoraux :

date analyse :

Autres analyses :

Traitement :

Médical :

Interventionnel :

Chirurgical :

Evolution :

Durée du suivi jusqu'à la dernière consultation :

Evolution :

Qualité du résultat opératoire :

Complications

Déclaration de sujet

Cette étude m'a été expliquée. Je me porte volontaire pour participer à cette recherche. J'ai eu l'opportunité de poser des questions avant ma participation à l'étude et je peux en poser ultérieurement à chacun des chercheurs listés plus haut. Je peux me retirer à n'importe quel moment de cette étude.

Nom et Prénom du sujet :

Signature du sujet :

Marque du sujet si consentement verbal :

Date :

Annexe 2

Extraction d'ADN : Mode opératoire .

- 1- Centrifuger le prélèvement sanguin après ponction veineuse sur tube EDTA à 1800 tours/mn pendant 10mn à 4°C
- 2- Récupérer la couche de globules blancs située entre le plasma et le culot de globule rouge
- 3- Lyser les globules rouges contaminants par le tampon de lyse des globules rouges. Agiter par retournement, incubé dans la glace pendant 10mn en agitant de temps en temps
- 4- Centrifuger à 2500 tours/mn pendant 10 mn à 4°C, éliminer le surnageant. Répéter cette étape jusqu'à l'obtention d'un culot de globules blancs clair. Poursuivre l'extraction de L'ADN ou conserver à -20°C.
- 5- Ajouter au culot leucocytaire :
 - 500µl de tampon SE
 - 2ml de tampon protéinase K
 - 75µl de protéinase
 - Placer les tubes à 50°C pendant 4heures;
- 6- Ajouter dans chaque tube, le même volume de mélange phénol-chloroforme-alcool isoamylique. Incuber à 25°C pendant toute la nuit.
- 7- Centrifuger les tubes à 2500°C rpm pendant 10mn. Récupérer le surnageant dans un récipient propre et additionner un égal volume d'isopropanol. L'ADN précipite (méduse)
- 8- Centrifuger le mélange (surnageant-isopropanol) à 400rpm pendant 30mn. Eliminer le surnageant, puis laver avec de l'éthanol à 70%. Eliminer le surnageant, sécher le tube et récupérer le culot au fond du tube (ADN soluble) avec du T.E (100µl).

Réactifs pour l'extraction de L'ADN

Tableau 1: Tampon de lyse des globules rouges

Sucrose	27,375g
Tris HCL	2,5ml
MgCL ₂	1.25ml
Eau distillée	250ml

Après autoclave, ajouter 250µl de Triton X-100

Tableau 2 Tampon de lyse des globules blancs (tampon S.E)

NaCl 5M	3,75 ml
EDTA 0,5M	12 ml
Eau distillée qsp	250 ml

Tableau3: tampon de lyse des protéines

Sucrose	67,5g
EDTA 0,5M	0,5 ml
SSC 20X	50 ml
Eau distillée qsp	250 ml

Après autoclave, ajouter 5ml de SDS à 10%

Tableau 4: tampon T.E

Tris HCl 1M pH 7,5	1 ml
EDTA 0,5	200 µl
Eau distillée qsp	100 ml

Tableau 5: Mélange Phénol-chloroforme-alcool isoamylique

Phénol+ 0,15g d'OH 8quinoléine	150 ml (25)
Chloroforme	144 ml (24)
Alcool isoamylique	6ml (1V)

Résumé

Le cancer du sein est le premier cancer de la femme dans les pays développés et le second dans les pays en voie de développement. Au Sénégal, la population subit les affres de ce cancer en termes d'incidence et de mortalité. La majorité des cancers du sein sont sporadiques, cependant 5 à 10% sont des formes familiales. Le mécanisme de la carcinogénèse dans les formes héréditaires implique plusieurs gènes suppresseurs de tumeur telle-que le gène p53. Plusieurs mutations conférant une prédisposition génétique au cancer du sein ont été décrites dans ce gène chez les populations caucasiennes, asiatiques et américaines mais rarement chez les populations africaines. Notre travail avait comme objectif d'étudier le codon 72 du gène p53 dans la prédisposition au cancer du sein familial au Sénégal. Trois patientes atteintes de cancer du sein ayant chacune une histoire familiale et suivies à l'Institut Joliot Curie de l'Hôpital Aristide Le Dantec ont été recrutées. Une enquête familiale a été réalisée et des membres de chacune des familles ont également été inclus dans l'étude après consentement éclairé. Chez chaque individu recruté un prélèvement de sang veineux a été réalisé sur tube EDTA pour l'extraction de l'ADN. Le codon 72 du gène p53 génotypé par PCR-RFLP. Les résultats obtenus ont montré une co-ségrégation de l'allèle Arginine du codon 72 avec le cancer du sein dans deux familles en faveur d'une prédisposition génétique. Les résultats de ce travail ouvriront certes de nouvelles perspectives dans la prévention et la prise en charge du cancer du sein familial au Sénégal mais surtout permettront une meilleure connaissance de l'épidémiologie du cancer du sein familial au Sénégal.

Mots clés: cancer du sein familial, mutations, codon 72 du gène p53

Summary

Breast cancer is the first cancer in women in developed countries and the second in developing countries. In Senegal, people are suffering from this cancer in terms of incidence and mortality. The majority of breast cancers are sporadic, however 5-10% are hereditary forms. The mechanism of carcinogenesis in hereditary form involved tumor suppressor genes with in particular p53 gene. Several mutations conferring genetic predisposition to breast cancer have been described in this gene in Caucasians, Asians and Americans but rarely in African populations. Our aim in this study was to investigate the codon 72 of the p53 gene in susceptibility to hereditary breast cancer in Senegal. Three patients with diagnosed breast cancer and having a family history followed up at Curie Institute in Le Dantec Hospital have been recruited. Other members of each family were also included in the study after informed consent. On each recruited individual, a sample of venous blood was taken on EDTA tube for DNA extraction. Codon 72 of p53 gene have been genotyped by PCR-RFLP. We found a co-segregation of the Arginine allele of codon 72 with breast cancer in the two families standing for a genetic predisposition. Our results open new perspectives in the prevention and management of familial breast cancer in Senegal but also will allow a better understanding of the epidemiology of breast cancer in Senegal

Keywords: Hereditary breast cancer, mutations, p53 codon 72