

UNIVERSITÉ CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR



**ECOLE DOCTORALE
SCIENCES DE LA VIE, DE LA SANTE ET DE L'ENVIRONNEMENT
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES**

Année : 2020

N°d'ordre : 201946

THESE DE DOCTORAT
Spécialité
GENETIQUE DES POPULATIONS
Présentée par
AHMED Mohamed Mze

**IMPLICATION DES MUTATIONS DU GENE MITOCHONDRIAL
MT-CYB ET DE L'ONCOGENE *BRAF* DANS LES TUMEURS DU
SEIN CHEZ LES FEMMES SENEGALAISES**

Soutenue le 12 Mars 2020 devant le jury composé de :

Président : M. Ibrahima NDOYE, Professeur titulaire, FST/UCAD
Rapporteurs : M. Cheikh THIAW, Professeur Assimilé, USSEIN Kaolack
M. Malick FALL, Professeur Assimilé, FST/UCAD
M. Jean Yves CORNO, Directeur de recherche, U. Montpellier/France
Examineur : M^{me}. MBAYE Fatimata, Maître de conférences Assimilé, FST/UCAD
Directeur de thèse : M. Mbacké SEMBENE, Professeur titulaire, FST/UCAD

DÉDICACES

*À mes parents, ma regretté mère **CHANDO** Msaidié, qu'**ALLAH** l'accueille dans son paradis et mon père **MOHAMED** Mze.*

*À la mémoire de ma défunte grande mère **MDREGELYA** Soilihi. Qu'**ALLAH** l'accorde sa miséricorde.*

*À toute ma famille en particulier mon oncle **TOHIR** Mohamed et à mon frère **BEN ALI** Mohamed Mze.*



REMERCIEMENTS

Je rends grâce à **ALLAH**, le tout Miséricordieux, le très Miséricordieux, le tout Puissant, de m'avoir accordé la vie, la santé et la motivation pour m'engager dans la recherche scientifique. Que le salut et la bénédiction d'Allah soient sur Son Prophète **MOUHAMMAD**.

Mes profondes reconnaissances vont en premier à mes Professeures, Monsieur Pape Mbacké **SEMBENE** et Madame Docteur Fatimata **MBAYE**, pour les nombreux efforts qu'ils ont consentis : ils ont assuré tout au long de ma formation depuis la licence jusqu'au Doctorat un encadrement indéfectible. Je vous remercie de m'avoir guidé et orienté dans la recherche.

J'adresse tout particulièrement mes sincères remerciements au Professeur Pape Mbacké **SEMBENE** qui m'a donné l'opportunité de faire cette thèse. Cela a été un grand honneur pour moi de réaliser ces travaux sous sa direction. Votre compétence, votre modestie et vos œuvres font de vous un modèle à inspirer. Si je suis arrivé jusque-là c'est grâce à vous, puisque vos conseils m'ont été d'une grande utilité et m'ont donné le courage de continuer mes études, mais aussi de croire et d'avoir confiance en moi. Je vous manifeste toutes mes reconnaissances professeur pour m'avoir initié dans le domaine de la recherche. Trouvez ici, cher professeur, le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Un grand merci à Madame le Docteur Fatimata **MBAYE**. Combien je suis gêné de ne pouvoir trouver les justes mots pour vous exprimer mes sentiments de reconnaissance pour votre disponibilité, votre modestie, votre rigueur scientifique qui me donne toujours le courage d'approfondir et d'améliorer ce travail. Je vous remercie de l'intérêt que vous avez porté à ce travail et votre engagement dans toutes les étapes de mon encadrement. Veuillez trouver ici, l'expression de mes plus sincères remerciements.

Je remercie chaleureusement les membres du jury qui ont bien voulu accepter de juger cette thèse. C'est un grand honneur de soumettre mon travail à votre regard scientifique.

Merci au Professeur **Ibrahima NDOYE**, de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse, veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

Merci au Dr **Cheikh Thiaw**, d'avoir accepté avec sympathie de faire partie de ce jury et rapporteur de ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect.

Mes remerciements au Dr **Malick FALL**, pour ses généreux conseils, mais aussi pour la qualité d'enseignements qu'il nous a fournis en licence et pour toute l'amitié qu'il porte à l'endroit des étudiants. Sa rigueur scientifique et sa courtoisie sont autant de qualités qui m'ont toujours marqués. Merci d'avoir accepté d'être membre de ce jury et rapporteur de ce travail, malgré toutes les charges qui pèsent sur vous.

Merci au Professeur **M. Jean Yves CORNO**, d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail.

Je tiens à remercier l'ensemble des chercheurs de l'équipe **GENGESPOP**. J'ai apprécié votre dynamisme, votre sens critique durant les réunions scientifiques et l'intérêt que vous avez porté à mon travail.

Merci à tous ceux qui par leurs conseils m'ont permis d'avancer dans mes recherches. Merci à mon ami Babacar **DIOUF** et au Dr **Toffène DIOME** pour leurs conseils et leurs encouragements.

Je rends un grand Hommage à mes bien-aimés parents, ma regrettée mère **CHANDO** Msaidié que Dieu lui accueille dans son paradis, mon père **MOHAMED** Mze, à qui je dois beaucoup mon éducation. Ils ont toujours cru en moi et ont réussi à faire de moi tout ce que je suis de bon. Cette thèse est le couronnement de succès de tous les efforts et les nombreux sacrifices qu'ils ont consentis.

Merci infiniment à mon oncle **TOHIR** Mohamed, pour votre soutien constant tout au long de mes études. Merci pour votre compréhension et votre gentillesse, vos encouragements et vos conseils en or. Vous avez toujours été là pour nous depuis notre enfance, votre seul souci c'est de nous voir réussir. Les mots ne peuvent pas exprimer la force de ma gratitude envers vous. Qu'ALLAH le tout puissant vous bénisse!

Merci à mon grand frère **BEN ALI** Mohamed Mze, pour son soutien continu, ses conseils, surtout durant les moments difficiles. Merci pour sa motivation qui aujourd'hui me pousse à aller plus loin. Que le présent travail soit la preuve de ma profonde gratitude et de mon sincère respect.

J'adresse toute mon affection à ma famille et en particulier à mes frères : **SAID** Mohamed, **SALIM** Mohamed, **BOUSSRY** Mohamed et **YOUSSOUF** Mohamed Mze. À mes sœurs : **FOUTOUM** Mohamed, **HADIDJA** Mohamed et **FATIMA** Mohamed Mze. À ma tante **HALIMA** Bourhane. Certainement arrivé jusqu'à là, n'aurait pas été possible sans l'aide de la famille. Heureusement que vous avez cru en moi. Sans votre support, vos encouragements et vos prières rien n'aurait été possible. Je vous aime sans limites...

Un grand et énorme merci à tous mes amis de toujours : **MOHAMED** Said Mze (ANGLOMA), **HABIB** Ben Halifa, **SAID** Ahmada, **MOUTOUGHOU** Ali Abdou. Merci pour votre soutien et votre amitié qui m'est chère. Je souhaite aussi adresser mes remerciements à tous mes amis qui m'ont soutenu, mais qui sont trop nombreux pour les citer tous ici.

Enfin merci à toutes les personnes que je n'ai pas citées ici et qui se reconnaîtront dans ces quelques lignes.

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR
Ecole doctorale : Sciences de la Vie, de la Santé et de l'Environnement
Thèse de doctorat
Spécialité : Génétique des Populations

Nom et prénom de la candidate : AHMED Mohamed Mze

Titre de la thèse : Implication des mutations du gène mitochondrial *MT-CYB* et de l'oncogène *BRAF* dans les tumeurs du sein chez les femmes sénégalaises.

Date et lieu de soutenance : 12 Mars 2020, FST, UCAD

Président : M. Ibrahima NDOYE, Professeur titulaire, FST/UCAD

Rapporteurs : M. Cheikh THIAW, Professeur Assimilé, USSEIN Kaolack

M. Malick FALL, Professeur Assimilé, FST/UCAD

M. Jean Yves CORNO, Professeur titulaire, U. Montpellier/France

Examineur : M^{me}. MBAYE Fatimata, Maître de conférences Assimilé, FST/UCAD

Directeur de thèse : M. Mbacké SEMBENE, Professeur titulaire, FST/UCAD

Résumé

Le centre international de recherche sur le cancer (CIRC), estime une hausse des cancers du sein dans le monde. Il reste jusqu'à l'heure actuelle un problème majeur de santé publique. Au Sénégal, le cancer du sein occupe la deuxième place des cancers féminins. Dans la plupart des pays d'Afrique (y compris le Sénégal), 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 pathologies mammaires. Pour mieux comprendre l'impact de la variabilité nucléotidique et l'instabilité génétique des tumeurs du sein, nous avons utilisé deux marqueurs de nature différente à savoir *MT-CYB* (gène mitochondrial) et *BRAF* (gène nucléaire) afin de mieux comprendre et d'acquérir des informations nécessaires pour bien étudier cette maladie. C'est dans ce cadre, que s'inscrit notre projet de recherche qui a eu pour objectif générale de connaître le degré d'implication des mutations du gène mitochondrial *MT-CYB* et de l'oncogène *BRAF* dans la carcinogenèse mammaire. Trois populations (témoins, des patientes atteintes de tumeurs bénignes et d'autres atteintes de tumeurs malignes) ont été constituées dans cette étude. Des prélèvements de sang total ont été obtenus sur tube EDTA chez les sujets de contrôle. Pour les patientes, une pièce tumorale a été obtenue après une intervention chirurgicale. Les résultats obtenus ont révélé plusieurs mutations aussi bien au niveau des séquences des tumeurs malignes que bénignes. Cependant, elles étaient plus fréquentes au niveau de tumeurs malignes. Les résultats révèlent également que la fréquence de chaque acide aminé issu des séquences du *MT-CYB* se différencie légèrement entre témoins, tumeurs bénignes et malignes sans différence significative à l'exception de la glutamine. L'analyse de la différenciation génétique révèle une grande distance génétique entre témoins et tumeurs malignes ainsi que tumeurs bénignes et malignes ($d=0,141$), contre une faible distance génétique ($d=0,003$) entre témoins et tumeurs bénignes. Le *MT-CYB* est sous sélection positive. Dans un deuxième cas on a fait la même démarche que la précédente étude avec l'exon 15 du gène *BRAF*. L'analyse à l'identification de mutation de l'exon 15 du gène *BRAF* nous a révélé dans les tumeurs bénignes, la présence des mutations L588H et D598V et au niveau des tumeurs malignes une mutation synonyme A598A. Les résultats ont montré que les mutations somatiques de ce gène *BRAF* étaient moins fréquentes chez les patientes sénégalaises atteintes des tumeurs qu'elles soient bénignes ou malignes du sein. Dans ces deux études les mutations étaient plus fréquentes dans les tumeurs malignes que bénignes. Cependant les mutations de *BRAF* sont approximativement faibles au niveau du cancer du sein contrairement aux mutations du gène *MT-CYB*. Nos résultats obtenus nous ont permis de conclure l'implication du gène *MT-CYB* dans les tumeurs de sein. Nous pouvons aussi conclure que le gène *MT-CYB* est plus impliqué dans le cancer du sein par rapport à l'exon 15 du gène *BRAF*.

Mots clés : tumeur, sein, bénigne, malignes, mutations, *MT-CYB*, *BRAF*, Sénégal

Summary :

The International Agency for Research on Cancer (IARC), estimates a rise in breast cancer worldwide. Until now, it remains a major public health problem. In Senegal, breast cancer ranks second among female cancers. In most African countries (including Senegal), even if benign breast tumors are not the leading cause of hospitalization as in developed countries around the world, they occupy an important place in breast pathologies. To better understand the impact of nucleotide variability and genetic instability in breast tumors, we used two markers of a different nature namely *MT-CYB* (mitochondrial gene) and *BRAF* (nuclear gene) in order to better understand and acquire the information necessary to properly study this disease. It is in this context that our research project falls within the scope of the general objective of determining the degree of involvement of mutations in the mitochondrial gene *MT-CYB* and of the oncogene *BRAF* in breast carcinogenesis. Three populations (controls, patients with benign tumors and others with malignant tumors) were formed in this study. Whole blood samples were obtained on an EDTA tube from the control subjects. For the patients, a tumor specimen was obtained after surgery. The results obtained revealed several mutations both at the level of the sequences of malignant and benign tumors. However, they were more common in malignant tumors. The results also reveal that the frequency of each amino acid from the *MT-CYB* sequences differs slightly between controls, benign and malignant tumors with no significant difference except for glutamine. Analysis of genetic differentiation reveals a large genetic distance between controls and malignant tumors as well as benign and malignant tumors ($d = 0.141$), compared with a small genetic distance ($d = 0.003$) between controls and benign tumors. *MT-CYB* is under positive selection. In a second case, we took the same approach as the previous study with exon 15 of the *BRAF* gene. Analysis for mutation identification of exon 15 of the *BRAF* gene revealed the presence of L588H and D598V mutations in benign tumors and in malignant tumors a mutation synonymous with A598A. The results showed that somatic mutations in this *BRAF* gene were less common in Senegalese patients with both benign and malignant breast tumors. In these two studies, mutations were more common in malignant than benign tumors. However, *BRAF* mutations are approximately weak in breast cancer unlike mutations in the *MT-CYB* gene. Our results have allowed us to conclude the involvement of the *MT-CYB* gene in breast tumors. We can also conclude that the *MT-CYB* gene is more involved in breast cancer compared to exon 15 of the *BRAF* gene.

Keywords: tumor, breast, benign, malignant, mutations, *MT-CYB*, *BRAF*, Senegal

LISTE DES ABREVIATIONS

A :	Adénine
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNmt :	ADN mitochondrial
ADNn :	ADN nucléaire
Ala :	Alanine
Arg :	Arginine
ARN :	Acide ribonucléique
Asn :	Asparagine
Asp :	Acide aspartique
<i>BRAF</i> :	Fibrosarcome kinase B
<i>BRCA1</i> :	<i>Breast Cancer 1</i>
<i>BRCA2</i> :	<i>Breast Cancer 2</i>
C	Cytosine
CCIS :	Carcinome canalaire <i>in situ</i>
CLIS :	Carcinome lobulaire <i>in situ</i>
CIRC :	Agence internationale de recherche sur le cancer
DdNTP :	Didésoxyribonucléotide
<i>D-Loop</i> :	<i>Displacement Loop</i>
DPR :	Date première règle
ERK :	Extracellular signal Regulated Kinase
EROS :	Espèces Réactives de l'Oxygène surproduction
G	Guanine
Gln :	Glutamine
Glu :	Acide glutamique
Gly :	Glycine
GTP :	Guanosine Trisphosphate
His :	Histidine
HIV :	Virus de l'immunodéficience humaine
Ile :	Isoleucine
Leu :	Leucine
Lys :	Lysine
MAPK :	Mitogen-Activated Protein Kinase

Met :	Méthionine
<i>MT-CYB</i> :	Cytochrome B codé de manière mitochondriale
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
PI3K :	Phosphoinositide 3-Kinase
Pb :	Paire de base
Phe :	Phénylalanine
Pro :	Proline
RAS :	Rat Sarcoma
ROS :	réactives de l'oxygène
Ser :	Serine
T :	Thymine
TB :	Tumeurs bénignes
TM:	Tumeurs malignes
Thr :	Thréonine
Trp :	Tryptophane
Tyr :	Tyrosine
Val :	Valine

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : DEVELOPPEMENT D'UNE TUMEUR MALIGNNE.....	7
FIGURE 2 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN SEIN EN COUPE.....	12
FIGURE 3 : EVOLUTION DE L'ARCHITECTURE DE LA GLANDE MAMMAIRE.....	13
FIGURE 4 : ORGANISATION DE L'ADN MITOCHONDRIAL HUMAIN.....	23
FIGURE 5: REPRESENTATION DES 3 DOMAINES STRUCTURAUX DE <i>BRAF</i>	24
FIGURE 6 : FREQUENCES NUCLEOTIDIQUES DES SEQUENCES DU <i>MT-CYB</i>	35
FIGURE 7 : COURBES DE MISMATCH DISTRIBUTION DES TEMOINS (A), TUMEURS BENIGNES (B) ET TUMEURS MALIGNES (C).....	39
FIGURE 8 : NATURE ET FREQUENCE DES MUTATIONS DE L'EXON 15 DU GENE <i>BRAF</i> ...	53
FIGURE 9 : FREQUENCES NUCLEOTIDIQUES DES SEQUENCES DU <i>BRAF</i>	55
FIGURE 10 : COURBES DE MISMATCH DISTRIBUTION DES TEMOINS (A), TUMEURS BENIGNES (B) ET TUMEURS MALIGNES (C) DU GÈNE <i>BRAF</i>	59

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I : TABLEAU RECAPITULATIF DES CARACTERISTIQUES DES TUMEURS BENIGNES ET DES TUMEURS MALIGNES	21
TABLEAU II: VALEURS DES INDICES DE DIVERSITE GENETIQUE DE CHAQUE POPULATION DU <i>MT-CYB</i>	34
TABLEAU III : FREQUENCES DES ACIDES AMINES DU <i>MT-CYB</i>	36
TABLEAU IV: DISTANCES GENETIQUES INTRA ET INTER-GROUPE ET INDICE DE DIFFERENCIATION (FST) DU <i>MT-CYB</i>	37
TABLEAU V: VALEURS DU TEST DE SIGNATURE DE SELECTION DU <i>MT-CYB</i>	38
TABLEAUX VI : VALEURS DES SSD, DES RAG, ET LEURS P-VALUES DU <i>MT-CYB</i>	40
TABLEAU VII : MUTATIONS SOMATIQUES DE BRAF ET LEURS FREQUENCES DANS LES MELANOMES HUMAINS.....	45
TABLEAU VIII : NATURE ET FREQUENCES DES MUTATIONS.....	52
TABLEAU IX : VALEURS DES INDICES DE DIVERSITE GENETIQUE DE CHAQUE POPULATION DU GÈNE <i>BRAF</i>	54
TABLEAU X : FREQUENCES DES ACIDES AMINES DU <i>BRAF</i>	55
TABLEAU XI: DISTANCES GENETIQUES INTRA ET INTER-GROUPE ET INDICE DE DIFFERENCIATION (FST) DU GÈNE <i>BRAF</i>	57
TABLEAU XII : VALEURS DU TESTS DE SIGNATURE DE SELECTION.....	58
TABLEAUX XIII : VALEURS DES SSD, DES RAG, ET LEURS P-VALUES DU GÈNE <i>BRAF</i>	60

Table des matières

DÉDICACES.....	I
REMERCIEMENTS.....	II
RÉSUMÉ.....	V
SUMMARY.....	VI
LISTE DES ABREVIATIONS.....	VII
LISTE DES FIGURES.....	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	X
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	5
I.1 ORIGINE DES CELLULES CANCÉREUSES.....	5
I.2 DIFFÉRENTS TYPES DE CANCERS.....	7
I.3 CARACTERISTIQUES SPECIFIQUES DES CANCERS.....	7
I.4 CANCER DU SEIN	11
I.4.1 Définition	11
I.4.2 Développement	11
I.4.3 Incidence et mortalité.....	13
I.4.4 Histogénèse	15
I.4.5 Facteurs de risque	16
I.4.6 Statut clinique.....	18
I.4.6.1 Cancers <i>in situ</i>	19
I.4.6.2 Cancers <i>infiltrants</i>	19
I.4.7 Classification	19
I.5 TUMEURS BENIGNES ET MALIGNES	20
I.5.1 Tumeurs bénignes	20

I.5.2 Tumeurs malignes	21
I.6 ADN MITOCHONDRIAL ET CANCERS	22
I.7 ONCOGÈNE <i>B-RAF</i>	24
I.8 VOIE DE SIGNALISATION ET CANCERS	25
I.9 SIGNALISATION PI3K/AKT ET MAPK/ERK1/2 DANS LE CANCER DU SEIN	25
I.10 <i>BRAF</i> DANS LA VOIE DES MAPK	27
I.10.1 <i>BRAF</i> dans la cellule normale	27
I.10.2 <i>BRAF</i> dans la cellule cancéreuse	28
CHAPITRE II : EVALUATION DU POLYMORPHISME ET DE LA DIVERSITE GENETIQUE DU <i>MT-CYB</i> DANS LE CANCER DU SEIN CHEZ LA FEMME SENEGALAISE	29
INTRODUCTION	29
II.1 MATÉRIEL BIOLOGIQUE ET POPULATION D'ETUDE	29
II.2 ÉTUDE GÉNÉTIQUE	30
II.2.1 Extraction D'ADN	30
II.2.2 Choix du gène étudié	31
II.2.3 Amplification en chaine par polymérase du <i>MT-CYB</i> et séquençage	31
II.2.4 ANALYSES MOLÉCULAIRES	32
II.2.4.1 Nettoyage et alignement des séquences du <i>MT-CYB</i>	32
II.2.4.2 Polymorphisme et diversité génétique du <i>MT-CYB</i>	32
II.2.4.3 Étude de la variabilité des acides aminés du <i>MT-CYB</i>	32
II.2.4.4 Analyse de la différenciation génétique du <i>MT-CYB</i>	33
II.2.4.5 Tests de signature de sélection du <i>MT-CYB</i>	33
II.3 RÉSULTATS ET DISCUSSION	33
II.3.1. RÉSULTATS	33
II.3.1.1 Étude de la diversité génétique du <i>MT-CYB</i>	34

II.3.1.2 Variabilité des acides aminés du <i>MT-CYB</i>	35
II. .3.1.3 Différenciation génétique du <i>MT-CYB</i>	37
II.3.1.4 Tests de signature de sélection	37
II.3.1.5 Analyse de la disparité de distribution (Mismatch distribution) du <i>MT-CYB</i>	38
II.3.2 DISCUSSION	40
CONCLUSION PARTIELLE	43
CHAPITRE III : DIVERSITE ET DIFFERENCIATION GENETIQUE DE L'EXON 15 DU GENE <i>BRAF</i> DANS LES TUMEURS DU SEIN.	45
INTRODUCTION.....	45
III.1 METHODOLOGIE.....	48
III.1.1 Patientes et prélèvements	48
III.1.2 ETUDE GENETIQUE	48
III.1.2.1 Extraction de l'ADN	48
III.1.2.2 Choix du gène étudié.....	49
III.1.2.3 ANALYSES MOLÉCULAIRES.....	50
III.2 RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	51
III.2.1 RÉSULTATS.....	51
III.2.1.1 Alignement des séquences nucléotidiques de l'exon 15 du gène <i>BRAF</i> ...	51
III.2.1.2 Nature et fréquence des mutations de l'exon 15 du gène <i>BRAF</i>	51
III.2.1.3 Étude de la diversité génétique de l'exon 15 du gène <i>BRAF</i>	53
III.2.1.4 Variabilité des acides aminés du <i>BRAF</i>	55
III.2.1.5 Différenciation génétique du <i>BRAF</i>	56
III.2.1.6 Tests de signature de sélection.....	57
III.2.1.7 Analyse de la disparité de distribution (Mismatch distribution) de l'exon 15 du gène <i>BRAF</i>	58
III.2.2 DISCUSSION	60

CONCLUSION PARTIELLE.....	63
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	64
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	66
ANNEXE I : FICHE CLINIQUE	A
ANNEXE II : PUBLICATIONS ISSUES DE LA THESE.....	C

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le cancer du sein est la cause la plus fréquente de décès par cancer chez les femmes et le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez les femmes dans le monde (GLOBOCAN, 2012). Il reste jusqu'à l'heure actuelle un problème majeur de santé publique particulièrement chez les femmes de moins de 35 ans, où il est agressif (Axelrod *et al.*, 2008). À l'échelle mondiale la prévalence est de 6,3 millions de femmes vivant avec un cancer du sein diagnostiqué au cours des cinq années précédentes (OMS, 2012). L'incidence du cancer du sein est quatre à dix fois plus élevée dans les pays occidentaux (États-Unis et Europe du nord principalement) que dans les pays en voie de développement (Rochefort & Rouesse, 2008). Les taux d'incidence les plus élevés (85/100 000) sont observés aux États-Unis et au Canada, les plus bas au Japon (16/100 000) (Brettes *et al.*, 2007). Selon ces mêmes auteurs les taux les plus élevés en matière de mortalité sont observés dans les îles britanniques (30/100 000), ceux des États-Unis, de la France, de l'Italie et de la Suède étant les plus bas (20/100 000). Il est au 2^e rang des cancers féminins en Afrique Sub-saharienne après celui du cancer du col de l'utérus (Ly *et al.*, 2011).

Au Sénégal, le cancer du sein occupe la deuxième place des cancers féminins (GLOBOCAN, 2018). Selon l'Agence internationale de recherche sur le cancer (CIRC), en 2018 il y a 1758 nouveaux cas dont 1494 ont un âge < 65 ans et 264 ont un âge ≥ 65 ans avec une pointe de l'ordre de 834 décès, dont 684 ont un âge < 65 ans et 150 ont un âge ≥ 65 ans. C'est ainsi que le cancer du sein vient en troisième position de cause de mortalité après les autres types de cancers comme celui du foie et du col de l'utérus (GLOBOCAN, 2018). Malgré leur fréquence, peu de données sur les tumeurs bénignes du sein en Afrique sont disponibles dans la littérature. Au Sénégal des études épidémiologiques faites sur les tumeurs bénignes sont rares, mais selon Gueye *et al.* (2017), 220 patientes présentaient une tumeur bénigne parmi 984 patientes, soit une fréquence de 22,5%, et concernent une population relativement jeune avec un âge moyen de 24 ans avec des extrêmes de 12 et 67 ans.

Les cellules du sein subissent parfois des changements qui rendent leur mode de croissance ou leur comportement anormal (Desjardins, 2010). Ces changements peuvent engendrer des affections bénignes du sein, comme l'hyperplasie atypique ou des kystes du sein ou, plus rarement, des modifications des cellules mammaires à l'origine d'un cancer du sein. Il existe deux types de tumeurs : les bénignes et les malignes. Dans le premier cas, la tumeur est noyée dans du tissu conjonctif. Cette encapsulation permet de ralentir considérablement la croissance des néoplasmes, rendant ces derniers moins dangereux. Les grains de beauté et les verrues sont des exemples de ce type tumoral qui est facilement éliminable par intervention

chirurgicale. Dans le deuxième cas, les tumeurs malignes sont constituées de néoplasmes acapsulés. La masse tumorale peut alors croître de manière illimitée ce qui facilite leur infiltration tissulaire ainsi que l'envahissement d'autres organes. A l'inverse des tumeurs bénignes, les malignes peuvent s'avérer mortelles (Voet, 2002). De nombreuses femmes souffrent au cours de leur vie de pathologies mammaires non cancéreuses mais dont le développement de certaines d'entre elles constitue un facteur de risque au cancer du sein (Desjardins, 2010).

Il n'est pas connu d'étiologie aux tumeurs bénignes du sein (Thiam, 2002). Cependant aux tumeurs malignes du sein, quelques facteurs de risque lui soient attribués. De nos jours, plusieurs facteurs de risque de développement du cancer du sein sont reconnus, tels que les antécédents familiaux de cancer du sein, l'âge avancé, la puberté précoce, la ménopause tardive, la nulliparité et l'obésité. Mais, aucun facteur n'a pu être impliqué directement dans l'étiopathogénie de ce cancer, à l'exception de la transmission héréditaire de certains gènes de prédisposition, en particulier les gènes *BRCA1* et *BRCA2*, impliqués dans 5-10% des cas de cancer du sein (Dumitrescu *et al.*, 2005). La mitochondrie a depuis longtemps été suspectée de jouer un rôle important dans le développement et la progression des cancers. De nombreuses altérations mitochondriales associées aux cancers ont été identifiées et décrites dans la littérature (Ha *et al.*, 2002). Ces altérations incluent des modifications d'expression des gènes mitochondriaux, des anomalies mitochondriales structurales, quantitatives ou des anomalies des composants enzymatiques de la chaîne respiratoire (Dimauro & Schon 2001). Aussi, des mutations somatiques mitochondriales acquises ont été découvertes dans des pathologies cancéreuses. Dans un cancer colorectal, Polyak *et al.* (2012) ont trouvé 3 mutations somatiques dans le génome mitochondrial, deux se sont produits dans le *MT-CYB*. Des mutations de l'ADNmt provoquant un dysfonctionnement mitochondrial peuvent être à l'origine de la tumorigénèse. Des mutations somatiques de l'ADNmt ont été rapportées dans divers types de tumeurs, notamment les cancers du sein. Ces mutations comprennent des mutations ponctuelles, des délétions et des insertions (Parrella *et al.*, 2003).

L'étude de cette région génomique du *MT-CYB* nécessite donc une approche ciblée plutôt que pangénomique, que ce soit par génotypage, ou par séquençage. De plus, la mitochondrie est une structure indispensable au fonctionnement de nos cellules, et assume des fonctions métaboliques essentielles. L'ensemble de ces considérations justifient l'étude de la variabilité de son génome dans le contexte du cancer, et dans notre cas dans le cadre du cancer du sein.

Néanmoins, certains facteurs étiologiques sont de plus en plus soupçonnés de contribuer au développement du cancer du sein et les oncogènes restent à l'heure actuelle la catégorie de gènes associés aux cancers les plus étudiés, à l'exemple du gène *BRAF*. La substitution *BRAF* V600E compte pour 80 % des mutations ; elle serait impliquée dans 66% des mélanomes malins (Rajagopalan *et al.*, 2002), et elle est impliquée aussi dans plusieurs autres cancers (Wang *et al.*, 2015). La plupart de ces mutations se trouvaient dans l'exon 15 de ces tumeurs, et la mutation V600E était la plus fréquente (initialement décrite comme V599E) (Kimura *et al.*, 2003).

Des approches génomiques sont ainsi nécessaires pour la caractérisation de nouveaux marqueurs moléculaires qui permettraient une meilleure compréhension des mécanismes biologiques du développement tumoral et aideraient à développer de nouveaux outils de diagnostic et de pronostic. Actuellement, la prescription des thérapies ciblées est guidée, dans la mesure du possible, par les caractéristiques moléculaires de la tumeur de chaque patient. Les mécanismes de l'oncogenèse mammaire ne sont pas totalement connus et il est donc important de les étudier afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouveaux biomarqueurs pronostics ou prédictifs. Ainsi pour mieux comprendre l'impact de la variabilité nucléotidique et l'instabilité génétique des tumeurs bénignes et des tumeurs malignes du sein nous allons utiliser deux marqueurs de nature différente; à savoir *MT-CYB* qui est un gène mitochondriale et *BRAF* qui est un gène nucléaire, afin de mieux comprendre et d'acquérir des informations nécessaires pour bien étudier cette maladie, devenue à l'heure actuelle un problème majeur de santé publique particulièrement chez les femmes sénégalaises (OMS, 2012). C'est dans ce cadre, que s'inscrit notre projet de recherche qui a eu pour objectif générale de connaître le degré d'implication des mutations du gène mitochondriale *MT-CYB* et de l'oncogène *BRAF* dans la carcinogenèse mammaire. Cet objectif général est décliné en quatre objectifs spécifiques :

- ❖ Évaluer le polymorphisme, la diversité génétique du gène *MT-CYB* et de l'exon 15 du gène *BRAF* et analyser les caractéristiques des mutations de l'exon 15 du gène *BRAF*.
- ❖ Déterminer la différenciation génétique du gène *MT-CYB* et de l'exon 15 du gène *BRAF* en fonction de la nature tumorale.
- ❖ Déterminer l'évolution génétique des mutations du gène *MT-CYB* et de l'exon 15 du gène *BRAF*.

Ce travail est composé de trois chapitres qui permettent de comprendre le cheminement et le déroulement de notre étude :

- ❖ le premier chapitre sera consacré à la revue bibliographique.
- ❖ le deuxième chapitre, évaluation du polymorphisme et de la diversité génétique du *MT-CYB*, dans les tumeurs du sein chez les femmes sénégalaises.
- ❖ Et en fin un troisième chapitre : Implication des mutations de l'exon 15 du gène *BRAF* dans la carcinogenèse mammaire chez les femmes sénégalaises.

Ces trois chapitres seront suivis d'une conclusion générale et des perspectives.

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1 ORIGINE DES CELLULES CANCÉREUSES

Le cancer est généralement défini comme étant la prolifération anormale et anarchique des cellules qui se regroupent de manière inorganisée pour former une tumeur (Bertram, 2001). La transformation d'une cellule normale en cellule maligne repose sur les mutations séquentielles de l'ADN et cette transformation est caractérisée par plusieurs étapes (figure 1), parmi lesquelles :

- ✓ **l'initiation et la promotion** sont les deux étapes clés avant la progression tumorale. Elles permettent le passage de la cellule saine à une cellule cancéreuse qui évoluera par la suite en tumeur. L'initiation est due à l'altération du génome rendant les cellules capables de se diviser en l'absence d'une stimulation venue du tissu. Ces altérations de l'ADN peuvent être causées par un génotoxique d'origine endogène ou encore exogène (Bont & Larebeke, 2004).

Certaines Espèces Réactives de l'Oxygène qui se forment lors du métabolisme sont des agents d'oxydation (Monier & Tubiana, 2008). Ils attaquent les constituants cellulaires (Spitz *et al.*, 2004) et provoquent chaque jour dans chaque cellule de très nombreuses lésions de l'ADN dont quelques une très graves telles que des cassures double-brins ou des pontages intra- ou interbrins (Burkart *et al.*, 2005). Les génotoxiques exogènes tels que les UV peuvent aussi provoquer ces dégradations. Une stimulation de la prolifération peut entraîner un accroissement de la fréquence des mutations (Moore & Tsuda, 1998). Des erreurs peuvent survenir pendant la réplication de l'ADN. L'initiation est un événement relativement fréquent contre lequel existent des protections cellulaires multiples et puissantes. L'efficacité de ces défenses est un facteur essentiel. Quand le nombre de lésions est faible, des mécanismes de réparation de l'ADN se mettent en place. Des exonucléases et endonucléases vont couper l'ADN muté, ensuite l'ADN polymérase et l'ADN ligase vont se charger de resynthétiser la zone éliminée. Quand le nombre de lésions est trop important, ces systèmes enzymatiques de réparation de l'ADN (Dikomey & Brammer, 2000) ne peuvent pas fonctionner correctement. Ceci se produit lorsque le génotoxique est présent de manière répétée et à forte concentration. Tant que fonctionnent les mécanismes de régulation de l'homéostasie cellulaire, ces cellules initiées (possédant de l'ADN muté) peuvent encore rester sous contrôle. En effet cet équilibre cellulaire dynamique assure l'intégrité de la cellule en compensant les dysfonctionnements liés aux mutations. Lorsque cet équilibre est rompu, la cellule peut rentrer dans une phase de mort cellulaire programmée (apoptose) ou bien poursuivre son évolution (Bertram, 2001).

- ✓ **la promotion** : celle-ci est liée à l'induction d'une prolifération cellulaire qui provoque l'expansion clonale de la cellule initiée, soit que ce clone soit plus sensible que les cellules saines aux facteurs de croissance présents, soit que l'apoptose y soit diminuée. La plupart des agents de promotion stimulent la prolifération, mais souvent de façon temporaire ou réversible. L'irritation mécanique prolongée et l'inflammation (Coussens & Werb, 2002) sont des promoteurs puissants. Les génotoxiques, à côté de leur effet mutagène, peuvent constituer des agents de promotion car, administrés en quantité importante, ils provoquent des lésions irréversibles conduisant à la mort d'une proportion élevée de cellules (Takahashi *et al.*, 2000). L'intensité des événements dépend de la dose des agents de promotion, car ces derniers fonctionnent par effet seuil. Les lésions causées peuvent être réversibles quand l'exposition est faible. Par contre la présence chronique ou itérative de l'agent promoteur pendant cette phase peut conduire à des lésions précancéreuses qui persistent ou continuent à croître malgré l'interruption de l'exposition (Takahashi *et al.*, 2000). Elle devient autonome. La deuxième phase de la cancérogenèse est accomplie. Celle-ci se termine quand un clone de cellules initiées est devenu capable d'échapper au contrôle tissulaire pour entrer dans la troisième phase, la progression tumorale.
- ✓ **la progression tumorale** : développement de la tumeur primaire. Les deux premières étapes (initiation et promotion) concernent la cancérogenèse, c'est à dire l'apparition de la malignité au sein même de la cellule. L'accumulation des lésions de l'ADN conduisent à une instabilité génétique des cellules cancéreuses qui permet la génération et la survie de cellules mutantes présentant des avantages sélectifs de prolifération et d'immortalité. A partir de ces deux premières étapes, sept étapes peuvent être distinguées dans le processus tumoral : la perte d'adhérence, l'invasion, la prolifération, l'angiogenèse, l'intravasation, l'extravasation et l'émission de métastases à partir de la tumeur primaire (Yang & Weinberg, 2008).

En effet, les cellules tumorales sont caractérisées par leurs nombreuses mutations qui sont transmises à la descendance lors de la prolifération exponentielle de la cellule parentale (Bertram, 2001). Un phénotype tumoral est alors acquis lorsque l'ADN subit de nombreuses mutations, surtout au niveau des gènes qui régulent la prolifération et la survie cellulaire, c'est-à-dire les gènes suppresseurs de tumeurs et les proto-oncogènes (Lewin, 2004). En effet, suite à l'agression de facteurs de l'environnement tels que le tabac, les rayons ionisants, certains agents chimiques ou physiques (Hall & Angele, 1999), le génome humain subit constamment des lésions qui sont réparées ou non. En effet, les systèmes de réparation sont

parfois défectueux ou "débordés", la cellule conserve alors certaines altérations qui touchent parfois les systèmes de régulation de la prolifération. Ne répondant plus correctement aux signaux environnants, elle échappe à toute régulation. La cellule s'engage alors dans un processus anarchique qui conduit, par accumulation successive d'anomalies génétiques, au développement d'une cellule cancéreuse (Frosina, 2000).

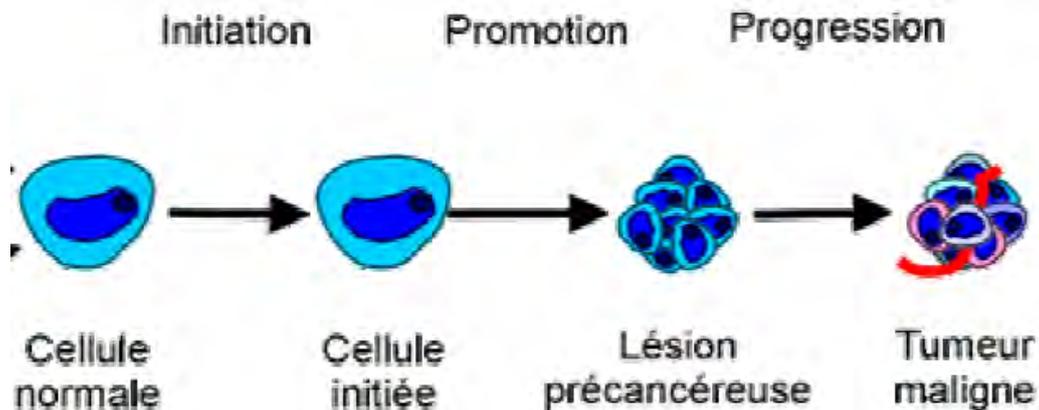


Figure 1 : développement d'une tumeur maligne (Le Berre, 2005)

I.2 DIFFÉRENTS TYPES DE CANCERS

Selon le type de cellule devenue cancéreuse on distingue trois catégories de cancers :

- ✓ **les carcinomes** qui se développent à partir des cellules épithéliales (cellules de la peau, des muqueuses, ou encore des glandes dans le cas de l'adénocarcinome).
- ✓ **les sarcomes**, beaucoup plus rares, et qui se développent à partir de tissu conjonctif (tissu de soutien).
- ✓ **les hématosarcomes** qui se développent dans les cellules sanguines (leucémies, myélomes et lymphomes).

I.3 CARACTERISTIQUES SPECIFIQUES DES CANCERS

Le cancer est un processus clonal multiétapes, ces étapes étant des altérations génétiques ou mutations. Au moins trois catégories de gènes sont impliquées. Ils interviennent dans le contrôle de la division, de la différenciation cellulaire, de l'apoptose et de la réparation de l'ADN (Weinberg, 2007). Les gènes associés au cancer ont été classés en trois catégories sur la base de leurs caractères cancérogènes ou protecteurs :

- ✓ **oncogènes** : les oncogènes sont des gènes susceptibles de conférer le phénotype tumoral à une cellule eucaryote normale (Futreal *et al.*, 2004). Ils sont dérivés de

gènes cellulaires appelés proto oncogènes ayant subi une ou plusieurs altérations. Les proto-oncogènes possèdent généralement des fonctions dans le contrôle de la prolifération cellulaire, de la différenciation et de la survie cellulaire (Jean-Marie, 2003). L'activation des proto-oncogènes en oncogènes se fait par des événements génétiques telles que des mutations, des translocations chromosomiques ou des amplifications géniques qui induisent des gains de fonction du gène par rapport à sa forme inactive dans les cellules normales. Le gain de fonction résulte en général d'une production d'une forme hyperactive de la protéine oncogénique (forme plus active du fait de la modification du site catalytique par exemple ou protéine bloquée en forme active et qui ne peut plus être inhibée) ou d'une quantité excessive de forme normale de la protéine (Theleyre & Baklouti, 2004).

La dénomination de proto-oncogènes regroupe des gènes qui codent pour des facteurs de croissance, des récepteurs aux facteurs de croissance, des molécules intervenant dans la transduction des signaux mitotiques, des protéines kinases, des phosphatases, des molécules anti-apoptotiques ou des facteurs de transcription (Singer *et al.*, 2003). L'activation de ces oncogènes est un mécanisme dominant qui conduit à favoriser un état permissif pour la prolifération, à permettre la production par la cellule cancéreuse des facteurs de croissance dont elle a besoin ou à modifier un récepteur de telle sorte qu'il se comporte comme s'il était stimulé en permanence. Dans les deux cas, la cellule devient indépendante d'une intervention externe.

L'expression des oncogènes favorise la survenue de cancers (Jean-Marie, 2003). Ces gènes commandent la synthèse de protéines (oncoprotéines) en stimulant la division et en déclenchant une prolifération désordonnée des cellules. Plusieurs dizaines d'oncogènes ont été décrits. Le gène *BRAF* dont la substitution V600E compte pour 80 % des mutations, serait impliquée dans 66 % des mélanomes malins (Rajagopalan *et al.*, 2002). Il est impliqué aussi dans plusieurs autres cancers dont le cancer du sein (Wang *et al.*, 2015). Des oncogènes tels que *myc* et surtout *HER2/neu/ErbB2* sont amplifiés et surexprimés dans le cancer du sein. En effet, 13 à 22% des tumeurs mammaires présentent une amplification de *myc* (Aulmann *et al.*, 2006); 22 à 33% des tumeurs surexpriment *c-myc* au niveau ARNm et 40 à 45% au niveau protéique selon Naidu *et al.*, (2002). L'amplification et la surexpression de *HER2* sont quant à elles observées dans 15% des tumeurs primitives du sein (Weigel & Dowsett, 2010).

Lors de la réplication de l'ADN, l'ADN polymérase δ connaît un taux d'erreur d'environ une base sur un milliard, ce qui expliquerait l'apparition de mutations sur

les oncogènes ou sur les gènes suppresseurs de tumeur des organismes à vie longue. Les altérations affectant directement les bases peuvent également conduire à l'apparition de mutation. Elles sont notamment causées par les radicaux libres de l'oxygène, eux-mêmes générés par l'activité métabolique de la cellule ou par des agents physiques comme les radiations (Sarasin *et al.*, 1988).

Un proto-oncogène peut être activé par différents moyens, il peut être muté sur sa séquence codante ou sur son promoteur (Murray *et al.*, 1981). Premièrement, une mutation ponctuelle au sein de sa séquence peut engendrer une activation constitutive de la protéine. C'est, par exemple, le cas de la mutation G12V de la protéine Ras (Barbacid, 1987). Une mutation peut également être responsable d'une séquence non-sens comme c'est le cas de la mutation sur le codon 531 de la protéine c-Src. Cette mutation conduit à l'apparition d'une forme tronquée de c-Src et provoque une activation constitutive de la protéine (Irby *et al.*, 1999).

- ✓ **gènes suppresseurs de tumeurs** : un gène suppresseur de tumeur est un gène dont l'altération durant la carcinogénèse résulte de la perte de fonction essentielle pour le contrôle de la prolifération cellulaire normale. Cette perte de fonction est un mécanisme récessif, c'est à dire que les deux allèles du gène doivent être inactivés. L'inactivation de ces gènes peut être due à la perte des allèles du gène, à des petites délétions ou insertions qui altèrent la trame de lecture du gène, à des mutations ponctuelles changeant les acides aminés cruciaux pour l'activité de la protéine ou à la baisse de la transcription par l'altération du promoteur. Récemment, les gènes suppresseurs de tumeur ont été classés selon leurs fonctions : les « gatekeepers », intervenant dans le contrôle du déroulement du cycle cellulaire, et les « caretakers » qui interviennent pour maintenir l'intégrité du cycle cellulaire. L'inactivation des caretakers n'augmente pas la prolifération cellulaire mais initie l'acquisition de changements génétiques supplémentaires (Orban & Olah, 2003). *BRCA1* et *BRCA2* constituent un modèle de gènes suppresseurs de tumeur. Ils sont exprimés d'une manière ubiquitaire. Leurs caractéristiques : transmission autosomique dominante, perte de l'hétérozygotie au niveau du locus du gène retrouvé dans les tumeurs héréditaires, avec conservation de l'allèle prédisposant au cancer.

Les gènes suppresseurs de tumeurs agissent en sens inverse des oncogènes. Ce sont des régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire. Leur inactivation n'empêchant plus la prolifération cellulaire, favorise donc la survenue des cancers. Certains gènes suppresseurs de tumeurs sont spécifiques de certains cancers. Ainsi le gène *RBI* est

impliqué dans le développement du rétinoblastome. Les gènes *BRCA1* et *BRCA2* sont impliqués dans les cancers du sein (Hall *et al.*, 1990), *APC* dans les cancers du colon (Nishisho *et al.*, 1991). D'autres ont un spectre d'inactivation plus large comme *TP53* ou *CDKN2A* qui sont inactivés dans un grand nombre de types de cancer (Caldas *et al.*, 1994). A ces deux catégories de gènes, s'ajoute une troisième classe nommée gènes de réparation de l'ADN.

- ✓ **gènes de réparation de l'ADN :** L'ADN est continuellement soumis aux activités métaboliques intrinsèques à la cellule et à des facteurs environnementaux externes qui portent atteinte à son intégrité. Les facteurs environnementaux peuvent être de nature physique (exemple : rayonnements), chimique (exemple : radicaux libres, médicaments) ou biologique (exemple : toxines, virus). On estime entre mille et plus d'un million le nombre de lésions par cellule et par jour (Ames *et al.*, 1993). Beaucoup de ces lésions provoquent des dommages tels que la cellule elle-même ne peut se reproduire ou donne naissance à des cellules-filles non viables. Les gènes de réparation de l'ADN sont capables de détecter et de réparer les lésions de l'ADN et prévenir cet état anormal. Les mécanismes de réparation de l'ADN garantissent la stabilité du génome. La capacité de réparation de l'ADN d'une cellule est essentielle à l'intégrité de son génome, et donc à son fonctionnement normal et à celui de l'organisme. Contrairement aux altérations des proto-oncogènes et des gènes suppresseurs, les altérations des gènes de réparation de l'ADN, qu'il s'agisse du système de réparation des mésappariements ou du système excision-resynthèse, n'interviendront qu'indirectement dans la cancérogenèse en permettant la persistance d'altérations touchant des gènes contrôlant le cycle cellulaire ou l'apoptose.

De nombreux systèmes de réparation protègent les cellules contre l'accumulation délétère de lésions sur leur ADN, par des voies biochimiques assez bien conservées des bactéries à l'homme. Le système de réparation par excision-resynthèse de nucléotides est le plus important et le plus efficace pour éliminer la grande majorité des lésions de l'ADN. Les lésions produites, par les rayons ultraviolets par la plupart des cancérogènes chimiques, sont éliminées avec une très grande efficacité par le système de réparation par excision (Sarasin *et al.*, 1988). Ces réparations jouent un rôle fondamental du fait que les lésions de l'ADN entraînent une désorganisation complète de l'activité cellulaire : blocage de la transcription des gènes actifs, blocage de la réplication de l'ADN ou synthèse translésionnelle conduisant inévitablement à l'induction de mutations ou de remaniements chromosomiques. Il apparaît donc

évident que l'absence de réparation peut conduire à une modification irréversible de la régulation de la prolifération cellulaire et initier un mécanisme de cancérogenèse. Cette hypothèse est fortement confortée par l'existence de maladies de la réparation de l'ADN qui montrent souvent une corrélation étroite entre sensibilité à un agent génotoxique et forte incidence de cancers plus ou moins spécifiques (Hanawalt & Sarasin A. 1986). Lorsque les mutations de l'ADN résultent d'erreurs de la réplication (dérageage de l'ADN polymérase), le système de réparation mis en jeu est celui des mésappariements (mismatch repair) (Peltomäki & de la Chapelle, 1997).

I.4 CANCER DU SEIN

I.4.1 Définition

La notion de « cancer du sein » relève d'une nomenclature générique qui fait référence à tout un ensemble de proliférations néoplasiques de la glande mammaire qui diffèrent tant du point de vue histologique qu'en ce qui concerne leur comportement évolutif. Le terme de « cancer du sein » ne désigne que les tumeurs malignes, potentiellement agressives du sein (Hachana, 2009), tandis que le terme de « tumeur du sein » désigne à la fois les tumeurs malignes et bénignes. Il existe deux types de tumeurs : les bénignes et les malignes. Dans le premier cas, la tumeur est noyée dans du tissu conjonctif. Cette encapsulation permet de ralentir considérablement la croissance des néoplasmes, rendant ces derniers moins dangereux. Les grains de beauté et les verrues sont des exemples de ce type tumoral qui est facilement éliminable par intervention chirurgicale. Dans le deuxième cas, les tumeurs malignes sont constituées de néoplasmes encapsulés. La masse tumorale peut alors croître de manière illimitée ce qui facilite leur infiltration tissulaire ainsi que l'envahissement d'autres organes. A l'inverse des tumeurs bénignes, les malignes peuvent s'avérer mortelles (Voet, 2002).

I.4.2 Développement

I.4.2.1 Architecture et développement du sein

Le sein est une glande exocrine qui se compose d'une masse de tissu, d'une aréole et d'un mamelon (Figure 2). La glande mammaire est constituée de 2 compartiments cellulaires : le compartiment mésenchymateux, perfusé par les vaisseaux sanguins et les nerfs, et le compartiment épithélial qui s'articule autour d'un réseau de canaux galactophores et de lobules renfermant les alvéoles. Ces deux compartiments sont séparés par une membrane basale de collagène de type IV, de laminine et de glycosaminoglycanes mais une coopération permanente existe entre eux au cours du développement de la glande mammaire.

Les vaisseaux sanguins et lymphatiques circulent dans les tissus conjonctifs et adipeux. Le drainage par les vaisseaux lymphatiques s'effectue vers la chaîne mammaire interne, les ganglions axillaires et sus-claviculaires.

L'architecture de la glande mammaire évolue tout au long de la vie, en fonction de l'âge et du stade de la vie reproductive (McNally & Martin, 2011) (Figure 3) et se construit sous l'influence des hormones sexuelles d'origine ovarienne (oestrogènes et progestérones) et d'un certain nombre de facteurs de croissance.

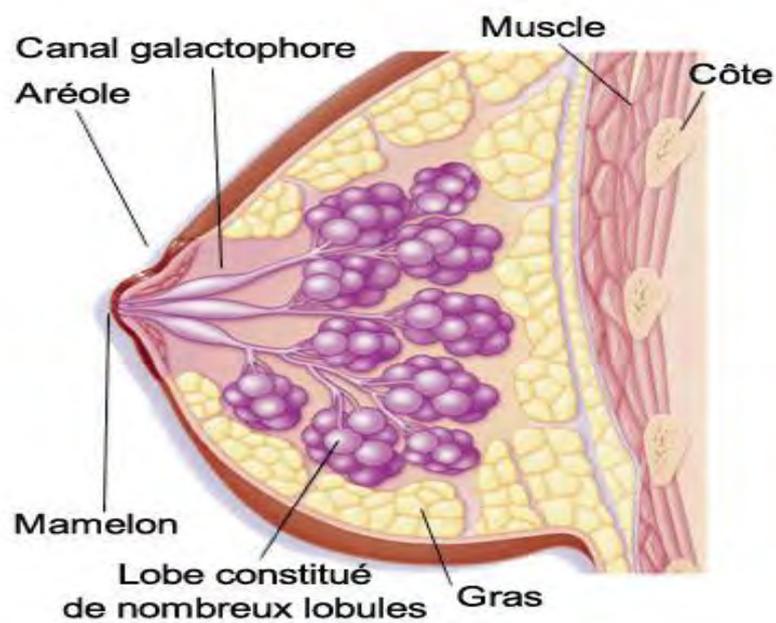


Figure 2 : Représentation schématique d'un sein en coupe (Mombelli, 2014)

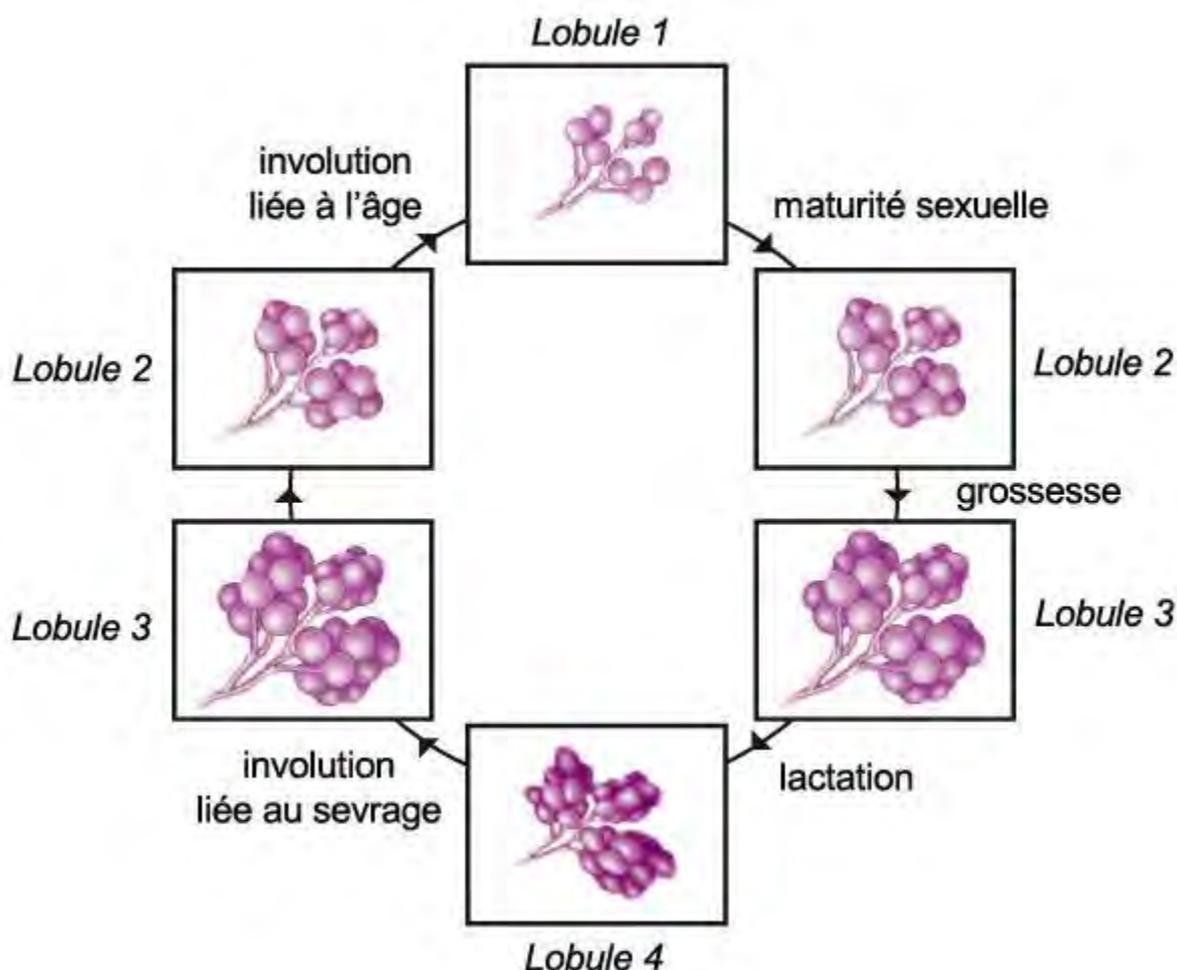


Figure 3 : Évolution de l'architecture de la glande mammaire (Mombelli, 2014)

I.4.3 Incidence et mortalité

Depuis plusieurs années, le cancer du sein est devenu un problème majeur de santé publique dans les pays industrialisés, nécessitant la mise en place d'actions de prévention, de dépistage et de recherche de nouvelles thérapies. À l'échelle mondiale la prévalence du cancer du sein est de 6,3 millions de femmes vivant avec un cancer du sein diagnostiqué au cours des cinq années précédentes (OMS, 2012). L'incidence du cancer du sein est quatre à dix fois plus élevée dans les pays occidentaux (États-Unis et Europe du nord principalement) que dans les pays en voie de développement (Rocheffort & Rouesse, 2008). Les taux d'incidence les plus élevés (85/100 000) sont observés aux États-Unis et au Canada, les plus bas au Japon (16/100 000). Les taux les plus élevés en matière de mortalité sont observés dans les îles britanniques (30/100 000), ceux des États-Unis, de la France, de l'Italie et de la Suède étant les plus bas (20/100 000) (Brettes *et al.*, 2007). Le cancer du sein est le deuxième cancer le plus fréquent en termes d'incidence et de mortalité chez la femme africaine (Ferlay *et al.*, 2008). En 2008, l'incidence du cancer du sein était de 21,3/100.000 et la mortalité causée par le cancer du sein

était de 16,4/100.000, en Afrique (Ferlay *et al.*, 2008). Ces données soulignent l'incidence élevée de ce cancer en occident. Ceci pourrait être dû à la sensibilisation de plus en plus importante et une prise de conscience de la gravité du fléau d'une part et à l'utilisation accrue de la mammographie, du traitement hormonal substitutif, une prévalence augmentée de l'obésité, la consommation accrue d'alcool, la puberté précoce et la maternité tardive ou la nulliparité.

Même si nos données restent inférieures aux données occidentales en termes de chiffres, elles n'en sont pas moins graves et concordent avec les données épidémiologiques du monde arabe. Par exemple, à Sétif - Algérie, où il représente 33% des cancers chez la femme et se plaçant par conséquent en tête, avec une moyenne annuelle de 179 nouveaux cas (Hamdi-Cherif *et al.*, 2014). Quant à Sfax (Registre Sud Tunisie), il y représente, avec 305 nouveaux cas en 2 ans, 25,2% de l'ensemble des cancers féminins (Sellami *et al.*, 2007). On constate que les taux d'incidence demeurent élevés dans les régions les plus développées, mais la mortalité est beaucoup plus élevée relativement dans les pays pauvres, faute de détection précoce et d'accès aux traitements.

Au Sénégal, selon l'Agence internationale de recherche sur le cancer (CIRC), en 2018 il y a 1758 nouveaux cas dont 1494 ont un âge < 65 ans et 264 ont un âge ≥ 65 ans avec une pointe de l'ordre de 834 décès, dont 684 ont un âge < 65 ans et 150 ont un âge ≥ 65 ans. C'est ainsi que le cancer du sein vient en troisième position de cause de mortalité après les autres types de cancers comme celui du foie et du col de l'utérus (GLOBOCAN, 2018). Nous soulignons que l'incidence du cancer du sein a augmenté au fil des années et tant à occuper la première place des cancers féminins. Et pour les tumeurs du sein à caractères bénignes, plus d'un million de cas surviennent chaque année dans le monde, malgré les jeunes sont plus fortement exposés (OMS, 2012). Les tumeurs bénignes sont assez fréquentes avec un taux variant de 39,56% à 70 % (Dangou *et al.*, 2002). Le motif de consultation le plus fréquemment rencontré est la présence d'une masse dans le sein (Diarra, 2002). Celle-ci augmente progressivement de volume et atteindre un diamètre suffisamment grand soit 10 cm voire plus, ce qui devient gênant et inesthétique ou peut aussi rester relativement petite. De pronostic meilleur que celui des tumeurs malignes, quelques auteurs cependant notent la possibilité d'évolution de certaines tumeurs bénignes histologiquement diagnostiquées vers de véritables cancers (Hendrick, 1987). Malgré leur fréquence, peu de données sur les tumeurs bénignes du sein en Afrique sont disponibles dans la littérature. Au Sénégal des études épidémiologiques faites sur les tumeurs bénignes sont rares, mais selon Gueye *et al* (2017) à l'unité de sénologie du centre hospitalier universitaire Aristide Le Dantec

de Dakar durant la période allant du 1^{er} janvier 2008 au 31 décembre 2013, durant cette période, 220 patientes présentaient une tumeur bénigne parmi 984 patientes, soit une fréquence de 22,5%, et concernent une population relativement jeune avec un âge moyen de 24 ans avec des extrêmes de 12 et 67 ans.

I.4.4 Histogénèse

La carcinogénèse mammaire est un phénomène complexe et multifactoriel dans les formes héréditaires comme dans les formes sporadiques. Le cancer est une maladie de la cellule. Il touche le matériel génétique du noyau et induit des troubles de la division et de la différenciation terminale des cellules. En effet, il naît à partir de l'épithélium du canal galactophore terminal précédant le lobule ou l'unité terminale ducto-lobulaire (UTDL).

Avant l'émergence clinique du cancer plusieurs étapes se déroulent ; allant de l'exposition aux carcinogènes (phase d'initiation), la promotion d'un clone transformé (phase de promotion) à l'indépendance de ce clone vis-à-vis des facteurs de régulation physiologiques avec acquisition de nouvelles propriétés (pouvoir d'invasion et pouvoir métastatique).

Comme nous le savons tous, les cellules de l'organisme sont programmées à se multiplier, à croître, à se différencier, puis à mourir en réponse à un système complexe de signaux régis par le cycle cellulaire. Mais lors de la cancérogenèse, il y a rupture des contraintes normales de la croissance cellulaire, aboutissant à la prolifération anormale et anarchique d'un clone cellulaire particulier. De ce fait, les cellules de ce clone vont présenter des caractéristiques de croissance et de morphologie complètement différentes de celles des cellules normales : une autonomie vis à vis des facteurs régulant le cycle cellulaire (indépendance de facteurs de croissance cellulaires, insensibilité aux inhibiteurs de croissance), un échappement à l'apoptose, un pouvoir réplicatif illimité, une activation de l'angiogénèse, un pouvoir métastatique (capacité de migrer et d'envahir différents tissus) et une instabilité génétique (Fitzgibbons *et al.*, 1998). C'est l'interaction entre ces différentes caractéristiques selon une chaîne d'évènements coordonnés qui entraîne la progression du cancer. Les changements phénotypiques sont le reflet de l'accumulation d'altérations génétiques multiples. Les événements génétiques et épigénétiques durant ce processus multi-étapes touchent une multitude de gènes, dont les gènes suppresseurs de tumeur.

La combinaison de l'activation des oncogènes et de l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur concourent à la progression tumorale. Les changements au niveau de ces gènes sont initiés soit par des facteurs environnementaux ou physiologiques (carcinogènes chimiques, radiation, virus, grossesse.....), soit par des facteurs génétiques (mutations germinales) (Chaffer & Weinberg 2015).

La mise en évidence d'une prédisposition au cancer n'est pas toujours aisée. Une fréquence élevée de cancers du sein dans une même famille suggère une éventuelle prédisposition, due vraisemblablement à l'altération d'un gène majeur, et cela d'autant plus si le type de cancer est rare ou si les tumeurs surviennent à un âge précoce.

La multiplication des cellules entraîne un passage du stade d'hyperplasie simple à celui d'hyperplasie atypique, puis de carcinome in situ. Au stade de carcinome intracanalair, les cellules acquièrent un caractère malin sans pour autant franchir la membrane basale. Enfin l'évolution se fait vers le stade de carcinome invasif par rupture de la membrane basale et invasion du tissu conjonctif sous jacent ce qui rend possible la dissémination métastatique (Mac-Grogan, 2003).

I.4.5 Facteurs de risque

Il n'existerait pas de facteur unique responsable de l'apparition d'un cancer du sein. En réalité, plusieurs facteurs de risque susceptibles d'augmenter le développement de ce type de cancer ont été mis en évidence :

- ✓ **sexe** : le cancer du sein présente une prédominance féminine. Il touche donc essentiellement les femmes. En effet, seulement 1% d'hommes sont concernés (Diallo, 2006).
- ✓ **Age** : la probabilité de développer un cancer du sein augmente avec l'âge. Le jeune âge (inférieur à 35 ans) est un facteur de mauvais pronostic indépendant car la majorité des patientes présentent des tumeurs triples négatives et ne peuvent donc bénéficier d'aucune thérapie ciblée. En effet, une étude de Canello et son équipe (2010) effectuée sur 2970 patientes montre que celles âgées de moins de 35 ans présentaient plutôt des tumeurs triples négatives. Cependant, le cancer du sein est très rare avant 30 ans (Rambau *et al.*, 2011).
- ✓ **prédisposition génétique** : seul 5 à 10% des cancers du sein sont d'origine génétique (Claus, 1991). Plusieurs gènes impliqués dans la carcinogenèse mammaire héréditaire ont été identifiés. Les principaux sont *BRCA1*, *BRCA2*, *p53*, *PTEN* et ataxia-telangiectasia (*AT*). La grande majorité des cancers du sein héréditaires peut être attribués aux gènes *BRCA1* et *BRCA2* (Dumitrescu *et al.*, 2005). *BRCA1* est localisé sur le chromosome 17 et code une protéine nucléaire impliquée notamment dans le contrôle de la recombinaison mitotique, dans la ségrégation des chromosomes, la régulation transcriptionnelle ainsi que dans la réparation de l'ADN. *BRCA2* est localisé sur le chromosome 13 et code une histone acétyl transférase impliquée dans la régulation de la transcription avec une fonction suppresseur de tumeur. Elle est impliquée dans la réparation de l'ADN et

interagit avec *BRCA1* dans les voies d'activation de la protéine *p53*. Les femmes portant des mutations de type délétion au niveau de *BRCA1* ou *BRCA2*, présentent un risque considérable de développer un cancer du sein (80%) (Veronica *et al.*, 2016). Le gène *p53* localisé sur le chromosome 17 est un des gènes les plus communément mutés dans les cancers humains (environ 50% des cancers). Les femmes affectées par une mutation de *p53* présentent un risque plus élevé de développer un cancer du sein avant l'âge de 45 ans (Daguet *et al.*, 2008). Enfin, les mutations des gènes *PTEN* et *AT*, observées chez des patientes atteintes respectivement du syndrome de Cowden et de l'ataxie télangiectasie, augmentent de 25 à 50% le risque de cancérogenèse mammaire (Desjardins, 2010).

- ✓ **facteurs environnementaux** : correspondent à toutes les expositions environnementales auxquelles un organisme est soumis. Cela va du tabac aux ultraviolets du soleil en passant par l'amiante, les radiations gamma, l'alcool, la pollution, l'alimentation et de nombreuses autres substances auxquelles un individu est exposé volontairement ou involontairement.

Exemple :

- le rôle des facteurs alimentaires avec excès de graisse animale, souvent source d'obésité, est discuté et expliquerait l'incidence croisée avec le cancer de l'endomètre. L'obésité après 50 ans augmente le risque de cancer du sein d'environ 20% (Kelsey *et al.*, 1996).
- le rôle de l'irradiation a été prouvé par les explosions atomiques d'Hiroshima, ainsi que les expositions professionnelles aux polluants environnementaux et les agents chimiques (Krajinovic *et al.*, 2001).
- le niveau socio-économique : il est mis en évidence par la plupart des études que les femmes qui ont un niveau de vie élevée ont un risque multiplié par 2.
- le tabagisme et la consommation d'alcool augmenterait le risque de 200% (Longneker & Tseng, 1998).
- le facteur viral : de multiples études sont en cours dans ce domaine étant donné qu'une implication virale a déjà été prouvée pour plusieurs tumeurs : les papillomavirus et le cancer du col utérin, le virus d'Epstein-Barr et le lymphome de Burkitt et le cancer du Nasopharynx, le virus de l'hépatite B et le cancer primitif du foie, le virus HTLV1 et certaines leucémies et lymphomes T, le virus HIV et le sarcome de Kaposi (Medina, 1996). En effet, les virus ont la faculté d'intégrer leur génome dans l'ADN des cellules hôtes. Et ils peuvent être impliqués dans cette pathologie, puisqu'ils pourraient générer des mutations

généétiques engendrant le cancer. L'implication du virus MMTV dans le développement du cancer mammaire chez la souris est bien admise (Clarke *et al.*, 1990). En effet, cet agent infectieux se transmet de génération en génération par le lait maternel et peut s'intégrer dans le génome de la cellule perturbant l'activité des proto-oncogènes et accélérant la croissance cellulaire (Clarke *et al.*, 1990). Des séquences d'ADN montrant une homologie avec celles du virus MMTV ont été détectées dans le cancer du sein humain ce qui suggère que ce virus nommé MMTV-like pourrait être la forme humaine du virus de la tumeur (Medina, 1996).

✓ **facteurs hormonaux** : le cancer du sein est une maladie hormono-dépendante (Morgan, 2004). Les hormones sexuelles conditionnent le développement de la glande mammaire. Parmi les hormones, les œstrogènes jouent un rôle de régulation ou de stimulation de la prolifération des cellules cancéreuses du sein. L'exposition totale et cumulative du tissu mammaire aux œstrogènes semble être un des facteurs les plus importants quant au développement d'un cancer du sein (Higginson, 1992). Les trois moments qui ont un impact important sur l'incidence du cancer du sein sont l'âge des premières règles, l'âge de la ménopause et l'âge de la première grossesse menée à terme (Freund *et al.*, 2005). La multiparité, l'âge jeune de la première grossesse menée à terme et l'allaitement lié au nombre de mois et non au nombre d'enfants allaités, semblent constituer des facteurs protecteurs contre la survenue de cette maladie (Freund *et al.*, 2005).

Le rôle de la contraception orale dans la survenue du cancer du sein paraît plus important chez la femme jeune que chez la femme âgée chez qui aucune élévation du risque n'a été rapportée (Bakkali *et al.*, 2003). Reste à signaler que le risque de survenue du cancer mammaire chez les femmes utilisant la contraception orale œstroprogestative est d'autant plus élevé si la femme est porteuse du gène *BRCA1* et *BRCA2* (Kumle *et al.*, 2002).

I.4.6 Statut clinique

Le cancer du sein se définit comme une prolifération maligne de cellules épithéliales bordant les canaux ou les lobules du sein appelés respectivement carcinomes canaux ou lobulaires. S'il y a une effraction de la membrane basale, séparant l'épithélium du tissu conjonctif, ces carcinomes sont dits infiltrants. Dans le cas contraire, ils sont dits carcinomes (*in situ* ou *intra-canaux*). Ils possèdent ou non un potentiel métastatique.

I.4.6.1 Cancers *in situ*

Il y'a deux formes de cancer *in situ* : le carcinome canalaire *in situ* (CCIS) et le carcinome lobulaire *in situ* (CLIS) (OMS, 2003). Il s'agit d'une lésion précancéreuse dont les cellules néoplasiques restent confinées à l'intérieur du galactophore. Il n'y a donc pas d'envahissement du tissu conjonctif (Page *et al.*, 1995).

I.4.6.2 Cancers infiltrants

L'invasion est le principal signe de malignité d'une tumeur : celle-ci déborde son siège d'origine (la forme *in situ*) pour s'étendre dans les tissus voisins et éventuellement à distance (métastase). Ce caractère infiltrant traduit la perte des propriétés habituelles d'une cellule. Les cellules cancéreuses perdent ces propriétés normales pour en acquérir de nouvelles. Elles acquièrent une mobilité qui leur permet de se détacher du canal d'origine et de s'infiltrer dans les tissus voisins (Puddu & Tafforeau, 2005).

I.4.7 Classification

Le cancer du sein, comme nous venons de le voir a plusieurs caractéristiques. L'ensemble de ces caractéristiques peuvent suggérer un traitement plus approprié, ainsi qu'un taux de survie ou une probabilité de rechute associé. Le système de classification tumeur-ganglion-métastase (tumor-node-metastasis) (TNM) est un des plus courants. Il prend en compte la taille de la tumeur, le nombre de ganglions lymphatiques touchés, et la métastase éventuelle.

Ces trois facteurs sont alors combinés pour obtenir 5 stades :

- ✓ **0** : carcinome canalaire *in situ* (les cellules sont localisées dans un canal galactophore et n'ont pas migré à l'extérieur) ou carcinome lobulaire *in situ* (les cellules sont localisées dans la membrane d'un lobule).
- ✓ **I** : la tumeur est inférieure à 2 cm, et le cancer ne s'est pas propagé aux ganglions.
- ✓ **II** : la tumeur fait plus de 2 cm (sans atteinte ganglionnaire), ou moins de 5 centimètres et le cancer s'est propagé à 1, 2 ou 3 ganglions.
- ✓ **III** : le cancer s'est propagé aux ganglions lymphatiques, et peut-être aux tissus voisins du muscle ou de la peau.
- ✓ **IV** : le cancer a produit des métastases dans d'autres parties du corps.

La classification Scarff-Bloom-Richardson (Bloom *et al.*, 1957), étendue par les critères de Nottingham (Elston *et al.*, 1991) se base sur trois critères histologiques :

- ✓ **le degré de différenciation architecturale**

Ce paramètre évalue le pourcentage de conduits formés par la tumeur. Moins il y en a, plus la structure des tissus est désordonnée.

✓ **le nombre de mitoses**

Plus il y a un nombre important de mitoses (signe que les cellules se divisent activement), et plus le cancer est prolifératif.

✓ **l'importance du pléiomorphisme nucléaire**

Ce paramètre détermine si les noyaux des cellules sont uniformes comme ceux des cellules épithéliales, ou s'ils sont plus grands, plus sombres, ou irréguliers (pléomorphe).

Pour chacun de ces critères, un score entre 1 et 3 est attribué. Le score cumulé de ces trois critères permet alors de classer le cancer parmi 3 grades :

- ✓ cancer possédant des cellules bien différenciées, à croissance lente, avec des risques faibles de propagation.
- ✓ grade intermédiaire, où le cancer possède des cellules modérément différenciées.
- ✓ cancer possédant des cellules peu différenciées, d'évolution rapide avec des risques plus élevés de propagation.

I.5 TUMEURS BENIGNES ET MALIGNES

Les tumeurs peuvent être dites bénignes, c'est-à-dire bien encapsulées. Elles ont alors une croissance lente et locale et ne récidivent pas après exérèse. La seconde classe de tumeurs, qualifiées de malignes, sont au contraire mal délimitées et non encapsulées. Ce sont des cellules à croissance rapide qui tendent à infiltrer et détruire les tissus adjacents (Desjardins, 2010). Contrairement aux tumeurs bénignes, les tumeurs malignes peuvent s'avérer mortelles (Voet, 2002). Cette distinction importante sur le plan évolutif est fortement corrélée à des critères macroscopiques et histologiques.

I.5.1 Tumeurs bénignes

✓ **caractères évolutifs**

Les tumeurs bénignes 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 important. 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 mortelles, en raison de leur siège ou de désordres métaboliques (Collège Français des Pathologistes, 2012).

✓ **caractères macroscopiques**

Il s'agit de tumeurs circonscrites, bien limitées, nettement séparées des tissus avoisinants, parfois même entourées par une capsule (coque faite de tissu conjonctif). Cette limitation

explique la facilité de l'exérèse chirurgicale et la possibilité d'une exérèse limitée à la seule tumeur (ex : adénofibrome du sein, léiomyome de l'utérus).

✓ **caractères histologiques**

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. Il n'y a pas d'envahissement des tissus voisins. Les tumeurs bénignes refoulent sans détruire les tissus sains de voisinage : elles sont expansives (ex : adénome du foie). (Collège Français des Pathologistes, 2012).

I.5.2 Tumeurs malignes

Les caractères des tumeurs malignes ou cancers s'opposent point par point à ceux des tumeurs bénignes (tableau I).

✓ **Caractères évolutifs**

Les tumeurs malignes ont habituellement une croissance rapide. Elles donnent naissance à une dissémination tumorale à distance (surtout par voie lymphatique et sanguine) avec éclosion et développement de tumeurs secondaires dans d'autres viscères : les métastases. Les tumeurs malignes ont tendance à récidiver après éradication locale. L'évolution, en l'absence de traitement, se fait spontanément vers la mort.

✓ **Caractères macroscopiques**

Les tumeurs malignes sont mal limitées, non encapsulées ; elles détruisent et envahissent l'organe dans lequel elles ont pris naissance, ainsi que les organes de voisinage. Leurs contours sont irréguliers. Les foyers de nécrose et d'hémorragie sont habituels.

✓ **Caractères histologiques**

Les cellules tumorales malignes présentent habituellement des caractères anormaux (caractères cytologiques de malignité). Le tissu tumoral est plus ou moins différencié. Il «caricature » le tissu normal orthologue. (Collège Français des Pathologistes, 2012).

Tableau I : tableau récapitulatif des caractéristiques des tumeurs bénignes et des tumeurs malignes

Tumeurs bénignes	Tumeurs malignes
Bien limitée	Mal limitée
Encapsulée	Non encapsulée
Histologiquement semblable au tissu d'origine (bien différenciée)	Plus ou moins semblable au tissu d'origine
Cellules régulières	Cellules irrégulières (cellules cancéreuses)
Croissance lente	Croissance rapide

Tableau I (suite) : tableau récapitulatif des caractéristiques des tumeurs bénignes et des tumeurs malignes	
Refoulement sans destruction des tissus voisins	Envahissement des tissus voisins
Pas de récurrence locale après exérèse complète	Exérèse complète difficile. Récurrence possible après exérèse supposée complète
Pas de métastase	Métastases

I.6 ADN MITOCHONDRIAL ET CANCERS

La mitochondrie est un organite intracellulaire présent dans les cellules eucaryotes. Sa fonction principale et indispensable à la vie cellulaire est la production d'adénosine-5' triphosphate (ATP). Cette molécule essentielle fournit par hydrolyse l'énergie nécessaire au métabolisme. Elle est impliquée dans la régulation de bon nombre de processus moléculaires et cellulaires. Cet organite possède son propre ADN ainsi qu'une double membrane comprenant une membrane externe et une interne composée de nombreux replis.

La molécule d'ADN mitochondrial (ADNmt) humaine est représentée par un double brin d'ADN circulaire de 16569 pb (paire de bases) qui code treize polypeptides de la chaîne de phosphorylation oxydative, deux ARN ribosomiques et vingt-deux ARN de transfert. Le taux de mutation est plus élevé que celui des gènes nucléaires (Rohan *et al.*, 2010). La mitochondrie a depuis longtemps été suspectée de jouer un rôle important dans le développement et la progression des cancers. Des dérégulations dans les différents processus impliqués dans la chaîne respiratoire et l'apoptose sembleraient être à l'origine de plusieurs maladies. Elles pourraient être impliquées dans le phénomène du vieillissement et l'apparition de cancers (Warburg, 1956). Ainsi, les cellules malignes pourraient satisfaire leurs besoins énergétiques en produisant préférentiellement leur ATP non plus par phosphorylation oxydative, devenue inefficace, mais par glycolyse compensatoire (Cavalli & Liang, 1998). Il est désormais bien établi que des mutations germinales de l'ADNmt jouent un rôle important dans certaines maladies comme la neuropathie optique héréditaire de Leber ou le syndrome de Leigh. Cependant, contrairement à ces maladies, ce sont des mutations somatiques de l'ADNmt qui sont observées dans les cancers (Maximo *et al.*, 2001).

Le rôle exact de ces mutations somatiques de l'ADNmt dans le développement et la progression des cancers n'est pas clairement élucidé. Ces mutations pourraient être à l'origine d'une dysfonction de la chaîne respiratoire mitochondriale conduisant à la libération de taux anormalement élevés d'espèce réactive de l'oxygène ROS (Audrey *et al.*, 2006). Ces ROS étant responsables de dommages oxydatifs de l'ADNmt, pourraient, à leur tour, altérer la

respiration et ainsi générer des taux importants de ROS. Ce cercle vicieux à l'origine d'une production croissante de ROS, réalisant une condition de stress oxydatif permanent, serait donc favorable au processus de cancérogenèse (Aurore *et al.*, 2010). En effet, par l'intermédiaire des lésions de l'ADN qu'elles produisent, en particulier au niveau des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur, les ROS jouent un rôle important dans l'initiation et la promotion de la cancérogenèse (Shinohara & Adachi, 2010). Il n'est cependant pas exclu que les mutations de l'ADNmt survenant au cours des cancers ne soient, en fait, que la conséquence de lésions oxydatives liées à une production accrue de ROS induite par le processus tumoral lui-même selon un mécanisme qui reste jusqu'alors inconnu (Aurore *et al.*, 2010).

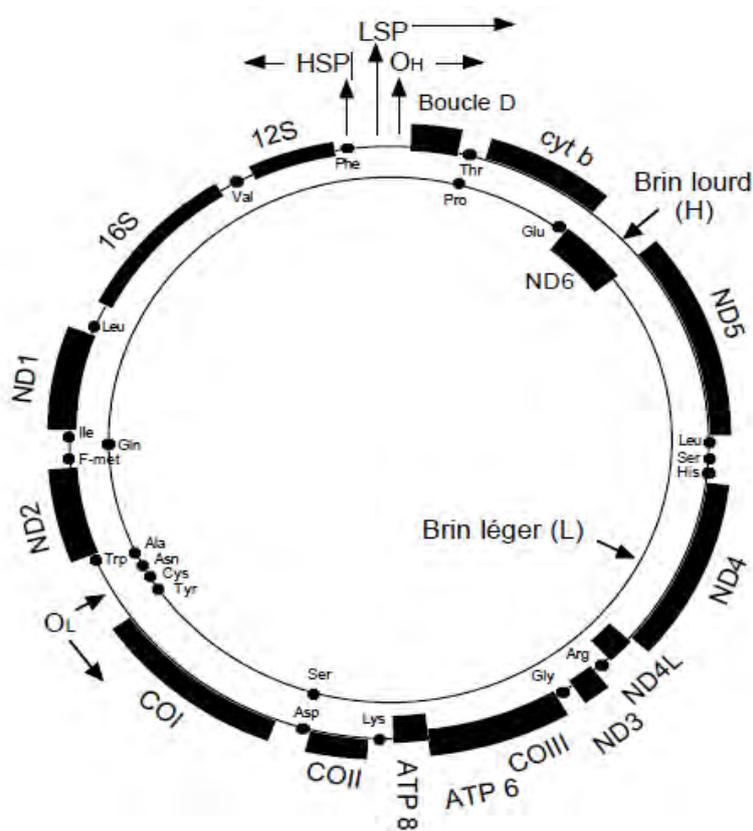


Figure 4 : Organisation de l'ADN mitochondrial humain (Anderson *et al.*, 1981).

HSP : promoteur du brin lourd, **LSP** : promoteur du brin léger, **O_H** : origine de réplication du brin lourd. **O_L** : origine de réplication du brin léger. **Boucle D** : boucle de déplacement ou DLoop. **ND** : gènes des sous-unités du complexe I. **Cyt b** : gène du cytochrome b (complexe III). **CO** : gènes des sous-unités du complexe IV. **ATP** : gènes de sous-unités de l'ATPase. **12S** et **16S** : gènes des ARN ribosomiaux. **Ala, Asn, Asp, Arg, Cys, F-met, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val** : ARN de transfert.

I.7 ONCOGÈNE *B-RAF*

B-RAF fait partie de la cascade de signalisation RAF-MEK-ERK qui régule la croissance cellulaire, la prolifération et la différenciation en réponse à une stimulation par des facteurs de croissance, des cytokines et des hormones (Robinson & Cobb, 1997). *BRAF* est une sérine/thréonine kinase appartenant à la famille des protéines *RAF*, codée par le gène *BRAF*. La famille des protéines *RAF* comporte 3 isoformes : *ARAF*, *BRAF*, et *CRAF*. Le premier gène *RAF* (*v-Raf*), dénommé ainsi pour « Virus-induced Rapidly Accelerated Fibrosarcoma », a été caractérisé dans un virus de sarcome murin en 1983 par Mark et Rapp (1984). Deux ans après sa découverte, son premier homologue humain fonctionnel, *CRAF*, a été cloné à partir de cellules humaines. Le gène *CRAF*, aussi connu sous le nom de *RAF-1*, est composé de 80 626 paires de bases, avec 17 exons sur le chromosome 3p25, codant pour un ARNm (Acide ribonucléique messenger) de 3 291 nucléotides et un peptide de 648 acides aminés. Par la suite, les isoformes *ARAF* et *BRAF* ont été caractérisées (Roskoski, 2010). Le gène *ARAF* est situé sur le chromosome X p11.4-11.2 et code pour un ARNm de 1821 nucléotides et un peptide de 606 acides aminés. Le gène *BRAF*, situé sur le chromosome 7q34, est composé de 18 exons et code pour un ARNm de 2949 nucléotides et un peptide de 766 acides aminés. *ARAF*, *BRAF* et *CRAF* partagent 3 domaines conservés appelés « CR » (Figure 5), dont le domaine N-terminal CR1, qui contient le domaine de liaison à RAS et un domaine riche en cystéine ; le domaine CR2, riche en sérine/thréonine et qui contient un domaine de liaison 14-3-3; et le domaine C-terminal CR3, qui possède l'activité kinase et contient un domaine de liaison 14-3-3. Comme dans toutes les protéines kinases, la position de l'ATP (adénosine triphosphate) est déterminée par une boucle fixant le phosphate (boucle-P), très conservée au cours de l'évolution. Il y a 76% d'homologie entre les séquences d'acides aminés de *BRAF* et *CRAF*, et 74% entre *BRAF* et *ARAF* (Ikawa *et al.*, 1988).

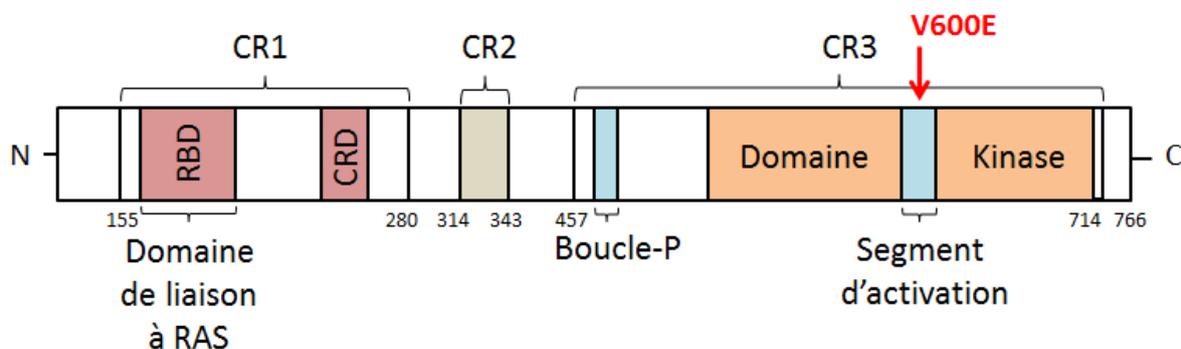


Figure 5: Représentation des 3 domaines structuraux de *BRAF* (Huang *et al.*, 2013).

CR : Conserved region, RBD : RAS binding domain, CRD : Cystein-rich domain

I.8 VOIE DE SIGNALISATION ET CANCERS

Depuis la découverte des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs, et grâce aux progrès de la biologie moléculaire, le cancer apparaît comme une maladie de la signalisation. En effet, selon le concept proposé par Hanahan et Weinberg (2000), les six propriétés caractéristiques des cellules tumorales aboutissant à une indépendance de croissance, une insensibilité aux signaux anti-prolifératifs, une résistance à la mort cellulaire, une prolifération illimitée, une capacité accrue à induire l'angiogenèse et une propension à l'invasion et la dissémination, sont imputables à des anomalies de la signalisation. A ces six propriétés s'ajoutent deux caractéristiques : la capacité de reprogrammation du métabolisme énergétique et l'échappement au système immunitaire (Hanahan & Weinberg, 2011). Depuis, l'élucidation de mécanismes moléculaires clés a permis d'identifier les principales voies de signalisation impliquées dans l'oncogénèse. Environ 20% des 32 000 gènes humains codent des protéines impliquées dans la transduction du signal, incluant des récepteurs transmembranaires, plus de 520 protéines kinases et 130 protéines phosphatases (Blume-Jensen & Hunter, 2001). Deux voies majeures, la voie des RAS/RAF/MAPK (Rat Sarcoma/ Rat Fibrosarcoma virus/ Mitogen Activated Protein Kinase) et la voie des PI3K/AKT (Phosphatidylinositol 3-OH kinase/ Protéine kinase B) sont impliquées dans la signalisation cellulaire en aval des récepteurs à tyrosine kinase, et font l'objet d'un développement intensif depuis près de 20 ans. L'inhibition de ces voies de signalisation conditionne directement l'activité des thérapies ciblées dirigées contre des récepteurs à tyrosine kinase comme les récepteurs HER (Human Epidermal growth factor Receptor). Le contrôle de ces voies de signalisation demeure actuellement un challenge important.

I.9 SIGNALISATION PI3K/AKT ET MAPK/ERK1/2 DANS LE CANCER DU SEIN

Le cancer du sein est une pathologie très complexe présentant une grande hétérogénéité. Les avancées en biologie moléculaire ont permis de mettre en évidence un grand nombre d'aberrations génomiques. A l'exemple aux types d'altérations chromosomiques observées dans les tumeurs solides (Olivier *et al.*, 2001). Certaines anomalies sont propres aux cellules tumorales : translocations spécifiques, et structures porteuses d'amplifications géniques, mais aussi des anomalies complexes. De plus, il existe souvent une certaine hétérogénéité des profils chromosomiques entre cellules d'une même tumeur (évolution clonale) (Marc, 2012). Certaines anomalies sont particulièrement observées dans toutes les proliférations malignes : on distingue les translocations avec fusion de gènes entraînant un gène chimérique de celles qui dérégulent un gène par effet de position ; les gains de tout ou partie de chromosome avec

le cas particulier de l'amplification génique ; les pertes de tout ou partie de chromosome. Des translocations sont de plus en plus souvent observées dans les cancers solides (Olivier *et al.*, 2001). Beaucoup de ces aberrations convergent vers quelques voies de signalisation clés, incluant PI3K/Akt et Raf/MEK/ERK (Polyak & Metzger Filho, 2012). Les altérations de ces deux voies de signalisation sont impliquées dans la prolifération incontrôlée, la survie, la migration et la formation de métastases (Hanahan & Weinberg, 2011).

✓ **Signalisation PI3K/Akt**

La signalisation PI3K/Akt est la voie dont les composants sont les plus fréquemment mutés et/ou amplifiés dans le cancer du sein, après le gène suppresseur de tumeur *p53* (Paplomata & O'Regan, 2014). Environ 25% des cancers du sein présentent une mutation du gène *PI3KCA* qui est particulièrement associée aux sous-types cliniques ER+ et HER2 amplifiés (Cancer Genome Atlas Network, 2012). Par ailleurs, la voie PI3K/Akt est fréquemment suractivée dans les cancers du sein en raison de la dérégulation d'activateurs en amont de la voie (surexpression de HER2 et d'IGFR1) ou de la dérégulation d'inhibiteurs (perte d'expression ou mutation inactivatrice de PTEN et d'INPP4B). Ainsi, les altérations génétiques et l'activation constitutive de la voie PI3K/Akt contribuent au développement tumoral des cancers mammaires dans leur ensemble (Saini *et al.*, 2013).

✓ **Signalisation Raf-MEK1/2-ERK1/2**

Si des mutations affectant Ras ou Raf sont fréquentes dans plusieurs types de cancer, de telles altérations restent rares dans le cadre du cancer du sein (Cancer Genome Atlas Network, 2012). MEKK1 (MAPKK) est retrouvé muté dans 14% et 5% des cancers luminaux A et B, respectivement (Cancer Genome Atlas Network, 2012). Malgré ces observations, des arguments expérimentaux valident l'importance de la voie Ras/MAPK dans le cancer du sein et particulièrement dans les phénotypes agressifs. L'expression de gènes signatures de la voie ERK1/2 est augmentée dans les cancers de type triple négatif TNBC et « basal-like » (Giltane & Balko, 2014), par rapport à la tumeur primaire, l'activation de ERK1/2 (phosphorylation) est augmentée au niveau des sites métastatiques (Adeyinka *et al.*, 2002) et l'altération des mécanismes de régulation négatifs de la voie ERK1/2 est particulièrement associée aux phénotypes « basal-like » (Giltane & Balko, 2014). Hoeflich *et al.*, (2009) ont montré que les modèles de cancer du sein « basal-like » sont plus sensibles à l'inhibition de MEK1/2 que les modèles de phénotypes luminaux et HER2 amplifiés. Enfin, la dérégulation de l'expression de RTKs fréquente dans les cancers du sein sous-tend une activation anormale des voies de signalisation en aval (Giltane & Balko, 2014).

I.10 BRAF DANS LA VOIE DES MAPK

I.10.1 BRAF dans la cellule normale

Les protéines RAF sont des enzymes situées dans la cascade de signalisation cellulaire dite des MAP kinases, ou MAPK (Mitogen-activated protein kinases), une voie intracellulaire essentielle pour la croissance, la différenciation et la survie cellulaires (Avruch, 2007).

Bien que chaque isoforme joue un rôle dans cette voie de signalisation, BRAF est le principal activateur de MEK, la kinase située juste en aval des protéines RAF dans la voie des MAPK. BRAF a un rôle majeur de transduction du signal au sein de la voie des MAPK. Dans une cellule normale, la voie des MAPK transforme les divers stimuli extracellulaires tels que ceux transmis par les récepteurs couplés aux protéines G, les récepteurs de facteurs de croissance, les intégrines ou les récepteurs de cytokines en réponses intracellulaires. Cette grande famille de kinases contient principalement trois sous-familles : les MAPK JNK (c-jun N-terminal kinase) et ses trois isoformes JNK1, JNK2 et JNK3 ; les MAPK p38 et les formes α , β , γ , δ et les MAPK ERK avec ERK1, ERK2, ERK3, ERK4, et ERK5. Ces MAPK régulent de façon coordonnée plusieurs processus cellulaires dont la prolifération, la différenciation, la mobilité, la réponse au stress et la survie. Exprimées de manière ubiquitaire, les MAPK ERK1 et 2 sont rapidement activées à la suite d'une cascade de phosphorylations en réponse à la liaison de facteurs de croissance à leurs récepteurs. Bien que le mode d'activation des récepteurs diffère, les signalisations convergent toutes vers l'activation des protéines RAS. Chez l'humain, trois gènes RAS codent pour quatre protéines hautement homologues (85%) de 21 kDa : HRAS, NRAS, KRAS4A et KRAS4B (ces deux dernières étant issues d'un épissage alternatif). Les protéines RAS activées régulent un réseau complexe d'effecteurs en aval des récepteurs membranaires présents à la surface cellulaire. Sous leur forme active liée au GTP, les protéines RAS recrutent l'une des trois isoformes de RAF (ARAF, BRAF, CRAF). À la membrane, la protéine RAF est activée par un jeu de phosphorylation/déphosphorylation, ce qui modifie sa conformation et dévoile des sites de dimérisation. Cela permet la formation d'homodimères ou d'hétérodimères tels que les dimères BRAFCRAF qui sont ceux dont l'activité kinase est la plus puissante (Rushworth *et al.*, 2006). Ces dimères activent à leur tour par phosphorylation les protéines kinases MEK1/2. La présence d'un domaine d'export nucléaire sur les protéines MEK1/2 permet leur localisation cytoplasmique où elles activent par phosphorylation les sérine/thréonine kinases ERK1/2, aussi connues sous le nom de p44/p42 MAPK. Une fois activées, les kinases ERK1/2 se détachent de MEK1/2 et phosphorylent de nombreux substrats membranaires et

cytoplasmiques avant de migrer dans le noyau pour y phosphoryler des facteurs de transcription, régulant ainsi l'expression de plusieurs gènes (Ramos, 2008)

I.10.2 *BRAF* dans la cellule cancéreuse

La substitution *BRAF* V600E compte pour 80 % des mutations ; elle serait impliquée dans 66% des mélanomes malins (Rajagopalan *et al.*, 2002), et elle est impliquée aussi dans plusieurs autres cancers dont le cancer du sein (Wang *et al.*, 2015). La plupart de ces mutations se trouvent dans l'exon 15 de ces tumeurs, et la mutation V600E était la plus fréquente (initialement décrite comme V599E) (Kimura *et al.*, 2003). Les mutations oncogènes de *BRAF* entraînent une augmentation de la fonction kinase, rendant ainsi la voie RAF-MEK-ERK constitutivement active en l'absence de facteurs de croissance spécifiques. La mutation *BRAF* V600E, de loin la plus fréquente, affecte de façon importante son activité sérine/thréonine kinase. *BRAF* V600E a une activité catalytique 500 fois supérieure à la protéine normale (Kimura *et al.*, 2003). La conjonction des connaissances biochimiques, génétiques et cellulaires associées à la recherche systématique d'inhibiteurs de kinase depuis le début des années 1980 a permis de développer des inhibiteurs spécifiques de la forme mutée de *BRAF* qui sont maintenant utilisés chez l'Homme.

**CHAPITRE II : EVALUATION DU POLYMORPHISME
ET DE LA DIVERSITE GENETIQUE DU *MT-CYB*
DANS LES TUMEURS DU SEIN CHEZ LES FEMMES
SENEGALAISES.**

INTRODUCTION

Malgré les progrès considérables réalisés au cours de la dernière décennie dans la compréhension du rôle des gènes de réparation des mésappariements, des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs, plusieurs aspects du processus de cancérogenèse restent encore flous. À cet égard, la découverte de mutations et de délétions dans l'ADNmt (Sarzi & Rotig, 2010) des cellules tumorales a focalisé l'attention sur ces organites cytoplasmiques en tant que facteurs concomitants dans le début ou la progression des tumeurs (Shay & Werbin, 1987). La mitochondrie a depuis longtemps été suspectée de jouer un rôle important dans le développement et la progression des cancers. Des dérégulations dans les différents processus impliqués dans la chaîne respiratoire et l'apoptose sembleraient être à l'origine de plusieurs maladies (Faitg *et al.*, 2017). Elles pourraient être impliquées dans le phénomène du vieillissement et l'apparition de cancers (Faitg *et al.*, 2017). De nombreuses altérations mitochondriales associées aux cancers ont été identifiées et décrites dans la littérature. Ces altérations incluent des modifications d'expression des gènes mitochondriaux, des anomalies mitochondriales structurales, quantitatives ou des anomalies des composants enzymatiques de la chaîne respiratoire (Selak *et al.*, 2005) et, plus récemment, grâce au développement des techniques de biologie moléculaire, des mutations de l'ADNmt. La fréquence des mutations de l'ADN mitochondrial est élevée par rapport à celle des mutations des gènes nucléaires en raison du faible nombre de réparation de l'ADNmt, de la présence d'un niveau élevé d'espèce réactives de l'oxygène (ROS) à sa proximité et de l'absence des protéines protectrices (les histones) contre les agents mutagènes (Rohan *et al.*, 2010).

Dans ce chapitre, l'hypothèse d'une implication des mutations du *MT-CYB* dans la carcinogenèse mammaire chez les femmes sénégalaises a été émise. Donc nous allons faire une étude comparative du polymorphisme, de la diversité, de la différenciation et de l'évolution génétique du *MT-CYB* entre les patientes atteintes de tumeurs bénignes, des tumeurs malignes du sein et des sujets de contrôle.

II.1 MATÉRIEL BIOLOGIQUE ET POPULATION D'ETUDE

Cette étude a obtenu l'approbation du comité d'éthique et de la recherche de l'université Cheikh Anta Diop de Dakar. Trois populations ont été constituées dans cette étude. Il s'agit du groupe des témoins, du groupe des patientes atteintes de tumeurs bénignes et du groupe des patientes atteintes de tumeurs malignes. Des prélèvements de sang total ont été obtenus sur tube EDTA chez les sujets de contrôle. Pour les patientes, une pièce tumorale a été obtenue après une intervention chirurgicale. Les tissus ont été conservés dans de l'alcool 96% pour

assurer l'intégrité de la molécule d'ADN. L'étude porte sur soixante-treize (73) prélèvements chirurgicaux composés (35) de tumeurs bénignes (TB) et (38) de tumeurs malignes (TM) et (20) prélèvements de sang total chez les sujets de contrôle.

II.2 ÉTUDE GÉNÉTIQUE

II.2.1 Extraction D'ADN

✓ Des tissus :

L'extraction d'ADN des tissus mammaires a été réalisée grâce à la méthode Standard Qiagen (Kit Qiagen Dneasy Tissue). Les tissus ont été broyés dans 180 µl de tampon de digestion (ATL) contenant des détergents qui entraînent une dissociation des tissus et une individualisation des cellules. 20 µl de protéinase K ont été ajoutés pour dégrader toutes les protéines, après une incubation à 55°C pendant toute une nuit. Les débris tissulaires ont été éliminés après centrifugation rapide et récupération du surnageant. À cette solution, 200 µl de tampon de lyse cellulaire (AL) ont été ajoutés puis un passage immédiat au vortex et une incubation pendant 10 minutes à 70°C. La phase suivante consistait à ajouter 200µl d'éthanol absolu, à vortexer et à transvaser le mélange obtenu sur une colonne que nous avons placée au préalable sur un tube collecteur de 2 ml (fourni dans le Kit), puis à centrifuger à 1361.356 rad/s pendant une minute pour retenir l'ADN au niveau de la membrane de la colonne (membrane silice). En effet, l'ADN chargé négativement se fixe, par interactions ioniques, sur la membrane de silice chargée positivement. Par contre les protéines, les lipides et les polysaccharides sont éliminés. L'ADN fixé sur la colonne a été ensuite purifié pour éliminer toutes traces de contaminant. Ce lavage a été réalisé 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. 50 µl de tampon AE au préalable incubé à 70°C pour augmenter le rendement de 15 à 20% ont été directement versés sur la membrane que nous avons placée sur un tube de 1,5 ml pour recueillir l'ADN. Juste après cette étape l'ADN est conservé à -20°C. La qualité de l'ADN a été vérifiée par migration électrophorétique à partir d'un gel d'agarose de 1,5% à 100 volts pendant 30 min. Le gel a été placé sous UV pour une visualisation après un bref passage au bromure d'Ethidium.

✓ Du sang :

Pour l'extraction des prélèvements du sang, le même protocole a été appliqué à la seule différence qu'étant donné que le sang est constitué de cellules déjà individualisées, 20 µl de protéinase K et 200 µl de tampon AL ont été directement ajoutés après avoir prélevé 200 µl du liquide biologique.

II.2.2 Choix du gène étudié

Dans cette présente étude, le gène *MT-CYB* a été choisi. Le *MT-CYB* est une région de plus d'un millier de paires de bases du génome mitochondrial, situé entre les positions 14747 et 15887 (Anderson *et al.*, 1981). Il est également connu sous le nom de complexe bc1 (en raison des *cytochromes b* et *c1* qui le constituent) ou c réductase de l'ubiquinol-cytochrome. Il est impliqué dans le transfert d'électrons transmembranaires par lequel l'énergie d'oxydo-réduction est convertie en une force protomotrice. Il est la seule des 11 sous unités du complexe III à être codée par l'ADNmt, et avec la protéine du *cytochrome c1* et le sulfure de fer, il forme le noyau catalytique de l'enzyme (Blakely *et al.*, 2005). En d'autres termes, le complexe III joue un rôle essentiel dans les cellules (Blankenship & Robert, 2009). L'avantage de la recherche des mutations sur l'ADNmt est divers :

- ✓ chez l'humain, il ne compte que 37 gènes, alors que l'ADN humain en compte quelque 24500 (IHGSC, 2004). Il est en général mieux conservé et évidemment, beaucoup plus vite décodé (Calvo *et al.*, 2016).
- ✓ les gènes mitochondriaux ont un taux de mutation plus élevé que les gènes nucléaires. Les mitochondries semblent avoir perdu un système de réparation ADN efficace. Ces caractères spécifiques sont probablement la cause de 10 à 17 fois plus d'accumulation de polymorphismes dans l'ADNmt par rapport à l'ADN nucléaire (Wallace, 2012). Ce qui est un avantage de les utilisés comme marqueurs, particulièrement intéressantes pour les diagnostique des maladies surtout le cancer qui est une maladie des mutations génétiques.
- ✓ l'ADN mitochondrial se caractérise par une transmission quasi maternelle. Cela simplifie donc énormément l'étude des filiations mère-enfant et la datation des lignées. Il permet aussi de retracer l'origine familiale d'une maladie.

II.2.3 Amplification en chaine par polymérase du *MT-CYB* et séquençage

L'amplification a été réalisée dans un volume réactionnel de 43µl contenant 28,9 µl d'eau MilliQ, 5 µl de Tampon (10X) qui contient des ions Mg²⁺ à une concentration initiale de 15 mM, 2 µl de dNTP, 5 µl de l'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 de 2µl d'extrait d'ADN. Elle a été effectuée par la répétition de cycles qui assure une multiplication par 2 de l'ADN cible à chaque cycle. La PCR a lieu dans un thermocycleur de type Eppendorf dans les conditions suivantes : dénaturation préliminaire à 94°C (3 minutes), suivi d'une répétition de 40 cycles de dénaturation initiale à 94°C (45 secondes),

d'hybridation à 50°C (1 minute) et d'élongation des brins d'ADN complémentaire à 72°C pendant (1 minute 30s) et est bouclée par une élongation finale à 72°C (10 minutes). Le produit PCR a été vérifié par migration électrophorétique sur gel d'agarose de 1,5% à 100 volts pendant 30 min. Les réactions de séquençage ont été effectuées dans un thermocycleur de type PTC-225 ABI PRISM et un séquenceur 3730xl ABI avec l'amorce TCTCCATTCTGGTTTACAAGAC.

II.2.4 ANALYSES MOLÉCULAIRES

II.2.4.1 Nettoyage et alignement des séquences du *MT-CYB*

Les séquences du *MT-CYB*, des trois groupes (témoins, tumeurs bénignes et tumeurs malignes), sont minutieusement vérifiées, corrigées et alignées avec le logiciel BioEdit version 7.0.8 (Hall, 1999). L'alignement est en effet une étape importante de l'analyse des données. Il sert notamment, à mettre en évidence, les similitudes entre les séquences en retrouvant la position des délétions ou des insertions probables.

II.2.4.2 Polymorphisme et diversité génétique du *MT-CYB*

Pour estimer la diversité génétique des tumeurs malignes, des tumeurs bénignes et ainsi aux témoins, nous avons déterminé le nombre de sites variables et invariables, le nombre de sites informatifs, le nombre total de mutations, le nombre d'haplotypes, le nombre moyen de différences nucléotidiques, la diversité haplotypique (h) et nucléotidique (π), grâce au logiciel DnaSP version 5.10 (Librado & Rozas, 2009). Les fréquences nucléotidiques et la nature des mutations (% de transitions et de transversions) ont été calculées avec le programme MEGA version 6.06 (Tamura *et al.*, 2013).

II.2.4.3 Étude de la variabilité des acides aminés du *MT-CYB*

Les variations des acides aminées permettent d'évaluer la diversité protéique inter-groupe. Cette diversité protéique est basée sur la comparaison des fréquences des acides aminés au niveau des trois groupes (tumeurs malignes, tumeurs bénignes et témoins). Ainsi, le *MT-CYB* étant un gène codant, les séquences nucléotidiques ont été traduites en séquences d'acides aminés 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 trois groupes a été mis en évidence par le test χ^2 avec un niveau de significativité (P-value) de 0,05.

II.2.4.4 Analyse de la différenciation génétique du *MT-CYB*

L'analyse de la différenciation génétique permet de rendre compte du degré de différenciation génétique inter-groupe du *MT-CYB*. Pour cela, deux paramètres ont été mis en évidence : la distance génétique et l'indice de différenciation génétique (Fst).

Les distances génétiques entre tumeurs malignes, tumeurs bénignes et témoins au niveau intra et inter groupes ont été explicitées par la distance génétique de Nei (Nei, 1998) grâce au logiciel MEGA version 6.06 (Tamura *et al.*, 2013).

La détermination de l'indice de différenciation génétique (Fst) a été faite sous Arlequin version 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005). Le niveau de significativité du Fst a été retenu à 0,05.

II.2.4.5 Tests de signature de sélection du *MT-CYB*

Nous avons fait des tests démo-génétiques qui comparent le niveau d'ajustement entre la diversité aux trois groupes et des valeurs théoriques attendues. Parmi ces tests : le D de Tajima (Tajima, 1989), le D*et F* de Fu et Li (Fu & Li, 1993) et du H de Fay et Wu (Fay & Wu, 2000) et le R2 de Ramos (Ramos, 2002). Ces différents estimateurs s'obtiennent avec les programmes DnaSP version 5.10 (Librado & Rozas, 2009) et Arlequin version 3.5.1.3 (Excoffier *et al.*, 2010). En choisissant comme hypothèse de départ que le gène *MT-CYB* soit sous sélection positive, l'existence d'une quelconque sélection a été appréhendée par une positivité ($dN > dS$) grâce au logiciel MEGA 6 avec dN est le taux de substitution non-synonyme et dS est le taux de substitution synonyme. Ce test a été effectué en utilisant le modèle Nei-Gojobori et la méthode pairwise délétion. Une valeur de $P \leq 0,05$ a été considérée comme significative avec une valeur de bootstrap de 10000 réplifications. Après les tests démo-génétiques nous avons déterminé l'analyse de la disparité de distribution (Mismatch distribution), qui est la représentation graphique de la distribution de distances génétiques existant entre les individus. L'analyse de Mismatch s'accompagne de deux indices qui testent la qualité d'ajustement de la distribution. Ces indices sont la SSD (somme de carrées des déviations) et le Rag (indice d'irrégularité). Les graphes sont construits avec le logiciel DnaSP version 5.10 (Librado & Rozas, 2009). Les indices SSD et Rag ont été obtenus avec le logiciel Arlequin version 3.5.1.3 (Excoffier *et al.*, 2010).

II.3 RÉSULTATS ET DISCUSSION

II.3.1. RÉSULTATS

Un total de 93 échantillons (20 pour les témoins, 35 pour tumeurs bénignes et 38 pour les tumeurs malignes) a été séquencé et analysé.

II.3.1.1 Étude de la diversité génétique du *MT-CYB*

L'analyse du tableau VIII révèle une plus grande diversité du *MT-CYB* au niveau des tumeurs malignes comparées aux tumeurs bénignes et aux témoins. Cette diversité accentuée sur les tumeurs malignes se matérialise par un nombre élevé de sites variables (143) par rapport aux TB (10) et aux témoins (7). Nous remarquons aussi un nombre total de mutations plus élevé pour les TM (177) comparés aux TB (12) et aux témoins (7). Un nombre d'haplotype plus élevé pour les TM (36) que les TB (10) et les témoins (7). Le nombre moyen de différences nucléotidiques (k) est plus élevé aux niveaux de TM (31,307) comparés aux TB (1,479) et aux témoins (0,958). Nous constatons que les pourcentages de transitions sont plus importants que ceux des transversions chez les tumeurs malignes et les tumeurs bénignes ainsi que les témoins avec respectivement (87,17 %), (85,62%) et (66,72%). Par contre les pourcentages de transversions sont plus élevés aux niveaux des TM (33,28%) par rapport aux TB (12,83) et aux témoins (14,38 %) (Tableau II). L'analyse des indices de diversité révèle de fortes diversités haplotypiques de (0,996), (0,805) et (0,584) respectivement au niveau des tumeurs malignes, tumeurs bénignes et témoins contre de faibles diversités nucléotidiques (0,06402), (0,00301) et (0,00195) (Tableau II).

Nous remarquons aussi une forte variabilité génétique au niveau de TB comparés aux témoins (Tableau II).

Tableau II: Valeurs des indices de diversité génétique de chaque population du *MT-CYB*

Indices de diversité	Témoins	Tumeurs bénignes	Tumeurs malignes
Taille échantillon, n	20	35	38
Nombres de sites, N	492	492	492
Nombre de sites invariables	485	482	346
Nombre de sites variables	7	10	143
Nombre de sites variables non-informatifs	5	6	38
Nombre de sites variables informatifs	2	4	105
Nombre total de mutations, Eta	7	12	177
Nombre d'haplotypes, h	7	10	36
Nombre moyen de différences nucléotidiques (k)	0,958	1,479	31,307
Transitions	85,62	87,17	66,72

Tableau II (suite) : Valeurs des indices de diversité génétique de chaque population

Transversions	14,38	12,83	33,28
R (Taux de Transitions /Taux Transversions)	19,484	5,513	1,879
Diversité haplotypique (hd)	0,584	0,805	0,996
Diversité nucléotidique (π)	0,00195	0,00301	0,06402

Dans le diagramme des fréquences nucléotidiques (figure 6), nous voyons que les bases G et T sont les plus dominantes avec respectivement 35,98% et 29,47% pour les témoins ; 35,99% et 29,43% pour les TB et en fin 34,24% et 29,63% pour les TM. Nous remarquons aussi une prédominance d'A +G par rapport à T+C dans tous les groupes.

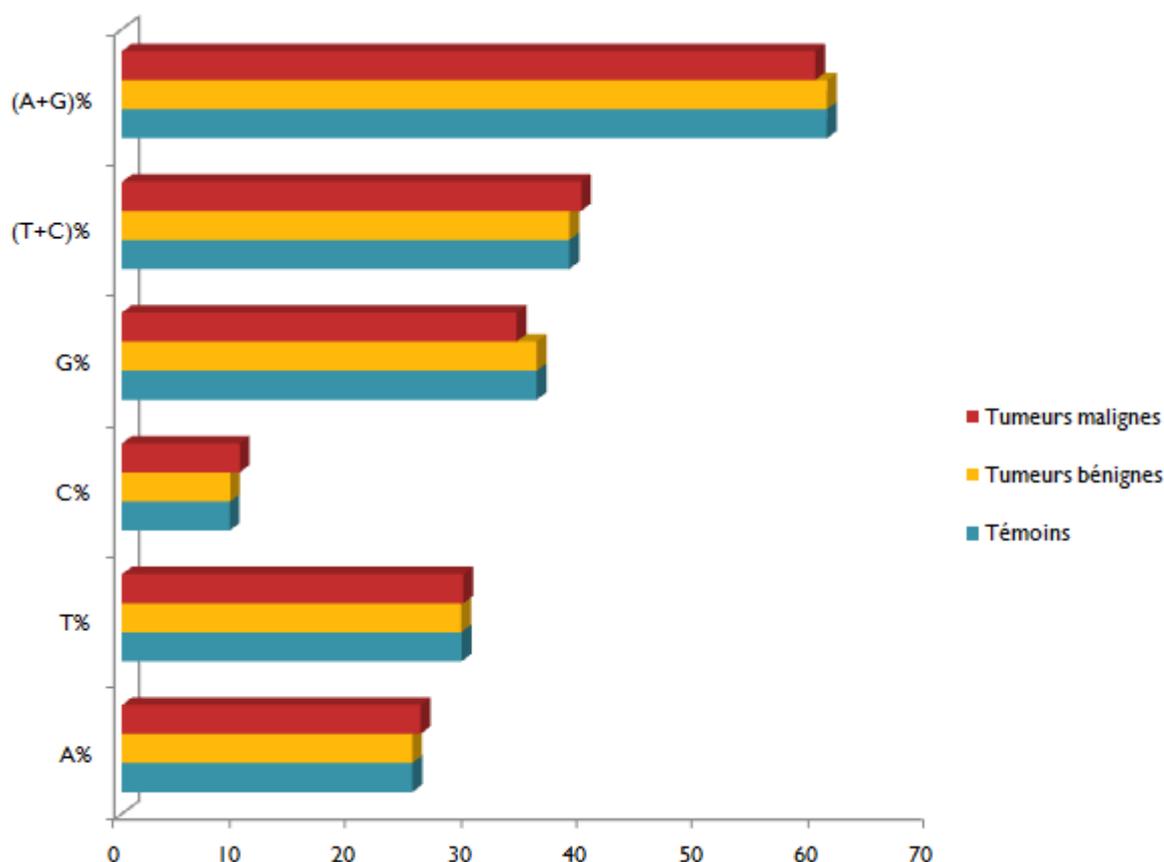


Figure 6 : Fréquences nucléotidiques des séquences du *MT-CYB*

II.3.1.2 Variabilité des acides aminés du *MT-CYB*

Nous constatons que la fréquence de chaque acide aminé du *MT-CYB* se différencie légèrement entre témoins, tumeurs bénignes et tumeurs malignes sans aucune signification

statistique. Cependant nous observons des valeurs significatives sur la glutamine entre Témoins vs TB et entre Témoins vs TM (Tableau III).

Tableau III : fréquences des acides aminés du *MT-CYB*

Acides aminés	Témoins	Tumeurs bénignes	Tumeurs malignes	P-value Tvs TB	P-value T vs TM	P-value TB vs TM
Ala	0,666	0,648	0,495	0,9944	0,944	0,9495
Cys	4,701	4,693	2,865	0,9991	0,7638	0,7647
Asp	5,251	5,251	4,765	NA	0,870	0,870
Glu*	0	0,495	0,420	0,0301*	0,0380*	NA
Phe	2,667	2,671	3,095	0,9908	0,9363	0,9369
Gly	21,373	21,331	20,024	0,9974	0,9172	0,9197
His	1,393	1,393	2,06727	NA	0,697	0,697
Ile	2,667	2,690	2,175	0,9965	0,9201	0,9204
Lys	2	1,850	2,565	0,9728	0,906	2,565
Leu	20,673	20,702	20,767	0,9982	0,9942	0,9916
Met	6,002	6,010	5,819	0,9992	0,9807	0,9798
Asn	2,667	2,671	2,246	0,9994	0,9323	0,9317
Pro	5,144	5,144	4,870	NA	0,922	0,922
Gln	1,333	1,354	1,521	1,354	0,9605	0,9651
Arg	7,335	7,498	6,545	0,9845	0,9227	0,9073
Ser	3,334	3,319	3,980	0,9979	3,334	0,9124
Thr	5,716	5,716	6,131	NA	1	1
Val	10,003	10,036	11,126	0,9973	0,9092	0,9119
Trp	8,636	8,509	7,960	8,509	0,939	0,9503
Tyr	2	2,003	2,405	0,9995	0,9313	0,9319

II.3.1.3 Différenciation génétique du *MT-CYB*

Les valeurs de distance génétique (d) au niveau intra et inter tissulaire et le degré de différenciation génétique (Fst) entre témoins et tumeurs bénignes et entre témoins et tumeurs malignes ainsi que tumeurs bénignes et tumeurs malignes sont consignés dans le tableau IV.

L'analyse des distances génétiques entre témoins et tumeurs malignes ainsi que tumeurs bénignes et tumeurs malignes a révélé une grande distance génétique (d=0,141), approuver par un degré de différenciation génétique qui montre un Fst significativement fort avec des valeurs de 0,40425 et 0,45955 respectivement entre témoins et tumeurs malignes ainsi que tumeurs bénignes et tumeurs malignes avec des p-value=0,00. Par contre l'analyse de distance génétique entre témoins et tumeurs bénignes a révélé une faible distance génétique (d=0,003), témoigner par un Fst significativement faible (0,02805) avec un p-value=0,05.

Nous constatons aussi qu'à l'intérieure des tumeurs malignes la valeur de la distance génétique (d=0,123) est supérieure à celles des témoins (d=0,001) et des tumeurs bénignes (d=0,004).

Tableau IV: distances génétiques intra et inter-groupe et indice de différenciation (Fst) du *MT-CYB*

Groupes	Distances génétiques Intra-groupe	Distances génétiques inter-groupe	Fst
Témoins	0,001	0,003	0,02805 P-value=0,05
Tumeurs bénignes			
Témoins		0,141	0,40425 P-value=0,00
Tumeurs malignes	0,123		
Tumeurs bénignes	0,004	0,141	0,45955 P-value=0,00
Tumeurs malignes			

II.3.1.4 Tests de signature de sélection

Sous l'hypothèse d'une sélection positive (dN > dS) la valeur de la probabilité pour les témoins est de 0,489 et pour les TB et TM sont égales à 1 avec des valeurs de p respectives (0,02 et 0,00 ≤ 0,05). Donc à partir de ces résultats, l'hypothèse de départ est acceptée par conséquent les substitutions au niveau des témoins, des tumeurs bénignes et malignes suivent une sélection positive. Pour le D de Tajima, les valeurs des témoins (-0,07919 ; p=0.53100),

TB (-0,11377 ; $p=0,54900$) et TM (-0,10204 ; $p=0,56300$) sont négatives et non significatives.

Les tests de D^* et F^* de (Fu & Li) sont négatifs et non significatifs pour les trois groupes. Le test de H de (Fay & Wu) est positif et non significatif pour les témoins, par contre il est négatif et non significatif pour les TB et TM. Les valeurs sont consignées dans le tableau V. Contrairement aux autres indices pour ceux de R^2 de Ramos les valeurs de témoins (0,16259 ; $p=0$), TB (0,16105 ; $p=0$) et TM (0,16260 ; $p=0$) sont positives et significatives.

Tableau V: valeurs du Test de signature de sélection du *MT-CYB*

Paramètres	Témoins	Tumeurs bénignes	Tumeurs malignes	P-value Témoins	P-value TB	P-value TM
dN/Ds	0,489	1	1	0,02	0,00	0,00
D de Tajima	-0,07919	-0,11377	-0,10204	0,53100	0,54900	0,56300
D^* de Fu et Li	-0,03235	-0,11374	-0,06874	0,47700	0,47500	0,46600
F^* de Fu et Li	-0,08073	-0,09510	-0,06902	0,47300	0,48800	0,47300
H de Fay et Wu	0,34604	-0,24373	-0,31893	0,30900	0,34800	0,35000
R^2	0,16259	0,16105	0,16260	0,00000	0,00000	0,00000

II.3.1.5 Analyse de la disparité de distribution (Mismatch distribution) du *MT-CYB*

La disparité de distribution (Mismatch distribution), des paires de base pour le *MT-CYB* entre les trois groupes, montre les fréquences attendues et observées (trait plein et pointillé respectivement) des différences par paire entre les échantillons (Figure 7). Sous l'hypothèse d'une population constante ou d'une population en expansion, nous avons une distribution unimodale pour les témoins et les tumeurs bénignes. Cependant la distribution est multimodale pour les tumeurs malignes.

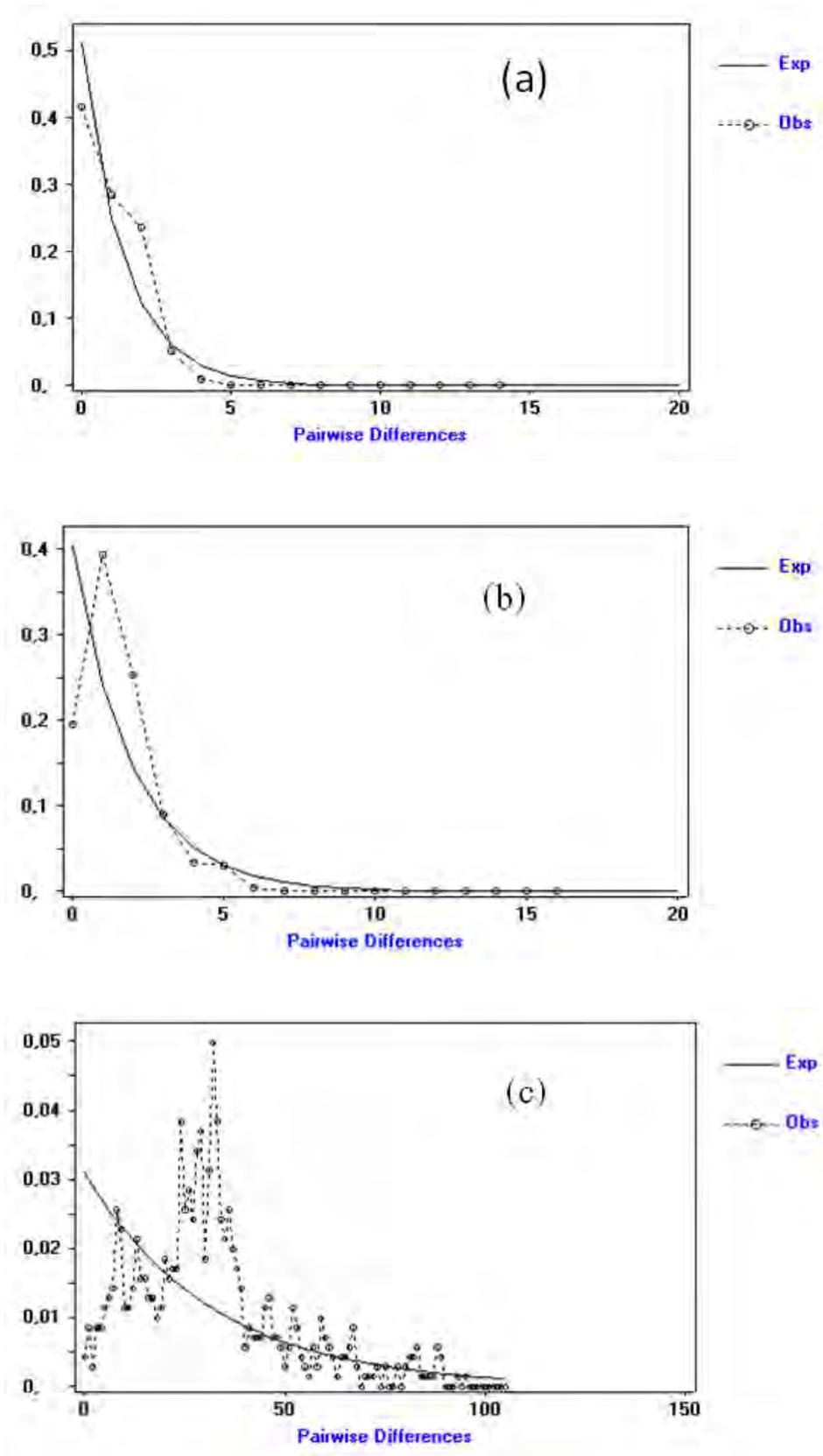


Figure 7 : courbes de mismatch distribution des témoins (a), tumeurs bénignes (b) et tumeurs malignes (c).

Les valeurs SSD, témoins (0,00513 ; p=0,7400), TB (0,00566 ; p=0,36000) et TM (0,00255 ; p=0,99000) sont positives et non significatives pour les trois groupes (tableau VII). Les valeurs de Rag, témoins (0,05537; p = 0,96000), TB (0,08938; p = 0,19000) et TM (0,00341 ; p=0,97000) sont positives et non significatives (tableau VI).

Tableaux VI : valeurs des SSD, des Rag, et leurs P-values

	Témoins	Tumeurs bénignes	Tumeurs malignes
SSD	0,00513 P-value= 0,7400	0,00566 P-value= 0,36000	0,00255 P-value= 0,99000
Rag	0,05537 P-value= 0,96000	0,36000 P-value= 0,19000	0,00341 P-value= 0,97000

II.3.2 DISCUSSION

Dans cette présente étude, nous avons procédé à l'étude du polymorphisme, de la diversité, de la différenciation et de l'évolution génétique du gène *MT-CYB* afin de déterminer son implication dans la carcinogenèse mammaire. Ce travail a fait l'objet de 38 patientes atteintes de cancer du sein et 35 atteintes de tumeurs bénignes du sein. Les données de ces patientes ont été comparées à celles de 20 sujets de contrôle servant de témoins. De plus, la mitochondrie est une structure indispensable au fonctionnement de nos cellules, et assume des fonctions métaboliques essentielles. L'ensemble de ces considérations justifie l'étude de la variabilité de son génome dans le contexte du cancer.

Plusieurs mutations ont été décrites aussi bien au niveau des séquences des tumeurs malignes qu'au niveau des séquences de tumeurs bénignes. Cependant, elles étaient plus fréquentes au niveau de tumeurs malignes. Cette diversité accentuée sur les tumeurs malignes se matérialise par un nombre élevé de sites variables (143) par rapport aux TB(10) et aux témoins (7). Cela se justifie par la capacité des cellules tumorales à envahir et à coloniser des sites distants qui est une caractéristique majeure différenciant les cancers malins et les tumeurs bénignes (Eccles; 2000). Un nombre total de mutations (177) pour les TM qui est plus élevé par rapport aux TB (12) et aux témoins (7). Ce qui témoigne la grande diversité du *MT-CYB* ainsi que de son instabilité génétique au niveau des tissus malins par rapport aux tissus bénins et aux témoins. Cette forte variabilité du *MT-CYB* est en commun accord avec les travaux de Mbaye *et al.*, (2012), qui avait étudié la diversité génétique et protéique du *MT-CYB* entre tissus sains et cancéreux, afin de déterminer la pénétrance de ce gène codant dans le cancer du

sein chez la femme au Sénégal ; et ceux de Doupa *et al.*, (2015) portant sur l'implication des mutations du *cytochrome B* dans l'évolution des tumeurs bénignes du sein chez les femmes sénégalaises. Ce taux de substitutions a été aussi constaté par Tan *et al.*, (2002) en examinant la présence de mutations de l'ADNmt dans le cancer du sein, dont 58% étaient des substitutions du gène *MT-CYB* et de la région non codante (*D-Loop*). Chez les mammifères, où il a pu être estimé précisément, ce taux est beaucoup plus élevé que celui décrit pour les séquences uniques nucléaires, et ce d'un facteur multiplicatif de 5 ou 10 (Brown *et al.*, 1982). Ce taux est variable suivant les régions du génome considéré (Cann *et al.*, 1984) mais reste globalement élevé. Cette forte variabilité du *MT-CYB* peut être expliquée par une réplication peu fidèle (Kunkel & Loeb, 1981), la polymérase mitochondriale serait moins fidèle que celle du noyau, une déficience ou une absence des systèmes de correction et de réparation, et l'absence apparente de recombinaison, ainsi qu'un taux de renouvellement et donc de réplication plus important que celui de l'ADN nucléaire (Brown *et al.*, 1982). Les caractéristiques générales des mutations de l'ADNmt sont des transitions (Beckman & Ames, 1997). Cette affirmation est en corrélation avec nos résultats ; 66,72 % des substitutions sont des transitions. Ils ont affirmé que la principale cause de mutations de l'ADNmt dans les tumeurs est le niveau élevé de ROS (Beckman & Ames, 1997). Il y a une sensibilité particulière de l'ADN mitochondrial à un stress oxydatif. Pour rappel, la molécule de l'ADNmt est accolée à la membrane interne et donc proche de la chaîne respiratoire, elle n'est pas protégée par un manteau d'histones et les capacités de réparation sont moindres comparées à l'ADN nucléaire. En effet les dimères de pyrimidine et l'alkylation sont difficilement réparables et l'ADN polymérase mitochondriale ne possède pas d'activité exonucléasique. Par conséquent les niveaux de bases oxydées dans l'ADNmt sont 2 à 3 fois plus élevés par rapport à l'ADN nucléaire, et cela a pu être constaté sur plusieurs régions du cerveau humain (Hudson *et al.*, 1998) mais aussi dans certaines espèces de mammifères et d'oiseaux (Barja & Herrero, 2000). Les fréquences nucléotidiques, montrent une dominance des bases Guanine et Thymine par rapport aux bases Adénine et Cytosine dans tous les trois groupes, ces résultats sont en commun accord avec les travaux de Doupa *et al.*, (2015), qui avait travaillé sur l'implication des mutations du *Cytochrome B* dans l'évolution des tumeurs bénignes du sein chez les femmes sénégalaises. Nos résultats révèlent que la fréquence de chaque acide aminé issu des séquences du *MT-CYB* se différencie légèrement entre témoins, tumeurs bénignes et tumeurs malignes sans aucune signification statistique à l'exception de la glutamine. La plupart des cancers dont le cancer du sein dépendent d'un taux élevé de la glycolyse aérobie pour leur croissance et leur survie. Paradoxalement, certaines lignées de cellules de cancer présentent également la dépendance à

la glutamine en dépit du fait que la glutamine est un acide aminé non essentiel qui peut être synthétisé à partir du glucose. Le taux élevé d'absorption de glutamine par des cellules exposées dépendant de la glutamine ne semble pas résulter uniquement de son rôle en tant que donneur d'azote dans des nucléotides et d'acides aminés de la biosynthèse. Au lieu de cela, la glutamine joue un rôle dans l'absorption requise de l'acide aminé essentiel dans le maintien et l'activation de la kinase TOR. En outre, dans de nombreuses cellules cancéreuses, la glutamine est le substrat mitochondrial primaire et est nécessaire pour maintenir le potentiel de la membrane mitochondriale et l'intégrité ainsi que le soutien de la production de NADPH nécessaire pour le contrôle de redox et de la synthèse macromoléculaire (Levine & Puzio-Kuter, 2010).

L'analyse des distances génétiques entre témoins et tumeurs malignes ainsi que tumeurs bénignes et tumeurs malignes a révélé une grande diversité génétique ($d=0,141$), approuvé par un degré de différenciation génétique qui montre un F_{st} significativement fort avec des valeurs de 0,40425 et 0,45955 respectivement entre témoins et tumeurs malignes ainsi que tumeurs bénignes et tumeurs malignes avec des p -value=0,00. Cela pourrait être expliqué par le fait que, les cellules cancéreuses ne sont plus sous le contrôle des mécanismes de régulation de la division cellulaire. L'un des traits caractéristiques du cancer est la prolifération rapide de cellules anormales (OMS, 2012). En effet, selon le concept proposé par Hanahan et Weinberg, les six propriétés caractéristiques des cellules tumorales aboutissant à une indépendance de croissance, une insensibilité aux signaux antiprolifératifs, une résistance à la mort cellulaire, une prolifération illimitée, une capacité accrue à induire l'angiogenèse et une propension à l'invasion et à la dissémination, sont imputables à des anomalies de la signalisation. A ces six propriétés s'ajoutent deux caractéristiques : la capacité de reprogrammation du métabolisme énergétique et l'échappement au système immunitaire (Hanahan & Weinberg, 2011), montrent que les cellules cancéreuses ont une propriété différente des cellules saines.

Sous l'hypothèse d'une sélection positive ($d_N > d_S$) la valeur de la probabilité pour les témoins est de 0,489 et pour les TB et TM sont égales à 1 avec des valeurs de p respectives (0,02 ; $0,00 \leq 0,05$). Donc à partir de ces résultats, l'hypothèse de départ est acceptée par conséquent les substitutions au niveau des témoins, des tumeurs bénignes et malignes suivent la sélection positive de Nei qui favorise les remplacements d'acides aminés (Hughes et Nei, 1988). Cela est conforme aux résultats de Doupa *et al.* (2015). Le *MT-CYB* 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. L'analyse de l'évolution moléculaire révélant que le *MT-CYB* est sous sélection positive, est caractérisée par des valeurs du D de Tajima entre témoins (-0,07919 ; p=0,53100), TB (-0,11377 ; p=0,54900) et TM (-0,10204 ; p=0,56300) sont non significativement négatives. Les valeurs de F_s de F_u entre les témoins (0,34677 ; p=0,45400), TB (0,21179 ; p=0,46200) et TM (0,29972 ; p=0,45800) sont non significativement positives. Par contre ceux de R_2 de Ramos entre témoins (0,16259 ; p=0), TB (0,16105 ; p=0) et TM (0,16260 ; p=0) sont significativement positives indiquant un excès d'allèles rares, cohérent avec une sélection positive et dont la positivité est confirmée par le ratio dN/dS (Chloé *et al.*, 2013). Les courbes de mismatch distributions ont montrées une distribution multimodale pour les tumeurs malignes. Pour tester la qualité d'ajustement de la distribution, les valeurs du SSD et le Raggedness ont été calculé et ceux-ci révèlent positives et non significatives. Ces résultats montrent qu'il n'y a pas d'écart entre les valeurs espérées et celles observées suggérant ainsi la signature d'une population en croissance, indiquant un signal de croissance rapide des cellules tumorales.

CONCLUSION PARTIELLE

Tous les cancers surviennent à la suite de changements intervenus dans la séquence d'ADN du génome des cellules cancéreuses. Dans le dernier quart du XX^{ème} siècle, nous avons beaucoup appris sur ces mutations et sur les gènes anormaux qui opèrent dans les cancers, ainsi sur l'identification des mutations impliquées dans la genèse et l'évolution des tumeurs. Dans le cas de notre étude portant sur les mutations somatiques du *MT-CYB*, plusieurs mutations ont été décrites aussi bien au niveau des séquences des tumeurs malignes qu'au niveau des séquences de tumeurs bénignes cela témoignant l'implication du *MT-CYB* dans les cancers en particulier dans les tumeurs malignes et bénignes du sein. En revanche, le *MT-CYB* est moins impliqué dans les tumeurs bénignes du sein, par rapport aux tumeurs malignes. Connaissant le rôle de la mitochondrie dans l'apoptose, la présence de ces mutations pourrait contribuer à altérer la réponse cellulaire aux agents anticancéreux.

La prémisse est que les cellules cancéreuses ont besoin de glucose pour se développer, et la glutamine est un acide aminé non essentiel qui peut être synthétisé à partir du glucose. Comme le glucose provient des glucides, éliminer les glucides affame littéralement les cellules cancéreuses. Donc un régime nécessitant l'élimination des glucides, remplacés par des protéines et des graisses saines, serait rien de moins qu'un traitement anti-cancer sans les

médicaments. Mais aussi faire diminuer la progression tumorale des patientes, les thérapies dirigées contre le métabolisme de la glutamine seront de plus en plus efficaces.

**CHAPITRE III : DIVERSITE ET DIFFERENCIATION
GENETIQUE DE L'EXON 15 DU GENE *BRAF*
DANS LES TUMEURS DU SEIN.**

INTRODUCTION

BRAF est un proto-oncogène impliqué dans la voie de signalisation intracellulaire KRAS MAP-kinase. L'activation de récepteurs membranaires par liaison avec leurs ligands spécifiques induit une activation en cascade de cette voie et la stimulation de plusieurs fonctions cellulaires. Cela se produit dans de nombreux types de cellules (Davies *et al.*, 2002). *BRAF* est normalement activé par les protéines RAS. Il peut également être activé par des mutations dites "gain de fonction" ou "activatrices" ; le proto oncogène devient alors un oncogène. Des mutations activatrices du gène *BRAF* ont été détectées pour la première fois dans des tumeurs humaines il y a une dizaine d'années (Davies *et al.*, 2002), et leur fréquence varie beaucoup selon le type tumoral. Les mutations apparaissent généralement au cours des phases initiales de l'oncogenèse (Jean, 2012). Les mutations de *BRAF* sont majoritairement situées sur le segment activateur de l'exon 15. Il s'agit de mutations acquises, somatiques et non germinales (Dhomen *et al.*, 2010). L'absence de mutation germinale peut être expliquée grâce aux expériences de génétique moléculaire effectuée chez la souris : les mutations de *BRAF* induisent une létalité embryonnaire (Dhomen *et al.*, 2010). La mutation la plus fréquente est une mutation ponctuelle localisée au niveau de l'exon 15 (la thymine [T] 1799 a été transformée en adénine [A] – gTg/gAg) substituant une valine (V) en acide glutamique à la position 600 de la protéine (V600E) ; cette mutation est retrouvée dans la grande majorité des cancers ayant une forme *BRAF* mutée (Davies *et al.*, 2002). Les mécanismes d'acquisition de la mutation V600E de la protéine sont probablement liés à des mécanismes alternatifs qui ne sont pas encore identifiés. La protéine mutée *BRAF* V600E a une activité kinase 500 fois supérieure à la forme sauvage de BRAF, ce qui stimule la phosphorylation de la protéine ERK et la signalisation cellulaire de façon démesurée (Davies *et al.*, 2002). Mis à part la mutation V600E, d'autres mutations somatiques de *BRAF* ont été décrites dans les mélanomes humains :

Tableau VII : Mutations somatiques de *BRAF* et leurs fréquences dans les mélanomes humains

Nature de mutations	Fréquence des mutations
<i>BRAF</i> V600K (Franck & Lionel, 2018)	15 %
<i>BRAF</i> N581S (Zehir <i>et al.</i> , 2017)	11%

Tableau VII (suite 1) : Mutations somatiques de BRAF et leurs fréquences dans les mélanomes humains	
<i>BRAF</i> G469R (Hodis <i>et al.</i> , 2012)	10,1%
<i>BRAF</i> G593S (Nikolaev <i>et al.</i> , 2012)	10,1%
<i>BRAF</i> P75L (Krauthammer <i>et al.</i> , 2012)	10,1%
<i>BRAF</i> P731S (Hodis <i>et al.</i> , 2012)	10,1%
<i>BRAF</i> N581T (Krauthammer <i>et al.</i> , 2012)	9,2%
<i>BRAF</i> D594H (Marieke <i>et al.</i> , 2016)	7,4%
<i>BRAF</i> N594G (Ambika <i>et al.</i> , 2017)	7%
<i>BRAF</i> V741I (Ambika <i>et al.</i> , 2017)	7%
<i>BRAF</i> G466E (Ambika <i>et al.</i> , 2017)	7%
<i>BRAF</i> A598V (Xiaowen <i>et al.</i> , 2017)	5,3%
<i>BRAF</i> G469A (Chapman <i>et al.</i> , 2011)	4%
<i>BRAF</i> K601N (Chapman <i>et al.</i> , 2011)	4%
<i>BRAF</i> G596R (Xiaowen <i>et al.</i> , 2017)	3,4%
<i>BRAF</i> G596D (Xiaowen <i>et al.</i> , 2017)	3,4%
<i>BRAF</i> S602P (Xiaowen <i>et al.</i> , 2017)	3,2%
<i>BRAF</i> S605N (Xiaowen <i>et al.</i> , 2017)	3,2%
<i>BRAF</i> S616F (Xiaowen <i>et al.</i> , 2017)	3,2%
<i>BRAF</i> I592T (Xiaowen <i>et al.</i> , 2017)	3,2%
<i>BRAF</i> V590A (Xiaowen <i>et al.</i> , 2017)	3,2%
<i>BRAF</i> S607F (Xiaowen <i>et al.</i> , 2017)	3,2%

Tableau VII (suite 2) : Mutations somatiques de BRAF et leurs fréquences dans les mélanomes humains	
<i>BRAF</i> S602F (Xiaowen <i>et al.</i> , 2017)	3,2%
<i>BRAF</i> V600R (Oliver <i>et al.</i> , 2013)	3%
<i>BRAF</i> H585Y (Angela <i>et al.</i> , 2016)	2,1%
<i>BRAF</i> S607P (Angela <i>et al.</i> , 2016)	2,1%
<i>BRAF</i> D594N (Zheng <i>et al.</i> , 2015)	2%
<i>BRAF</i> G469E (Wan <i>et al.</i> , 2004)	1,8%
<i>BRAF</i> L597Q (Voskoboynik <i>et al.</i> , 2016)	1%
<i>BRAF</i> K601E (Voskoboynik <i>et al.</i> , 2016)	1%
<i>BRAF</i> D594G (Wan <i>et al.</i> , 2004)	0,6%
<i>BRAF</i> L597S (Projet AACR GENIE, 2017)	0,32%
<i>BRAF</i> L597R (Projet AACR GENIE, 2017)	0,32%

Dans les mélanomes mutés pour *BRAF*, 74 à 90 % sont V600E et 16 à 29 % sont V600K. En fonction des études, les proportions d'un type de mutation par rapport à un autre sont légèrement différentes. L'acide aminé V600 de *BRAF* est situé dans le domaine d'activation de la kinase, près des résidus thréonine 599 et sérine 602 sur lesquels la phosphorylation provoque l'activité kinase. La mutation V600E pourrait ainsi stimuler la phosphorylation de la thréonine 599 et de la sérine 602. Une autre des hypothèses du mécanisme d'activation incontrôlée est l'augmentation de l'exposition du segment d'activation lorsqu'un petit acide aminé hydrophobe (la valine) est remplacé par un résidu hydrophile (l'acide glutamique), (Christine & Lionel, 2012). Le gène *BRAF* est muté chez la majorité des patients ayant un mélanome et chez une minorité de patients ayant un cancer du colon et des poumons (Wang *et al.*, 2015). Dans ce chapitre, l'hypothèse d'une existence de mutations nucléotidiques

impliquées dans les tumeurs du sein chez les femmes sénégalaises a été émise. Pour cela l'exon 15 du gène *BRAF* qui est un gène nucléaire a été retenu pour tester cette hypothèse.

III.1 METHODOLOGIE

III.1.1 Patientes et prélèvements

L'étude porte sur soixante six (66) prélèvements chirurgicaux composés de tumeurs malignes et tumeurs bénignes et douze (12) prélèvements de sang qui constitue des témoins issus de patientes qui sont prises en charge à l'institut de cancérologie de l'hôpital Aristide Le Dantec. Les prélèvements ont été effectués chez ces patientes après un consentement éclairé et écrit selon une forme standardisée. Les échantillons ont été conservés dans de l'alcool 96%.

III.1.2 ETUDE GENETIQUE

III.1.2.1 Extraction de l'ADN

✓ Des tissus :

L'extraction d'ADN des tissus mammaires (TB et TM) a été réalisée grâce à la méthode Standard Qiagen (Kit Qiagen Dneasy Tissue). Les tissus ont été broyés dans 180 µl de tampon de digestion (ATL) contenant des détergents qui entraînent une dissociation des tissus et une individualisation des cellules. 20 µl de protéinase K ont été ajoutés pour dégrader toutes les protéines, après une incubation à 55°C pendant toute une nuit. Les débris tissulaires ont été éliminés après centrifugation rapide et récupération du surnageant. À cette solution, 200 µl de tampon de lyse cellulaire (AL) ont été ajoutés puis un passage immédiat au vortex et une incubation pendant 10 minutes à 70°C. La phase suivante consistait à ajouter 200µl d'éthanol absolu 100%, à vortexer et à transvaser le mélange obtenu sur une colonne que nous avons placée au préalable sur un tube collecteur de 2 ml (fourni dans le Kit), puis à centrifuger à 1361,35688 radian/seconde pendant une minute pour retenir l'ADN au niveau de la membrane de la colonne. En effet, l'ADN chargé négativement se fixe, par interactions ioniques, sur la membrane de silice chargée positivement. Par contre les protéines, les lipides et les polysaccharides sont éliminés. L'ADN fixé sur la colonne a été ensuite purifié pour éliminer toutes traces de contaminant. Ce lavage a été réalisé par ajout successif de 500 µl de chacun des 2 tampons (AW1 et AW2) qui passent à travers la membrane par centrifugation à 1361,35688 radian/seconde pendant respectivement 1 et 3 minutes. 50 µl de tampon AE au préalable incubé à 70°C pour augmenter le rendement de 15 à 20% a été directement versé sur la membrane que nous avons placée sur un tube de 1,5 ml pour recueillir l'ADN. Juste après cette étape l'ADN est conservé à -20°C. La qualité de l'ADN a été vérifiée par migration

électrophorétique à partir d'un gel d'agarose de 1,5% à 100 volts pendant 30 min. Le gel a été placé sous UV après un bref passage au bromure d'Ethidium.

✓ **Du sang :**

Pour l'extraction des prélèvements du sang, le même protocole a été appliqué à la seule différence qu'étant donné que le sang est constitué de cellules déjà individualisées, 20 µl de protéinase K et 200 µl de tampon AL ont été directement ajoutés après avoir prélevé 200 µl du liquide biologique.

III.1.2.2 Choix du gène étudié

De nombreuses découvertes ont été faites ces dernières années dans la compréhension de la maladie cancéreuse. En particulier, certaines altérations génétiques impliquées dans le développement du cancer ont pu être identifiées. Il est maintenant clair que des mutations retrouvées au niveau des gènes des cellules cancéreuses peuvent être associées au développement de certains types de cancers. Ces découvertes ont permis de développer des traitements ciblant spécifiquement ces altérations ; c'est le cas notamment pour la mutation présente sur le gène *BRAF*.

L'intérêt de la recherche des mutations du gène *BRAF* est divers :

- ✓ un intérêt diagnostique : la recherche de la mutation *BRAF* peut être utile pour poser le diagnostic. C'est le cas par exemple dans la leucémie à tricholeucocytes ou dans certains cancers thyroïdiens.
- ✓ un intérêt pronostique : elle revêt aussi dans certains cas un intérêt pronostic pour le clinicien, en particulier dans les cancers papillaires de la thyroïde, les cancers colorectaux ou les mélanomes.
- ✓ un possible intérêt pour le conseil génétique (hypothèse à confirmer) : la recherche de cette mutation permet aussi, dans le cancer colorectal par exemple, de savoir si ce cancer possède ou non une origine génétique qui pourrait expliquer sa survenue, et ainsi de pouvoir proposer un suivi approprié aux autres membres de la famille du patient.
- ✓ un intérêt thérapeutique : grâce à la détection de la mutation du gène *BRAF*, il est possible d'utiliser des traitements ciblés sur cette altération génétique, chez les patients porteurs de la mutation.

III.1.2.3 ANALYSES MOLÉCULAIRES

Les séquences de l'exon 15 du gène *BRAF*, des trois groupes (tumeurs malignes, tumeurs bénignes et témoins), sont minutieusement vérifiées, corrigées et alignées avec le logiciel BioEdit version 7.0.8 (Hall, 1999). L'alignement est en effet une étape importante de l'analyse des données. Il sert notamment, à mettre en évidence, les similitudes entre les séquences en retrouvant la position des délétions, des insertions et des substitutions probables.

Pour déterminer la position, la nature et la fréquence des mutations de l'exon 15 du gène *BRAF*, les données brutes du séquençage ont été soumises au logiciel Mutation Surveyor version 5.0.1 (www.softgenetics.com). En effet, ce logiciel compare les chromatogrammes soumis avec la séquence de référence du gène d'intérêt incorporée dans la base de données dudit logiciel mais également avec des séquences issues de la base de données Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Ainsi ce logiciel permet de détecter la présence de mutations hétérozygotes (het), d'insertions (in) et de délétions (del).

A l'universalité de la molécule d'ADN dans le monde vivant s'ajoute sa variabilité. Cette variabilité a pour origine des modifications au hasard de la séquence d'ADN (les mutations) qui peuvent avoir des conséquences sur l'activité cellulaire et sur l'organisme tout entier. Donc pour estimer la diversité génétique du gène *BRAF*, nous avons déterminé le nombre de sites variables et invariables, le nombre de sites informatifs, le nombre total de mutations, le nombre d'haplotypes (h), le nombre moyen de différences nucléotidiques (k), la diversité haplotypique (hd) et nucléotidique (π), grâce au logiciel DnaSP version 5.10 (Librado & Rozas, 2009). Les fréquences nucléotidiques et la nature des mutations (% de transitions et de transversions) ont été calculées avec le programme MEGA version 6.06 (Tamura *et al.*, 2013). Les séquences nucléotidiques du gène *BRAF* sont transformées en séquences d'acides aminés grâce au logiciel MEGA version 6.06 (Tamura *et al.*, 2013), en utilisant le meilleur cadre de lecture. Le niveau de significativité des variations de fréquences d'acides aminés entre les trois groupes (témoins, les tumeurs bénignes et les tumeurs malignes) a été mis en évidence par le test χ^2 avec un niveau de significativité (P-value) de 0,05.

Les distances génétiques entre témoins vs TB, témoins vs TM ainsi que TB vs TM au niveau intra et inter groupes ont été explicitées par la distance génétique de Nei (Nei, 1998) grâce au logiciel MEGA version 6.06 (Tamura *et al.*, 2013). La détermination de l'indice de différenciation génétique (Fst) a été faite sous Arlequin version 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005). Le niveau de significativité du Fst a été retenu à 0,05.

Nous avons fait des tests démo-génétiques qui comparent le niveau d'ajustement entre la diversité aux trois groupes et des valeurs théoriques attendues. Parmi ces tests : le D de Tajima (Tajima, 1989), le D* et F* de Fu et Li (Fu & Li, 1993) et du H de Fay et Wu (Fay & Wu, 2000) et le R2 de Ramos (Ramos, 2002). Ces différents estimateurs s'obtiennent avec les programmes DnaSP version 5.10 (Librado & Rozas, 2009) et Arlequin version 3.5.1.3 (Excoffier et al., 2010). En choisissant comme hypothèse de départ que l'exon 15 du gène *BRAF* soit sous sélection positive, l'existence d'une quelconque sélection a été appréhendée par une positivité ($dN > dS$) grâce au logiciel MEGA 6 avec dN est le taux de substitution non-synonyme et dS est le taux de substitution synonyme. Ce test a été effectué en utilisant le modèle Nei-Gojobori et la méthode pairwise délétion. Une valeur de $P < 0,05$ a été considérée comme significative avec une valeur de bootstrap de 10000 réplifications. Après les tests démo-génétiques nous avons déterminé l'analyse de la disparité de distribution (Mismatch distribution), qui est la représentation graphique de la distribution de distances génétiques existant entre les individus. L'analyse de Mismatch s'accompagne de deux indices qui testent la qualité d'ajustement de la distribution. Ces indices sont la SSD (somme de carrées des déviations) et le Rag (indice d'irrégularité). Les graphes sont construits avec le logiciel DnaSP version 5.10 (Librado & Rozas, 2009). Les indices SSD et Rag ont été obtenus avec le logiciel Arlequin version 3.5.1.3 (Excoffier et al., 2010).

III.2 RÉSULTATS ET DISCUSSION

III.2.1 RÉSULTATS

III.2.1.1 Alignement des séquences nucléotidiques de l'exon 15 du gène *Braf*

Un total de 78 échantillons (12 témoins, 31 tumeurs bénignes et 35 tumeurs malignes) a été séquencé, aligné et analysé.

III.2.1.2 Nature et fréquence des mutations de l'exon 15 du gène *BRAF*

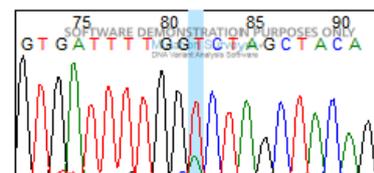
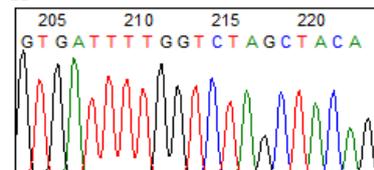
Nous constatons dans les tumeurs bénignes, les mutations L588H et D594V (1,5%), qui correspondent à un changement d'acide aminé en position 588 dans BRAF, avec une leucine (L) remplacée par une histidine (H) et D594V à un changement d'acide aminé en position 594 dans BRAF avec un acide aspartique (D) remplacée par une valine (V), Tableau VIII. Nous observons aussi dans les tumeurs malignes une mutation synonyme A598A, Tableau VIII.

Tableau VIII : Nature et fréquences des mutations

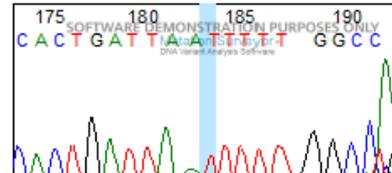
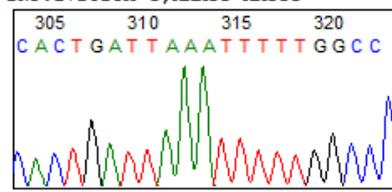
POSITION DES NUCLEOTIDES	ACIDES AMINES	NOMBRE
TEMOINS		
172023A>AT		2
TUMEURS BENIGNES		
171893T>TA ; mut het T1763A	L588H	1
171918T> TA ; mut het T1788A	G596G	1
171911A>AT ; mut het A1781T	D594V dbSNP 121913338	1
171912T>TC ; mut het T1782C	D594V	1
172023A>AT		3
172032C>CA		1
TUMEURS MALIGNES		
171924T>TA ; mut het T1794A	A598AA	1
172021A>AT		4
172020T>TA		1
172023A>AT		1
172032C>CA		1
172032C>CT		1

SNP: 171918T>TA, p. G596GG, GGCTCT>GGW

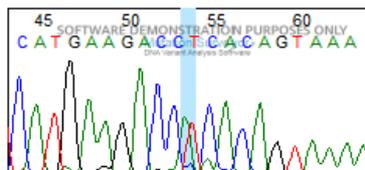
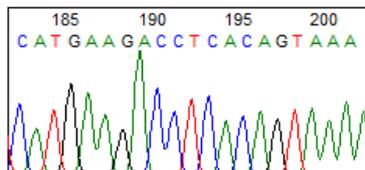
CT



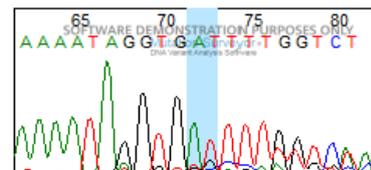
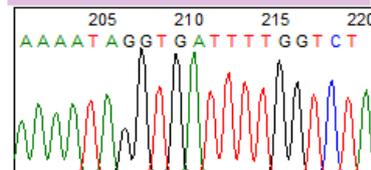
SNP: 172023A>T, AAATT>AATTT



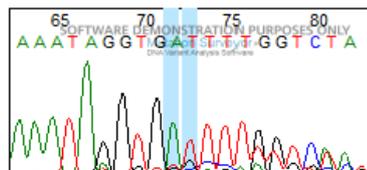
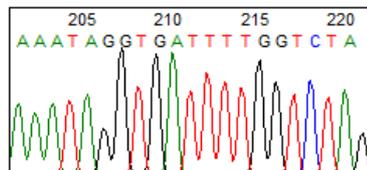
SNP: 171893T>TA, p. L588LH, CCTCA>CCW
CA



SNP: 171911A>AT, p. D594DV, TGATT>TGW
TT



SNP: 171912T>TG, p. D594DV, GATTT>GAK
TT



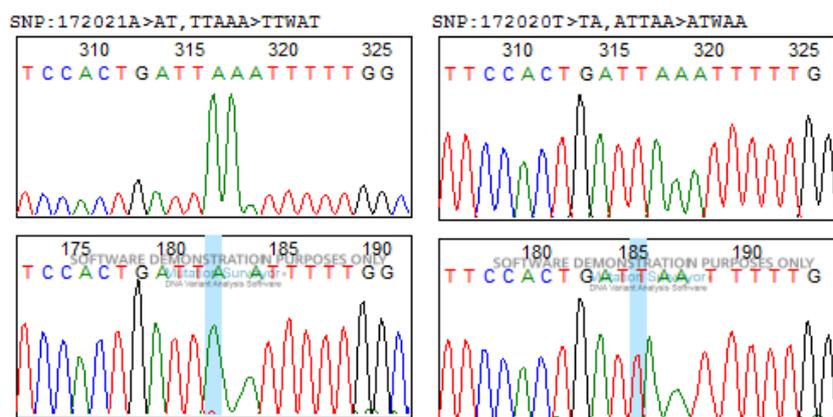


Figure 8 : Nature et fréquence des mutations de l'exon 15 du gène *BRAF*

III.2.1.3 Étude de la diversité génétique de l'exon 15 du gène *BRAF*

L'analyse de la diversité génétique de l'exon 15 du gène *BRAF* révèle une plus grande diversité du gène *BRAF* au niveau des tumeurs malignes et au niveau des TB comparés aux témoins. Cependant, nous remarquons une grande diversité chez les TM. Cette diversité accentuée sur les tumeurs malignes se matérialise par un nombre élevé de sites variables (20) par rapport aux TB(17) et aux témoins (8). Nous remarquons aussi un nombre total de mutations (26) pour les TM qui est plus élevé par rapport aux TB (22) et aux témoins (10). Un nombre d'haplotype plus élevé pour les TM (23) que les TB (18) et les témoins (6). Le nombre moyen de différences nucléotidiques (k) est plus élevé aux niveaux de TM (3,615) comparés aux TB (3,009) et aux témoins (2,045). Nous constatons que les pourcentages de transversions sont plus importants que ceux des transitions dans les trois groupes. Cependant nous remarquons que dans les pourcentages de transversions ils sont plus élevés chez les témoins et les tumeurs bénignes respectivement (73,42 %) et (78,82 %) par rapport aux TM (53,16%). Par contre chez les tumeurs malignes ceux des transitions (46,82%) sont plus élevés par rapport aux TB (21,18%) et aux témoins (26,51 %) (Tableau IX). L'analyse des indices de diversité révèle de fortes diversités haplotypiques de (0,818), (0,920) et (0,934) respectivement au niveau des tumeurs malignes, tumeurs bénignes et témoins contre de faibles diversités nucléotidiques (0,01130), (0,01662) et (0,01997) (Tableau IX).

Tableau IX : Valeurs des indices de diversité génétique de chaque population du gène *BRAF*

Indices de diversité	Témoins	Tumeurs bénignes	Tumeurs malignes
Taille échantillon, n	12	31	35
Nombres de sites, N	181	181	181
Nombre de sites invariables	173	164	161
Nombre de sites variables	8	17	20
Nombre de sites variables non-informatifs	6	10	9
Nombre de sites variables informatifs	2	7	11
Nombre total de mutations, Eta	10	22	26
Nombre total de mutations singletons Eta (s)	8	17	20
Nombre d'haplotypes, h	6	18	23
Nombre moyen de différences nucléotidiques (k)	2,045	3,009	3,615
Transitions	26,51 %	21,18%	46,82%
Transversions	73,42 %	78,82%	53,16%
R (Taux de Transitions /Taux Transversions)	0,318	0,238	0,807
Diversité haplotypique (hd)	0,818	0,920	0,934
Diversité nucléotidique (π)	0,01130	0,01662	0,01997

Dans le diagramme des fréquences nucléotidiques (Figure 9), on voit que les bases A et T sont les plus dominantes avec respectivement 27% et 35% pour tous les trois groupes par rapport aux bases C et G respectivement 17,5% et 20%. Nous remarquons aussi une prédominance de (A +T) dans tous les trois groupes avec un pourcentage de 62% par rapport à (C+G) 38%.

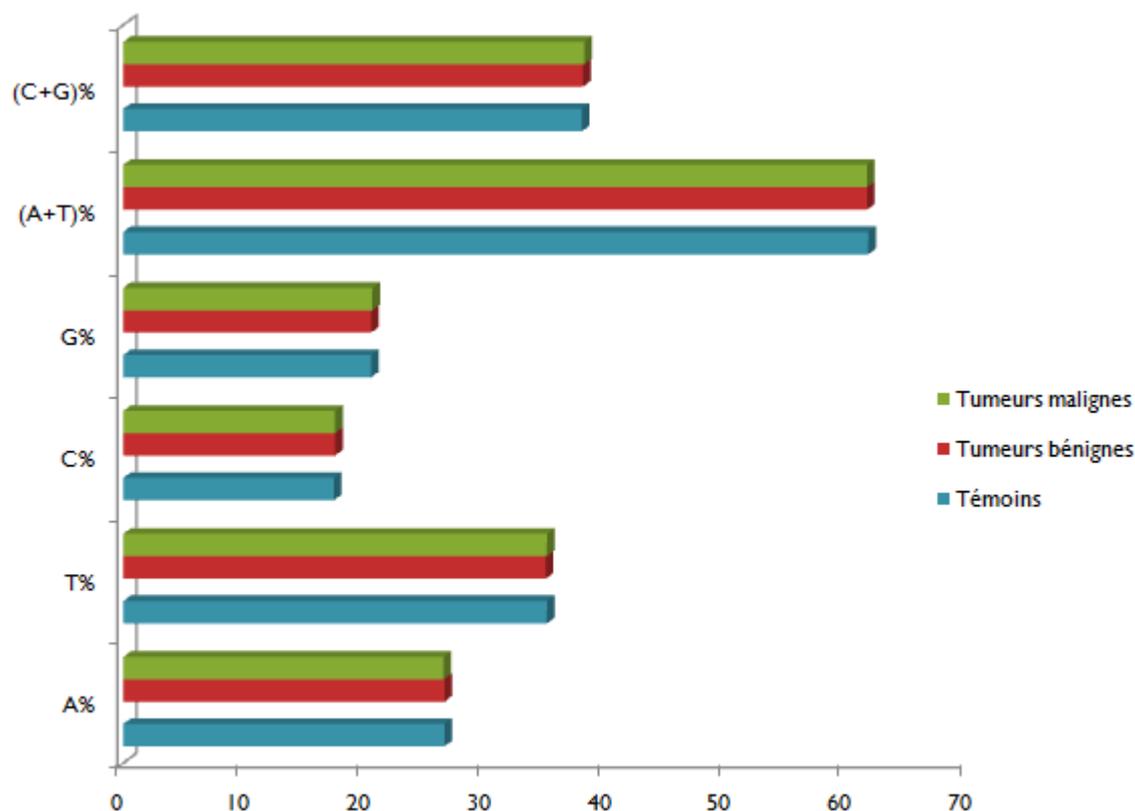


Figure 9 : Fréquences nucléotidiques des séquences du *BRAF*

III.2.1.4 Variabilité des acides aminés du *BRAF*

L'analyse de la diversité protéique inter-tissulaire (Tableau X) par la mise en évidence des variations d'acides aminés indique que, malgré les légères variations des fréquences des acides aminés entre les trois groupes aucune différence significative n'a pu être déterminée.

Tableau X : fréquences des acides aminés du *BRAF*

Acides aminés	Témoins	Tumeurs bénignes	Tumeurs malignes	P-value	P-value	P-value
				T vs TB	T vs TM	TB vs TM
Ala	5,15	5,07	5,15	0,9795	1	0,9795
Cys	0,14	0,05	0,05	0,8363	0,8363	1
Asp	5,01	5,02	5,00	0,9974	0,9974	0,9948
Glu	5,01	5,02	5,00	0,9974	0,9974	0,9948
Phe	9,74	9,49	9,68	0,9522	0,9886	0,9636
Gly	6,68	6,69	6,67	0,9977	0,9977	0,9955
His	3,34	3,34	3,34	1	1	1

Tableau X (suite) : fréquences des acides aminés du *BRAF*

Acides aminés	Témoins	Tumeurs bénignes	Tumeurs malignes	P-value	P-value	P-value
				T vs TB	T vs TM	TB vs TM
Ile	10,15	10,30	10,15	0,9721	1	0,9721
Lys	5,01	4,96	4,81	0,987	0,9478	0,9608
Leu	11,82	12,03	11,96	0,9635	0,9756	0,9878
Met	1,67	1,73	1,76	0,9738	0,9609	0,9871
Asn	0,00	0,05	0,10	0,823	0,7518	0,8972
Pro	1,67	1,94	2,05	0,886	0,8424	0,9556
Gln	3,34	3,34	3,34	1	1	1
Arg	3,34	3,40	3,34	0,9812	1	0,9812
Ser	10,15	10,30	10,30	0,9721	0,9721	1
Thr	6,68	6,47	6,34	0,9522	0,9224	0,9701
Val	5,01	5,02	5,00	0,9974	0,9974	0,9948
Trp	3,34	3,34	3,34	1	1	1
Tyr	2,78	2,43	3,34	0,8765	0,8182	0,7007

III.2.1.5 Différenciation génétique du gène *BRAF*

Les valeurs de distance génétique (d) au niveau intra et inter tissulaire et le degré de différenciation génétique (Fst) entre témoins et tumeurs bénignes et entre témoins et tumeurs malignes ainsi que tumeurs bénignes et tumeurs malignes sont consignées dans le tableau XI.

L'analyse des distances génétiques entre témoins et tumeurs malignes ainsi que tumeurs bénignes et tumeurs malignes a révélé une faible distance génétique respective (d=0,0159), (0,0186), mais plus grande que celle entre témoins et tumeurs bénignes (d=0,0139).

Nous remarquons qu'à l'intérieure des tumeurs malignes et bénignes les valeurs de la distance génétique sont égales (d=0,02), supérieure à celles des témoins (d=0,01).

Nous constatons aussi que le degré de différenciation génétique montre un Fst qui est égale à 0 et non significatif (0 ; P-value=0,86486), (0 ; P-value=0,76577) et (0 ; P-value=0,48649) respectivement entre témoins et tumeurs bénignes, témoins et tumeurs malignes ainsi que entre tumeurs bénignes et tumeurs malignes.

Tableau XI: distances génétiques intra et inter-groupe et indice de différenciation (Fst) du gène *BRAF*

Groupes	Distances génétiques Intra-groupe	Distances génétiques Inter-groupe	Fst
Témoins	0,01	0,0139	0 P-value=0,86486
Tumeurs bénignes	0,02		
Témoins		0,0159	0 P-value=0,76577
Tumeurs malignes	0,02		
Tumeurs bénignes		0,0186	0 P-value=0.48649
Tumeurs malignes			

III.2.1.6 Tests de signature de sélection

Sous l'hypothèse d'une sélection positive ($dN > dS$) les valeurs de probabilités pour les témoins et tumeurs bénignes et tumeurs malignes sont respectivement (0,01), (0,037) et (0,064) avec des valeurs de p (1,023), (1,802) et (1,529) qui ne sont pas significatives. A partir de ces résultats, l'hypothèse de départ n'est pas acceptée par conséquent les substitutions au niveau du *l'exon 15 du BRAF* ne suivent pas la sélection positive.

Pour le D de Tajima les valeurs pour les témoins (-0,90996; p=0,2), TB (-0,99594; p=0,154) et TM (-0,86541; p=0,211) sont négatives non significatives.

Les tests de D^* et F^* de (Fu & Li) ainsi que le H de (Fay & Wu) sont négatives et non significatives pour les trois groupes; Les valeurs sont consignées dans le tableau XII.

Contrairement aux autres indices pour ceux de R^2 de Ramos les valeurs de témoins (0,16074; p=0,000), TB (0,16370; p=0,000) et TM (0,16088; p=0,000) sont significativement positives.

Tableau XII : valeurs du Tests de signature de sélection :

Paramètres	Témoins	Tumeurs bénignes	Tumeurs malignes	P-value Témoin	P-value TB	P-value TM
dN/dS	0,01	0,037	0,064	1,023	1,802	1,529
D de Tajima	-0,90996	-0,99594	-0,86541	0,2	0,154	0,211
D* de Fu et Li	-0,06286	-0,07713	-0,11543	0,46000	1,13637	0,48800
F* de Fu et Li	-0,07359	-0,05006	-0,06326	0,47100	0,45200	0,45500
H de Fay et Wu	-0,14000	-0,06436	-0,22133	0,35400	0,33500	0,33300
R2	0,16074	0,16370	0,16088	0,000	0,000	0,000

III.2.1.7 Analyse de la disparité de distribution (Mismatch distribution) de l'exon 15 du gène *BRAF*

La disparité de distribution (Mismatch distribution), des paires de base pour l'exon 15 du gène *BRAF* entre les trois groupes, montrent les fréquences attendues et observées (trait plein et pointillé respectivement) des différences par paire entre les échantillons (Figure 10). Sous l'hypothèse d'une population constante et d'une population en expansion, nous avons une distribution unimodale pour les témoins (Figure 10.a) et tumeurs bénignes (Figure 10.b) Cependant la distribution est multimodale pour les tumeurs malignes (Figure 10.c).

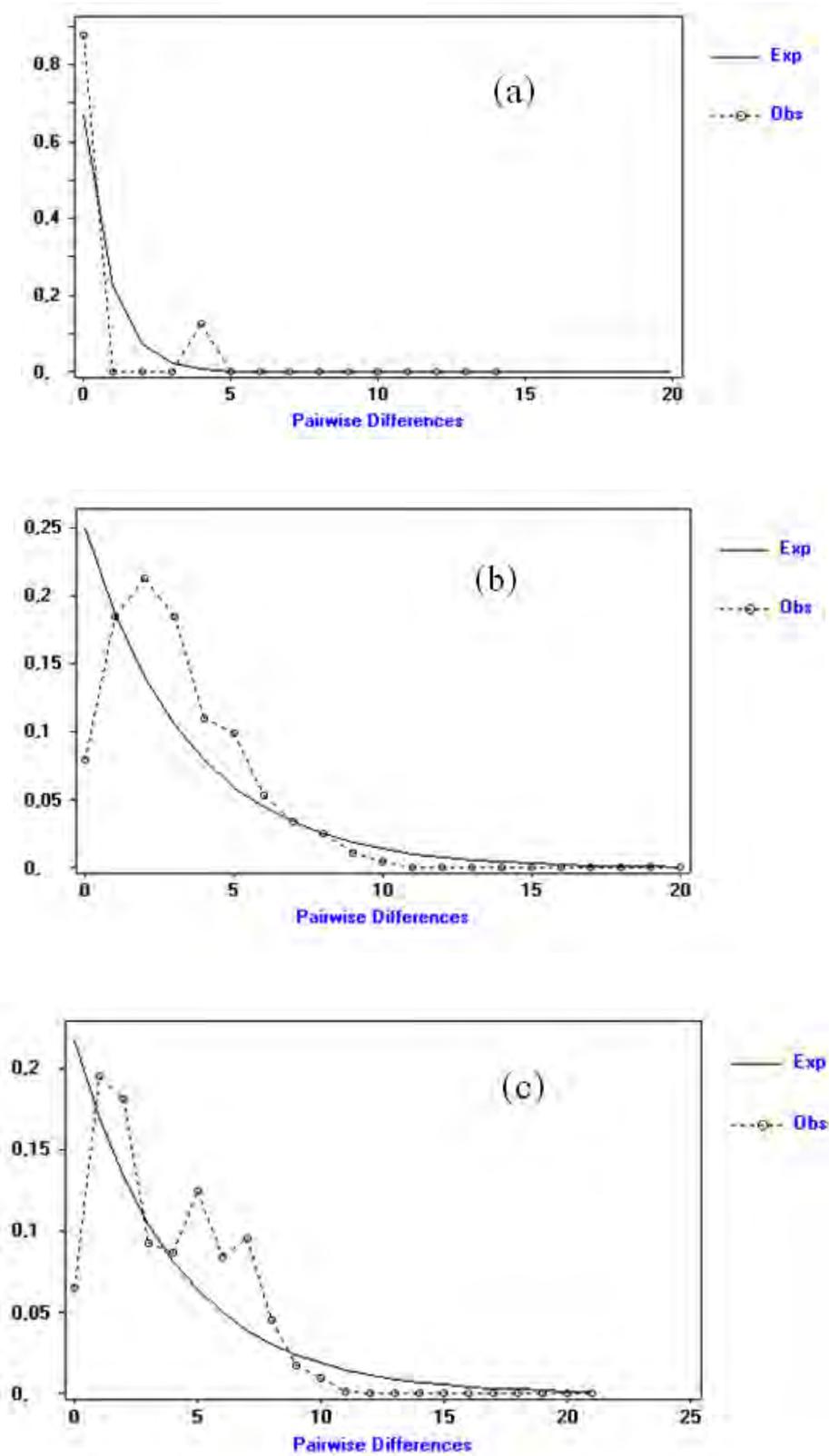


Figure 10 : courbes de mismatch distribution des témoins (a), tumeurs bénignes (b) et tumeurs malignes (c) du *BRAF*

Les valeurs SSD, témoins (0,01093 ; p=0,55000), TB (0,00346 ; p=0,59000) et TM (0,00988 ; p=0,48000) sont positives et non significatives pour les trois groupes (tableau XIII). Les valeurs les valeurs de Rag, témoins (0,05005; p = 0,78000), TB (0.02122; p = 0,83000) et TM (0,03150 ; p=0,36000) sont positives et non significatives (tableau XIII).

Tableaux XIII : valeurs des SSD, des Rag, et leurs P-values du gène *BRAF*

Paramètres	Témoins	Tumeurs bénignes	Tumeurs malignes
SSD	0,01093	0,00346	0,00988
	P-value= 0,55000	P-value= 0.59000	P-value= 0,48000
Rag	0,05005	0.02122	0,03150
	P-value= 0,78000	P-value= 0,83000	P-value= 0,36000

III.2.2 DISCUSSION

Nous avons procédé à l'identification de mutations, à l'étude de la variabilité génétique, de la différenciation génétique et de l'évolution génétique dans le but de déterminer l'implication de l'exon 15 du gène *BRAF* dans le cancer du sein chez les femmes sénégalaises. 35 patientes atteintes de cancer du sein et 31 atteintes de tumeurs bénignes du sein ont fait l'objet de cette étude. Les données de ces patientes ont été comparées à celles de 12 sujets de contrôle servant de témoins. *BRAF* qui est un gène nucléaire fait partie de la cascade de signalisation RAF-MEK-ERK qui régule la croissance cellulaire, la prolifération et la différenciation en réponse à une stimulation par des facteurs de croissance, des cytokines et des hormones (Robinson & Cobb, 1997). Pour ce rôle qui joue dans la cellule justifie l'étude de la variabilité de son exon 15 dans le contexte du cancer.

L'analyse à l'identification de mutation de l'exon 15 du gène *BRAF* nous a fait constater que *BRAF* a été muté dans (1,5%) de cas au niveau des tumeurs bénignes. Dans les tumeurs bénignes, la présence des mutations L588H et D598V qui correspondent à un changement d'acide aminé en position 588 dans *BRAF*, avec une leucine (L) remplacée par une histidine (H) et D598V à un changement d'acide aminé en position 598 dans *BRAF* avec un acide aspartique (D) remplacée par une valine (V). Il a été montré par Spring *et al.* (2006) que les mutations activatrices de *BRAF* sont fréquentes dans certaines tumeurs bénignes, tels que les polypes coliques festonnés, où leur fréquence atteint 51%, et les nævus mélanocytaires. Nous observons dans les tumeurs malignes une mutation synonyme A598A. Ces résultats sont différents avec la substitution *BRAF* V600E entraînant la substitution de l'acide glutamique par la valine, qui compte pour 80 % des mutations et qu'elle serait impliquée dans 66% des

mélanomes malins (Rajagopalan *et al.*, 2002), et aussi impliqué dans plusieurs autres cancers (Wang *et al.*, 2015). Dans la plupart des cas, les mutations de B-raf se localisent dans l'exon 15 (Kimura *et al.*, 2003). Dans notre étude de la variabilité de l'exon 15 du gène *BRAF*, plusieurs mutations ont été décrites aussi bien au niveau des séquences des tumeurs malignes qu'au niveau des séquences de tumeurs bénignes. Cette diversité accentuée sur les tumeurs malignes se matérialise par un nombre élevé de sites variables (20) par rapport aux TB(17) et aux témoins (8). Cela justifie que la capacité des cellules tumorales à envahir et à coloniser des sites distants est une caractéristique majeure différenciant les cancers malins et les tumeurs bénignes (Eccles; 2000). Nous avons eu des pourcentages de transitions (46,82%) aux niveaux des tumeurs malignes qui sont plus élevés par rapport aux tumeurs bénignes (21,18%) et aux témoins (26,51 %). Nos résultats sont en phase avec ceux de Benfodda *et al.*, (2016) travaillant sur le diagnostique du mélanome. Le séquençage de *BRAF* a montré la présence de très nombreuses mutations et 80% des mutations étaient des transitions C > T.

Une analyse comparative de la distance génétique et du degré de différenciation génétique (Fst), intra et inter tissu bénins et tissu cancéreux ainsi qu'aux témoins, de l'exon 15 de gène *BRAF* a été fait dans une série de 66 patientes porteuses des tumeurs mammaires. L'analyse des distances génétiques entre témoins et tumeurs malignes ainsi que tumeurs bénignes et tumeurs malignes a révélé une faible distance génétique respective (d=0,0159), (0,0186), mais plus grande que celle entre témoins et tumeurs bénignes (d=0,0139). Et aussi nous constatons que le degré de différenciation génétique montre un Fst qui est égale à 0 et non significatif (0 ; P-value=0,86486), (0 ; P-value=0,76577) et (0 ; P-value=0.48649) respectivement entre témoins et tumeurs bénignes, témoins et tumeurs malignes ainsi que entre tumeurs bénignes et tumeurs malignes. Aussi nous avons constaté qu'à l'intérieure des tumeurs malignes et bénignes les valeurs de la distance génétique sont égales (d=0,02), supérieure à celles des témoins (d=0,01). Cela pourrait être expliqué sur la façon où se comporte l'exon 15 du gène *BRAF* à l'intérieur d'une cellule bénigne et maligne par rapport à une cellule saine. Ceci montre que les cellules cancéreuses ont une propriété différente de cellules saines (Hanahan & Weinberg, 2011), et ça peut expliquer aussi que pendant la cancérogenèse, des modifications liées au cancer changent les structures internes des cellules mais aussi leur environnement. Il a été montré que les cellules cancéreuses sont moins rigides que les cellules normales du fait d'une réorganisation du cytosquelette (Lekka *et al.*, 1999). Les cellules du cancer du sein se déforment plus que des cellules non cancéreuses (Guck et al. (2005).

L'analyse de la diversité protéique inter-tissulaire par la mise en évidence des variations d'acides aminés indique que, malgré les légères variations des fréquences des acides aminés entre les trois groupes aucune différence significative n'a pu être déterminée. cela peut être expliqué par l'aspect du gène de l'ADN nucléaire qui a une réplication moins importante que celle du gène de l'ADNmt (Brown *et al.*, 1982).

Avec dN est le nombre de mutations non-synonymes par site et dS le nombre de mutations synonymes par site. Cette mesure indique la vitesse à laquelle les acides aminés constitutifs d'une protéine changent, par rapport à des changements synonymes. Sous l'hypothèse d'une sélection positive ($dN > dS$) les valeurs de probabilités pour les témoins et tumeurs bénignes et tumeurs malignes sont respectivement (0,01), (0,037) et (0,064) avec des valeurs de p (1,023), (1,802) et (1,529) qui ne sont pas significatives. Par conséquent les substitutions au niveau de l'exon 15 du *BRAF* ne suivent pas la sélection positive. Ces résultats montrent que dans cette étude le gène *BRAF* n'est pas sous sélection et que les cellules tumorales se multiplient plus rapidement que celles qui sont saines. Ça pourrait être dû à la différenciation entre les tumeurs et les paramètres cliniques des patientes, ou bien l'hypothèse selon laquelle une population rare de cellules pourrait piloter l'ensemble de la masse tumorale, tend à être prouvée par les études de ces dernières années. L'existence des cellules souches cancéreuses va modifier considérablement, à différents niveaux, la compréhension physiopathogénique du cancer mais aussi la prise en charge thérapeutique des patientes (Jin *et al.*, 2006).

Le nombre observé de différences entre haplotypes pris deux à deux a produit une distribution multimodale pour les tumeurs malignes qui caractérise une population de taille constante ou en expansion modérée. Par contre unimodale pour les témoins et les tumeurs bénignes qui suggère la signature d'une population en expansion. Pour tester la qualité d'ajustement de la distribution, les valeurs du SSD et le Raggedness ont été calculé et ceux-ci révèlent : SSD, témoins (0,01093 ; $p=0,55000$), TB (0,00346 ; $p=0,59000$) et TM (0,00988 ; $p=0,48000$) sont positives et non significatives pour les trois groupes. Et aussi les valeurs de Rag, témoins (0,05005; $p = 0,78000$), TB (0,02122; $p = 0,83000$) et TM (0,03150 ; $p=0,36000$) sont positives et non significatives. Ces résultats montrent qu'il n'y a pas d'écart entre les valeurs simulées et celles observées suggérant ainsi la signature d'une population en expansion. Ce qui nous permet de confirmer que les témoins et les tumeurs bénignes sont bien en expansion. Contrairement aux tumeurs malignes qui montrent une population de taille constante ou en expansion modérée d'après l'ajustement par les valeurs du SDD et du Raggedness et confirme le caractère non sélectif du *BRAF*. Pour le D de Tajima les valeurs pour les témoins

(-0,90996; $p=0,2$), TB (-0,99594; $p=0,154$) et TM (-0,86541; $p=0,211$) sont non significativement négatives. Les tests de D^* et F^* de (Fu & Li) ainsi que le H de (Fay & Wu) sont négativement non significatives pour les trois groupes. Pour ceux de R^2 de Ramos les valeurs de témoins (0,16074; $p=0,000$), TB (0,16370; $p=0,000$) et TM (0,16088; $p=0,000$) sont significativement positives. Ces valeurs positives et négatives des tests de neutralité sont dues à un excès de mutations rares. Ces résultats suggèrent une taille constante de population des cellules cancéreuses, comme le témoignent les distributions multimodales (Ramos-Onsins & Rozas, 2002).

CONCLUSION PARTIELLE

Les mutations génétiques et l'activation des voies moléculaires jouent un rôle vital dans la formation des tumeurs.

L'analyse à l'identification de mutation de l'exon 15 du gène *BRAF* nous a fait constater que *BRAF* a été muté dans (1,5%) de cas. Dans les tumeurs bénignes, la présence des mutations L588H et D598V. Nous avons observé dans les tumeurs malignes une mutation synonyme A598A. Ces résultats sont différents avec la substitution *BRAF* V600E, qui compte pour 80 % des mutations et qu'elle serait impliquée dans 66% des mélanomes malins (Rajagopalan *et al.*, 2002).

Nos résultats ont montré que les mutations somatiques de ce gène *BRAF* étaient moins fréquentes chez les patientes sénégalaises atteintes des tumeurs qu'elles soient bénignes ou malignes du sein. Cela approuve l'implication de ce gène dans le cancer du sein. Cependant *BRAF* est moins impliqué dans les tumeurs bénignes qu'aux malignes. Des questions se posent dans quelles patientes doit-on rechercher des altérations de ce gène, et quelles sont les méthodes de recherche les plus sensibles, les plus spécifiques et les moins coûteuses ? Avec la technologie moderne il serait de ce fait trouver une thérapie ciblé à une méthode de détection particulière.

BRAF n'est pas sous sélection malgré que les cellules tumorales se multiplient plus rapidement que celles qui sont saines. 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.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les techniques de la biologie moléculaire et la génétique sont devenues désormais des outils clés dans le diagnostic des différents types de cancers. Elles permettent par la recherche des mutations de mieux étudier la différenciation et l'évolution des cancers en particulier le cancer du sein afin de trouver des thérapies ciblées.

Dans le cadre de notre étude l'utilisation de deux marqueurs de nature différente aux différentes tumeurs du sein permet de mieux comprendre et d'acquérir des informations nécessaires pour bien étudier cette maladie, devenue à l'heure actuelle un problème majeur de santé publique particulièrement chez les femmes sénégalaises (OMS, 2012).

Le travail réalisé dans cette thèse nous a permis dans un premier temps de faire une comparaison du polymorphisme, de la diversité, de la différenciation et de l'évolution génétique du *MT-CYB* entre les patientes atteintes de tumeurs bénignes, des tumeurs malignes du sein et des sujets de contrôle. Plusieurs mutations ont été décrites aussi bien au niveau des séquences des tumeurs malignes qu'au niveau des séquences de tumeurs bénignes. Et dans un deuxième cas on a fait la même démarche que la précédente étude avec l'exon 15 du gène *BRAF*. Nos résultats ont montré que les mutations somatiques de ce gène *BRAF* étaient moins fréquentes chez les patientes sénégalaises atteintes des tumeurs qu'elles soient bénignes ou malignes du sein. Cependant dans ces deux études les mutations étaient plus fréquents dans les tumeurs malignes que les bénignes. Mais aussi les mutations de *BRAF* sont approximativement faibles au niveau du cancer du sein contrairement aux mutations du gène *MT-CYB*. Donc nos résultats obtenus nous ont permis de conclure l'implication du gène *MT-CYB* dans les tumeurs de sein. Nous pouvons aussi conclure que le gène *MT-CYB* est plus impliqué dans le cancer du sein par rapport à l'exon 15 du gène *BRAF*. Une question importante se pose : quels sont les mécanismes moléculaires d'acquisition des ces mutations? Une meilleure compréhension de ces mécanismes permettra d'élargir le développement des thérapeutiques ciblées.

Connaissant le rôle de la mitochondrie dans l'apoptose, la présence de ces mutations pourrait contribuer à altérer la réponse cellulaire aux agents anticancéreux.

Ainsi, cette étude met en évidence l'intérêt d'utiliser un marqueur comme *BRAF* pour des analyses de diversité génétique au niveau du cancer du sein. Connue d'une manière générale qu'il est mutée chez en majorité à des patients ayant un mélanome. Dans 50 à 70% des cas, un mélanome est associé à une mutation affectant le gène *BRAF*, responsable de la prolifération cellulaire. Cette découverte a permis la mise au point de traitements ciblés, qui bloquent spécifiquement l'enzyme kinase *BRAF* mutée (inhibiteurs de *BRAF*) (Zhang *et al.*, 2009). Vu

que nous avons déjà montré que BRAF pourrait impliquer dans le cancer du sein, une étude qui permettra de mieux comprendre les mécanismes de cette implication permettrait de trouver de meilleures solutions thérapeutiques, pour la carcinogenèse mammaire comme fut le cas dans le mélanome. Et des questions se posent dans quelles patientes doit-on rechercher des altérations de ce gène, et quelles sont les méthodes de recherche les plus sensibles, les plus spécifiques et les moins coûteuses ? Avec la technologie moderne il serait de ce fait trouver une thérapie ciblé à une méthode de détection particulière.

Et aussi la mise en évidence des mutations appartenant à d'autres exons de ce même gène *BRAF*, permettrait de mieux étudier l'effet de ces mutations sur l'apparition du phénotype du cancer du sein.

Ainsi, les résultats obtenus de cette étude 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.

La prémisse est que les cellules cancéreuses ont besoin de glucose pour se développer, et la glutamine est un acide aminé non essentiel qui peut être synthétisé à partir du glucose. Comme le glucose provient des glucides, éliminer les glucides affame littéralement les cellules cancéreuses. Donc un régime nécessitant l'élimination des glucides, remplacés par des protéines et des graisses saines, serait rien de moins qu'un traitement anti-cancer sans les médicaments. Mais aussi faire diminuer la progression tumorale des patientes, les thérapies dirigées contre le métabolisme de la glutamine seront de plus en plus efficaces.

Et en fin Il va encore falloir développer notre connaissance de ces tumeurs de sein, pour bien comprendre les phénomènes et les mécanismes, des ces tumeurs dans le but de bien envisager des thérapies ciblées.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Adeyinka A, Nui Y, Cherlet T, Snell L, Watson PH & Murphy LC. 2002.** ActivatedMitogen-activatedProtein Kinase Expression duringHumanBreastTumorigenesis and Breast Cancer Progression. *Clin. Cancer Res.* **8**: 1747–1753
2. **Ambika Parmar , Harriet Feilotter , Tara D. Baetz. 2017.** Mélanome BRAF non classique: examen rétrospectif des caractéristiques de la maladie et de ses conséquences pronostiques. *Journal of clinical oncology.* 35, no.15 _suppl
3. **Ames N., M K Shigenaga, and L S Gold. 1993.** DNA lesions, inducible DNA repair, and cell division : three key factors in mutagenesis and carcinogenesis. *Environmental health perspectives,* 101 Suppl.
4. **Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R et Young IG.1981.** Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290 : 457-465.
5. **Angela M. Jones, Peter Ferguson, Jacqui Gardner, Serena Rooker, Tim Sutton, Antonio Ahn, Aniruddha Chatterjee, Vivienne M. Bickley, Makhdoom Sarwar, Patrick Emanuel, Diane Kenwright, Peter R. Shepherd, Michael R. Eccles. 2016.** *NRAS* and *EPHB6* mutation rates differ in metastatic melanomas of patients in the North Island versus South Island of New Zealand. *Oncotarget.* 7:41017 41030. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9351>
6. **Audrey Carrière, Anne Galinier, Yvette Fernandez, Maria-Carmen Carmona, Luc Pénicaud and Louis Casteilla. 2006.** Les espèces actives de l'oxygène : le *yin* et le *yang* de la mitochondrie. *Med Sci (Paris),* 22 1; 47-53
DOI: <https://doi.org/10.1051/medsci/200622147>
7. **Aulmann S, Adler N, Rom J. 2006.**"c-myc amplifications in primary breast carcinomas and their local recurrences". *J Clin Pathol* 59: 424-8.
8. **Aurore Toullec, Damien Gerald, Gilles Despouy, Brigitte Bourachot, Melissa Cardon, Sylvain Lefort, Marion Richardson, Guillem Rigail, Maria-Carla Parrini, Carlo Lucchesi, Dorine Bellanger, Marc-Henri Stern, Thierry Dubois, Xavier Sastre-Garau, Olivier Delattre, Anne Vincent-Salomon, and Fatima Mechta-Grigoriou. 2010.** Oxidative stress promotes myofibroblast differentiation and tumour spreading. *EMBO Mol Med.* 2(6): 211–230.
9. **Avruch J. 2007.** MAP kinase pathways: the first twentyyears. *BiochimBiophys Acta.* 1773:1150-60.
10. **Axelrod D., Smith J., Kornreich D., Grinstead E., Singh B., Cangiarella J., Guth AA. 2008.** Breast Cancer in Young Women. *Journal of the American College of Sureons.* 206 (6): 1193-1203.

11. **Bakkali C., Marchal A., Lesur-Schwander and Verhaeghe J. L. 2003.**Le cancer du sein chez la femme de 30 ans et moins. *Cancer/Radiothérapie*.7(3) : 153-159.
12. **Barbacid M. 1987.** ras genes. *Annu Rev Biochem* ; 56: 779-827.
13. **Barja G, Herrero A. 2000.** Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. *FASEB J.* 14: 312-318
14. **Beckman KB, Ames BN. 1997.** Oxidative decay of DNA. *J. Biol.Chem.* 272: 19633-19636.
15. **Benfodda M. Marinho E., Kuma R. Beaudoux O. Lamoril J. Reocreux M. Grange F. Deschamps L. Bensussan A. Merrouche Y. Soufir N. 2016.** MELADIAG : un panel de biomarqueurs d'ADN dédié au diagnostique du mélanome. *ELSEVIER*. <https://doi.org/10.1016/j.annder.2016.09.153>.
16. **Bertram J. S. 2001.** «The molecular biology of cancer». *Molecular Aspects of Medicine*. 21 (6):167-223.
17. **Blakely E.M., Mitchell A.L., Fisher N., Meunier B., Nijtmans L.G., Schaefer A.M., Jackson M.J., Turnbull D.M. & Fayler R.W. 2005.** A mitochondrial cytochrome b mutation causing severe respiratory chain enzyme deficiency in human and yeast. *Federation of European Biochemical Societies*. 272 (14): 3583-3592.
18. **Blankenship & Robert. 2009.** Molecular Mechanisms of photosynthesis. *Blackwell Publishing*. 43 (2): 124-132.
19. **Bloom H J. and W W Richardson. 1957.** Histologicalgrading and prognosis in breast cancer; astudy of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *British journal of cancer*, 11(3).
20. **Blume-Jensen P, Hunter T. 2001.**Oncogenic kinase signalling. *Nature*. 411(6835):355-65.
21. **Bont De, R. & van Larebeke, N. 2004.** Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* 19, 169-185.
22. **BrettesJP.,Mathelin C., Gairard B., Bellocq JP. 2007.** Cancer du sein. *Paris : Masson*.384 pages.
23. **Brown W.M., Prager E.M., Wang A., Wilson A.C., 1982.** Mitochondrial DNA sequences of Primates : tempo and mode of evolution. *J. Mol. Evol.*, 18, 225-239.
24. **Burkart, W., Jung, T. & Frasch, G. 2005.** Damage pattern as a function of radiation quality and other factors. *Comptes Rendus Biologies* 322, 89-101.

25. **Caldas C., S A Hahn, L T da Costa, M S Redston, M Schutte, A B Seymour, C L Weinstein, R H Hruban, C J Yeo, and S E Kern. 1994.** Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nature genetics*, 8(1).
26. **Calvo, S. E., Clauser, K. R. et Mootha, V. K. 2016.** MitoCarta2.0 : an updated inventory of mammalian mitochondrial proteins. *Nucleic acids research*, 44:D1251–D1257.
27. **Cancello G., Maisonneuve P., Rotmensz N., Viale G., Mastropasqua MG., Pruneri G., Veronesi P., Torrisi R., Montagna E., Luini A., Intra M., Gentilini O., Ghisini R., Goldhirsch A., Colleoni M. 2010.** Prognosis and adjuvant treatment effects in selected breast cancer subtypes of very young women (< 35 years) with operable breast cancer. *Annals of Oncology*.21: 1974-1981.
28. **Cancer Genome Atlas Network. 2012.**Comprehensivemolecular portraits of humanbreasttumours. *Nature* 490:61–70.
29. **Cann R.L., Brown W.M., Wilson A.C., 1984.** Polymorphic Sites And The Mechanism Of Evolution In Human Mitochondrial DNA. *Genetics*, 106, 479-499.
30. **Cavalli LR., Liang BC. 1998.** Mutagenesis, tumorigenicity, and apoptosis: are the mitochondria involved? *Mutation Research*. 398: 19-26.
31. **Chaffer CL, Weinberg RA. 2015.** How does multistep tumorigenesis really proceed? *Cancer Discov*; 5(1):22-24.
32. **Chapman PB, Hauschild A, Robert C. 2011.** Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* ; 364:2507-16.
33. **Chloé Vasseur, Alexandre Joannon, Stéphanie Aviron, Françoise Burel, Jean-Marc Meynard, Jacques Baudry.2013.** The cropping systems mosaic: How does the hidden heterogeneity of agricultural landscapes drive arthropod populations?. *Agriculture, ecosystems environment*, 166, 3-14.
34. **CIRC : International Agency for Research on Cancer. GLOBAL CANCER OBSERVATORY. 2018.** Consultable à l'URL : <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?projection=globe>
35. **CIRC; Le cancer dans le monde. Rapport, IARC Press, 2013, 354 pages.** Consultable à l'URL : [http : www.iarc.fr/fr/publications/pdfs-online/wcr/2003/Le cancer dans le monde pdf.](http://www.iarc.fr/fr/publications/pdfs-online/wcr/2003/Le_cancer_dans_le_monde.pdf)
36. **Clarke R, Dickson RB, Brunner N. 1990.**The process of malignant progression in human breast cancer. *Ann Oncol*. 1:401-407.

37. **Claus E.B., Risch N. 1991.** Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study. *The American Journal of Human Genetics*.48 (2): 232-242.
38. **Christine Longvert, Lionel Larue. 2012.** BRAF : biologie et fonction. *Correspondances en Onco-Théranostic - Vol. I - n°1.* Url : <http://www.edimark.fr/Front/frontpost/getfiles/18455.pdf>. Consulté le 07 octobre 2017.
39. **Collège Français des Pathologistes 2012.** Généralités sur les tumeurs. Url: http://campus.cerimes.fr/anatomiepathologique/enseignement/anapath_7/site/html/cours.pdf
40. **Coussens, L.M. & Werb, Z. 2002.** Inflammation and cancer. *Nature* **420**, 860-867.
41. **Daguet E, Malhaire C, Hardit C, Athanasiou A, El Khoury M, Thibault F, Ollivier.L, Tardivon A, 2008.** Dépistage du cancer du sein par IRM chez les femmes porteuses d'une mutation génétique. *Elsevier Masson*, 783-790.
42. **Dangou JM, Ndiaye-Ba N, Ndiaye PD. 2002.** Valeur diagnostique de la cytologie mammaire en pathologie tumorale. *Rev Afr Pathologie*.10: 42.
43. **Davies H, Bignell GR, Cox C. 2002.** Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*;417(6892):949-54.
44. **DialloS.2006.** Etude des facteurs de risques du cancer du sein diagnostiqués dans les hôpitaux de Bamako et Kati. Thèse Médecine. Université Bamako.
45. **Diarra Y. 2002.** Corrélation radio-clinique et anatomopathologique des nodules du sein. Thèse de médecine, Bamako; 10 : 57.
46. **Dikomey, E. & Brammer, I. 2000.** Relationship between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied for different growth states, dose rates and plating conditions in a normal human fibroblast line. *International Journal of Radiation Biology* **76**, 773 – 781.
47. **Dimauro S, Schon EA. Mitochondrial DNA mutations in human disease. 2001.** *Am J Med Genet* ; 106 : 18-26
48. **Desjardins S. 2010.** Analyse de gènes candidats au cancer du sein impliqués dans les interactions avec brca1 et brca2. Thèse de doctorat, Physiologie-Endocrinologie. Québec: *Université Laval*, 234 p.
49. **Dhomen N, Da Rocha Dias S, Hayward R. 2010.** Inducible expression of V600E BRAF using tyrosinase-driven Cre recombinase results in embryonic lethality. *Pigment Cell Melanoma Res* ;23(1):112-20.
50. **Donati M. B. 1995.** «Cancer and thrombosis: from phlegmasia alba dolens to transgenic mice». *Thrombosis and Haemostasis*. 74 (1) : 278-281.

51. Doupa, D., Badji, M.N., 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.
52. Doupa, D., Badji, M.N., Mbaye, F., Ka, S., Dem, A., Kane, M. and Sembène, M., 2015. Implication of the *Cytochrome b* Mutations in the Evolution of Breast Benign Tumors Among Senegalese Women. *International Journal of Genetics and Genomics*. 3(4): 36-42
53. Dumitrescu R.G., & Cotarla I. 2005. Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? *Journal of Cellular and Molecular Medicine*.9:208-221.
54. Eccles SA. 2000. Cell biology of lymphatic metastasis. The potential role of c-erbB oncogene signalling. *Recent Results Cancer Res*, 157: 41-54.
55. Excoffier, L. and Lischer, H.E.L., 2010. Arlequin suite, Ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.*, 10: 564-567.
56. Faitg Julie, Olivier Reynaud, Jean-Philippe Leduc-Gaudet et Gilles Gouspillou. 2017. Dysfonctions mitochondriales et vieillissement musculaire. *Med Sci (Paris)* ; 33 : 955–962
57. Fay J. C. and C.-I. Wu. 2000. Hitchhiking under positive Darwinian selection. *Genetics*, 155:1405–1413.
58. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. 2008. Cancer Incidence And Mortality Worldwide. *IARC. Cancer Base*.
59. Fitzgibbons PL, Henson DE, Hutter RV. 1998. Benign breast changes and the risk for subsequent breast cancer: an update of the 1985 consensus statement. Cancer Committee of the College of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med*. Dec; 122(12):1053-5).
60. Franck Gesbert and Lionel Larue. 2018. Le mélanome cutané. *Med Sci (Paris)* ; 34 : 407–416.
61. Freund L., Mirabel K., Annane and Mathelin C. 2005. Allaitement maternel et cancer du sein, Breastfeeding and cancer. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*. 33 (10): 739-744.
62. Frosina G. 2000. Overexpression of enzymes that repair endogenous damage to DNA. *European Journal of Biochemistry*. 267. 2135-2149.
63. Fu YX and Li WH. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Pub Med*. 133(3):693-709.
64. Futreal PA, Coin L, Marshall M, Hubbard T, Woostre R. 2004. A census of

- human cancer genes. *Nat Rev Cancer*; 4 : 177-83.
- 65. Giltane J & Balko J. 2014.** Rationale for targeting the Ras/MAPK pathway in triple-negative breast cancer. *Discov. Med.* **17**: 275–83
- 66. GLOBOCAN : GLOBAL CANCER OBSERVATORY. CIRC : International Agency for Research on Cancer. 2018.** Consultable à l'URL : <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?projection=globe>
- 67. GLOBOCAN, (2012).** Cancer du sein. Accès. Consultable à l'URL : <http://globocan.iarc.fr> Consulté le 29 novembre 2017.
- 68. Guck, J., Schinkinger, S., Lincoln, B., Wottawah, F., Ebert, S., Romeyke, M., Lenz, D., Erickson, H. M., Ananthakrishnan, R., Mitchell, D., K"as, J., Ulvick, S., and Bilby, C. 2005.** Optical deformability as an inherent cell marker for testing malignant transformation and metastatic competence. *Biophys J*, 88(5) :3689–3698.
- 69. Gueye Serigne Modou Kane , Mamour Gueye, Mariétou Thiam Coulibaly, Diana Mahtouk et Jean Charles Moreau. 2017.** Tumeurs bénignes du sein à l'unité de sénologie du centre hospitalier universitaire aristide le dentec de dakar (senegal). The Pan African Medical Journal. Url : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5660302/>.
- 70. Ha PK, Tong BC, Westra WH, Sanchez-Cespedes M, Parrella P, Zahurak M. 2002.** Mitochondrial C-tract alteration in premalignant lesions of the head and neck : a marker for progression and clonal proliferation. *Clin Cancer Res* ; 8 : 2260-5.
- 71. Habano, W., Sugai, T., Yoshida, T., Nakamura, S, 1999.** Mitochondrial gene mutation, but not large-scale deletion, is a feature of colorectal carcinomas with mitochondrial microsatellite instability. *Int J Cancer*, 83: 625-629.
- 72. Hachana M.R. 2009.** Contribution à l'étude de l'implication des virus et évaluation de leur valeur pronostique dans le cancer du sein de la femme dans la région du centre tunisien. Thèse Universités de Monastir. 214 pages.
- 73. Hall TA 1999.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- 74. Hall J., et Angele S. 1999.** Radiation, DNA damage and cancer. *Molecular Medecin Today.* 5 : 157-164.
- 75. Hall J., M. Lee, B Newman, J. Morrow, L. Anderson, B Huey, and M. King. 1990.** Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science*, 250(4988).

- 76. Hamdi-Cherif, E. Bidoli, S. Birri, A. Mahnan, S. Laouamri, Z. Zaidi, H. Boukharouba, D. Cherka, M. Rakeb, L. Kara, A. Ayat, S. Virdone, D. Serraino. 2014.** Le cancer à Sétif, Algérie, 1986–2010. *Journal Africain du Cancer / African Journal of Cancer* Volume 6, Issue 3, pp 166–173.
- 77. Hanahan D, Weinberg RA. 2000.** The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1):57-70.
- 78. Hanahan D, Weinberg RA. 2011.** Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5):64-74.
- 79. Hanawalt PC, Sarasin A. 1986.** Cancer prone hereditary diseases with DNA processing abnormalities. *Trends Genet* ; 2: 124-9.
- 80. Hendrick JW. 1987.** Intraductal papilloma of the breast *Surg Gynec Obstet*. 105: 215.
- 81. Higginson J. MC. 1992.** Human cancer; epidemiology and environmental causes. *Cambridge Monographs on cancer research*. Cambridge University Press. 387p.
- 82. Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, Arolid ST, Imielinski M, Theurillat J-P. 2012.** A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell*. 150:251–63.
- 83. Hoefflich KP, O'Brien C, Boyd Z, Cavet G, Guerrero S, Jung K, Januario T, Savage H, Punnoose E, Truong T, Zhou W, Berry L, Murray L, Amler L, Belvin M, Friedman LS & Lackner MR. 2009.** In vivo antitumor activity of MEK and phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors in basal-like breast cancer models. *Clin. Cancer Res*. **15**: 4649–4664
- 84. Huang T., Karsy M., Zhuge J., 2013 .***B-Raf* and the inhibitors: From bench to bedside. *J. Hematol. Oncol.* 6, 1-9.
- 85. Huang, J., Huang, L., Chen, Y.J., Austin, E., Devor, C.E., Roegiers, F., Hong, Y. 2011.** Differential regulation of adherens junction dynamics during apical-basal polarization. *J. Cell Sci*. 124(23): 4001--4013.
- 86. Hudson EK, Hogue BA, Souza-Pinto NC, Croteau DL, Anson RM, Bohr VA, Hansford RG 1998.** Age-associated change in mitochondrial DNA damage. *Free Rad. Res*. 29: 573-579
- 87. HUGHES, A. L., and M. NEI. 1988.** Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex loci reveals overdominant selection. *Nature* 335: 167-170. -. 1989a. Ancient interlocus exon exchange in the history of the HLA-A locus. *Genetics* 122:68 1-686.
- 88. IHGSC : International Human Genome Sequencing Consortium. 2004.** Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 431(7011):931-945. DOI:10.1038/nature03001

- 89. Ikawa S, Fukui M, Ueyama Y, Tamaoki N, Yamamoto T, Toyoshima K. 1988.** B-raf, a new member of the raf family, is inactivated by DNA rearrangement. *Mol Cell Biol.* 8(6):2651–2654.
- 90. Irby RB, Mao W, Coppola D, Kang J, Loubeau JM, Trudeau W, Karl R, Fujita DJ, Jove R and Yeatman TJ. 1999.** Activating SRC mutation in a subset of advanced human colon cancers. *Nat Genet* 21: 187-190.
- 91. Jean-François Emile. 2012.** Détection des mutations de BRAF dans les tumeurs humaines : méthodes, indications et perspectives. *Correspondances en Oncologie-Thérapeutique*; p4.URL : <http://www.edimark.fr/Front/frontpost/getfiles/18456.pdf>. consulté : 06 octobre 2017.
- 92. Jean-Marie Blanchard. 2003.** Des oncogènes aux régulateurs de la mitose : un changement de perspective dans notre vision des processus cancéreux. *Med Sci (Paris)*. 2003 February; 19(2): 187–199.
- 93. Jin L, Hope KJ, Zhai Q. 2006.** Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat Med*; 12 : 1167–74.
- 94. Kelsey JL, Bernstein L. 1996.** Epidemiology and prevention of breast cancer. *Annu Rev Public Health* ; 17:47-67.
- 95. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z. 2003.** High prevalence of *BRAF* mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res.* 63(7):1454-1457.
- 96. Krajcinovic M, Ghadirian P, Richer C, Sinnott H, Gandini S, Perret C, Lacroix A, Labuda D, Sinnott D. 2001.** Genetic susceptibility to breast cancer in french-canadians: Role of carcinogen-metabolizing and gene-environment interactions. *Int J Cancer*;92:220-225.
- 97. Krauthammer M, Kong Y, Ha BH, Evans P, Bacchiocchi A, McCusker JP. 2012.** Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat Genet.* 44:1006–14.
- 98. Kumle E., Weiderpass et Braaten T. 2002.** Use of oral contraceptives and breast cancer risk: the Norwegian–Swedish Women’s Lifestyle and Health Cohort Study, *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention.* 11 (11): 1375-1381.
- 99. Kunkel T.A., Loeb L.A., 1981.** Fidelity of mammalian DNA polymerases. *Science*, 213, 765-767.
- 100. LE BERRE L. 2005.** le cancer du sein : hormothérapeutiques et essais thérapeutiques. Thèse université de Nantes. Faculté de pharmacie. p173.

- 101. Lekka, M., Laidler, P., Gil, D., Lekki, J., Stachura, Z., and Hryniewicz, A. Z. 1999.** Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy. *Eur Biophys J*, 28(4) :312–316. 1.1.1, 1.3
- 102. Levine A.J., Puzio-Kuter A.M. 2010.** The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science*. 330 : 1340-1344.
- 103. Lewin Benjamin. 2004.** Genes VIII. *Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall.*
- 104. Librado, P. and Rozas, J. 2009.** DnaSP v5: A Software for Comprehensive Analysis of DNA Polymorphic Data. *Bioinformatics*, 25, 1451-1452.
- 105. Longnecker MP, Tseng M. 1998.** Alcohol, hormones, and postmenopausal women. *Alcohol Health Re World*. 22:185-9.
- 106. Ly M., Antoine M., André F., Callard P., Bernaudin J. F. & Diallo D.A. 2011.** Le cancer du sein chez la femme de l’Afrique sub-saharienne : état actuel des connaissances. *Bulletin du cancer*, 98, (7), 797-806.
- 107. MAC-GROGAN.G. 2003.** Les néoplasies mammaires non invasifs et invasifs: VIIeme journées Franco Africaines de pathologie : Niamey, 9-30.
- 108. Marc Billaud. 2012.** L’hétérogénéité intratumorale - Un obstacle darwinien à la médecine personnalisée ? *Med Sci (Paris)*, 1116-1119
DOI: <https://doi.org/10.1051/medsci/20122812023>
- 109. Marieke IG Raaijmakers, Daniel S. Widmer, Apurva Narechania , Ossia Eichhoff, Sandra N. Freiburger, Judith Wenzina, Phil F. Cheng, Daniela Mihic-Probst, Rob Desalle, Reinhard Dummer, et Mitchell P. Levesque. 2016.** Co-existence of *BRAF* and *NRAS* driver mutations in the same melanoma cells results in heterogeneity of targeted therapy resistance. *Oncotarget*. 7 (47): 77163-77174.
- 110. Mark GE, Rapp UR. 1984.** Primary structure of v-raf: relatedness to the srcfamily of oncogenes. *Science*. 224(4646):285–289.
- 111. Maximo V., Soares P., Seruca R., Rocha AS., Castro P., Sobrinho-Simoes M. 2001.** Microsatellite instability, mitochondrial DNA large deletions, and mitochondrial DNA mutations in gastric carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 32: 136-143.
- 112. 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.
- 113. McNally, S. & Martin, F. 2011.** Molecular regulators of pubertal mammary gland development. *Ann. Med.* 43, 212–234.

114. **Medina D. 1996.** Preneoplastic lesions in murine mammary cancer. *Cancer Res.* 36:2589-2595.
115. **Miyagi Yohei, Masahiko Higashiyama, Akira Gochi, Makoto Akaike, Takashi Ishikawa, Takeshi Miura, Nobuhiro Saruki, Etsuro Bando, Hideki Kimura. 2011.** Plasma Free Amino Acid Profiling of Five Types of Cancer Patients and Its Application for Early Detection. [journal.pone.0024143](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024143)
116. **MOMBELLI S. 2014.** Cancers du sein et Immunologie anti-tumorale. Thèse. Université De Reims Champagne-Ardenne. Ecole Doctorale Sciences des Technologie Santé. URL : www.theses.fr/2014REIMS041.pdf consulté le 29 novembre 2017.
117. **Monier, R. & Tubiana, M.2008.** Cancerogenese. Accroissement des connaissances et evolution des concepts. *Oncologie* 10, 319-347.
118. **Morgan A., Osborn GD., E-Saify W., Vaughan-Williams E. 2004** Young women with breast cancer; clinical, histopathological and prognostic Considerations. *Royal Glamorgan Hospital March.*114p.
119. **Moore, M.A. & Tsuda, H. 1998.** Chronically elevated proliferation as a risk factor for neoplasia. *European Journal of Cancer Prevention* 7, 353-385.
120. **MURRAY M. J., SHILO B. Z., SHIH C., COWING D., HSU H. W., WEINBERG R. A. 1981.** Three different human tumor cell lines contain different oncogenes. *Cell*, 25, 355-361.
121. **Naidu R, Wahab NA, Yadav M. 2002.**"Protein expression and molecular analysis of cmyc gene in primary breast carcinomas using immunohistochemistry and differential polymerase chain reaction". *Int J Mol Med* 9: 189-96.
122. **Nei M, Kumar S, Takahashi K. 1998.** The optimization principle in phylogenetic analysis tends to give incorrect topologies when the number of nucleotides or amino acids used is small. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:12390–12397.
123. **Nikolaev SI, Rimoldi D, Iseli C, Valsesia A, Robyr D, Gehrig C. 2012.** Exome sequencing identifies recurrent somatic MAP2K1 and MAP2K2 mutations in melanoma. *Nat Genet.* 44:133–9.
124. **Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki H, Ando A, Horii K, Koyama J, Utsunomiya S, Baba, and P Hedge. 1991.** Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science*, 253(5020).
125. **Olivier Bluteau, Pierre Laurent-Puig, Jessica Zucman-Rossi. 2001.** Altérations génétiques associées aux carcinomes hépatocellulaires : corrélations avec les paramètres anatomo-cliniques. *EM Consulte.* pp. 1067-1077

- 126. Oliver Klein. Arthur Clements. Alexander M.Menzies. Sandra O'Toole. Richard F.Kefford. Georgina V.Long. 2013.** BRAF inhibitor activity in V600R metastatic melanoma. *ELSEVIER. European Journal of Cancer. Volume 49, Issue 5.* 1073-1079.
- 127. OMS. (2012).** Cancer. Accès. Consultable à l'URL : https://www.iarc.fr/fr/media-centre/pr/2013/pdfs/pr223_F.pdf consulté le 29 novembre 2017.
- 128. OMS: Organisation Mondiale De La Sante 2003.** Pathology & genetics of tumors of the breast and female genital organs. Genève. *Organization Mondiale de la Santé.*
- 129. Orban TI, Olah E. 2003.** Emerging roles of BRCA1 alternative splicing. *Mol Pathol. Aug;56(4):191-7).*
- 130. Ozawa T. 1995.** Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and diseases. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1271: 177-189.
- 131. Page D.L., Steel C.M. et Dixon J.M. (1995).** ABC of breast diseases. Carcinoma in situ and patients at high risk of breast cancer. *British Medical Journal.* 310 (6971):39-42.
- 132. Pappalardo E & O'Regan R. 2014.** The PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer: targets, trials and biomarkers. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **6**: 154–66.
- 133. Parrella P, Seripa D, Matera MG, Rabitti C, Rinaldi M, Mazzei P. 2003.** Mutations of the D310 mitochondrial mononucleotide repeat in primary tumors and cytological specimens. *Cancer Lett;* 190 : 73-7.
- 134. Peltomäki P. & de la Chapelle A. 1997.** Mutations predisposing to hereditary non polyposis colorectal cancer. *Advanced Cancer Research.* 71: 93-119.
- 135. Polyak K & Metzger Filho O. 2012.** SnapShot: Breast Cancer. *Cancer Cell* **22**: 562–562.
- 136. Polyak K, Li Y, Zhu H, Lengauer C, Willson JK, Markowitz SD, 1998.** Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. *Nat Genet ;* 20 : 291-3.
- 137. Projet AACR GENIE: alimenter la médecine de précision par le biais d'un consortium international. 2017.** *Découverte du cancer ;* 7 (8): 818-831.
- 138. Puddu M. et Tafforeau J. (2005).** Opportunité de dépistage du cancer du sein chez les femmes de 40 à 49 ans Etat des connaissances et données disponibles pour le développement d'une politique de santé en Belgique. *IPH/EPI Reports Nr.* 001.

- 139. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. 2002.** Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature*. 418(6901):934
- 140. Rambau P.F., Chalya P.L., Manyama M.M. & Jackson K.J. 2011.** Pathological features of Breast Cancer seen in Northwestern Tanzania: A nine years retrospective study. *BMC Research Notes*. 4: 214.
- 141. Ramos-Onsins S.E. et Rozas J. (2002).** "Statistical properties of new neutrality tests against population growth." *Molecular Biology and Evolution* 19: 2092-2100.
- 142. Ramos JW. 2008.** The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 40: 2707-19.
- 143. Robinson, M.J. and M.H. Cobb. 1997.** Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol*. 9(2): p. 180-6.
- 144. Rochefort H. et Rouesse J. 2008.** How to reduce the incidence of breast cancer. *Bulletin de l'Académie nationale de médecine* ; 192 : 161-179.
- 145. Rohan T.E., Wong L-J., Wang T., Haines J. et Kabat G.C. 2010.** Do alterations in mitochondrial DNA play a role in breast carcinogenesis? *Journal of oncology*. 10: 1155-1166.
- 146. Roskoski R Jr. 2010.** RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 399(3):313–317.
- 147. Rushworth LK, Hindley AD, O'Neill E, Kolch W. 2006.** Regulation and role of Raf-1/B-Raf heterodimerization. *Mol Cell Biol*. Mar;26(6):2262-72.
- 148. Saini KS, Loi S, de Azambuja E, Metzger-Filho O, Saini ML, Ignatiadis M, Dancey JE & Piccart-Gebhart MJ. 2013.** Targeting the PI3K/AKT/mTOR and Raf/MEK/ERK pathways in the treatment of breast cancer. *Cancer Treat. Rev*. 39: 935–946.
- 149. Sarasin A, Renault G, Blanchet-Bardon C, Boue J, Dumez Y. 1988.** Le Xeroderma pigmentosum : caractéristiques cliniques génétiques et cellulaires. *médecine/sciences*; 4: 608-17.
- 150. Sarzi Emmanuelle & Rotig Agnès. 2010.** Mitochondrial genome instability and associated diseases. *Med Sci*; 26 : 171–176

151. Selak, M. A., Armour, S.M., MacKenzie, E.D., Boulahbel, H., Watson, D.G., Mansfield, K.D., Pan, Y., Simon, M.C., Thompson, C.B., and Gottlieb, E. (2005). Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-alpha prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* ; 7, 77–85.
152. Sellami A., M. Hsairi, T. Boudawara, N. Achour, R. Jlidi. 2007. Incidence des cancers dans le Gouvernorat de Sfax 2000-2002.
153. Shay JW, Werbin H. 1987. Les mutations de l'ADN mitochondrial sont-elles impliquées dans le processus cancérogène? *Mutat. Res.* , 186 : 149 -160.
154. Shinohara, M., Y. Adachi. 2010. Reactive oxygen generated by NADPH oxidase 1 (Nox1) contributes to cell invasion by regulating matrix metalloprotease-9 production and cell migration. *J Biol Chem* 285(7): 4481-4488.
155. Singer G, Oldt R 3rd, Cohen Y, Wang BG, Sidransky D, Kurman RJ, Shih IeM. 2003. Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 95(6):484-6.
156. Spitz, D.R., Azzam, E.I., Jian Li, J. & Gius, D. 2004. Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: A unifying concept in stress response biology. *Cancer and Metastasis Reviews* 23, 311-322.
157. Spring KJ, Zhao ZZ, Karamatic R et al. 2006. High prevalence of sessile serrated adenomas with BRAF mutations: a prospective study of patients undergoing colonoscopy. *Gastroenterology*;131(5):1400-7
158. Stattin P, Bylund A, Rinaldi S, Biessy C, Dechaud H, Stenman UH, Egevad L, Riboli E, Hallmans G & Kaaks R. 2000. Plasma insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-binding proteins, and prostate cancer risk: a prospective study. *Journal of the National Cancer Institute*921910–1917.
159. Tajima, F. 1989. Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics*, 123, 585-595.
160. Takahashi, S. Satoru Takahashi, Yoshihisa Ikeda, Naoya Kimoto, Eriko Okochi, Lin Cui, Minako Nagao, Toshikazu Ushijima, Tomoyuki Shirai. 2000. Mutation induction by mechanical irritation caused by uracil-induced urolithiasis in Big BlueR rats. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 447, 275-280.

- 161. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., et al. 2013.** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. The Society for Molecular Biology and Evolution, Oxford University, Oxford.
- 162. Tan X. X., Bondos S., Li L., Matthews K. S. 2002.** Transcription activation by Ultrabithorax Ib protein requires a predicted α -helical region. *Biochemistry* 41, 2774–2785
- 163. Theleyre, O. and F. Baklouti. 2004.** Oncogenic transcription factors as splicing regulators. *Med Sci (Paris)*. 20(11) : p.1014-9.
- 164. Thiam D. 2002.** Cancer du sein : étude clinique dans le service de gynécologie-obstétrique de l'HPG à propos de 43 cas. Thèse de Méd, Bamako, 122 : 120. URL : <http://www.keneya.net/fmpos/theses/2002/med/pdf/02M122.pdf>
- 165. Veronica Aedo Lopez, Athina Stravodimou, Sheila Unger, Lucien Perey, Khalil Zaman Rev. Mutations de BRCA1/2. 2016. Med Suisse; volume 12. 973-977**
- 166. Voet D. et Voet J. G. 2002.** *Biochimie*. Trad. de J'anglais par Y. Gaudemer. Paris: De Boeck Université, 1361 p.
- 167. Voskoboynik M, Mar V, Mailer S, Colebatch A, Fennessy A, Logan A. 2016.** Clinicopathological characteristics associated with BRAF(K601E) and BRAF(L597Q) mutations in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 29(2):222–8.
- 168. Wallace D.C. 2012.** Mitochondria and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 12, 685–698.
- 169. Wang Y.L., X. Dai, Y.D. Li, R.X. Cheng, B. Deng, X.X. Geng and H.J. Zhang. 2015.** Study of *PIK3CA*, *BRAF*, and *KRAS* mutations in breast carcinomas among Chinese women in Qinghai. *Genetics and molecular research: GMR.* 7p.
- 170. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM. 2004.** Mécanisme d'activation de la voie de signalisation RAF-ERK par des mutations oncogènes de B-RAF. *Cell* 116 : 855 – 867.
- 171. Warburg O. 1956.** "On the origin of cancer cells." *Science* 123(3191): 309-314.
- 172. Weigel MT, Dowsett M. 2010.** "Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction". *Endocr Relat Cancer* 17: R245-62.
- 173. Weinberg RA 2007.** The biology of cancer. Maintenance of genomic Integrity and the Development of Cancer. *E Z (Édit.) Taylor & Francis Group, New York.*

174. Xiaowen Wu ,Junya Yan ,Jie Dai ,Meng Ma ,Huan Tang ,Jiayi Yu ,Tianxiao Xu ,Huan Yu , Lu Si , Zhihong Chi ,Xinan Sheng , Chuanliang Cui ,Yan Kong and Jun Guo. 2017. Mutations in *BRAF* codons 594 and 596 predict good prognosis in melanoma. *Oncology letters*. [10.3892 / ol.2017.6608](https://doi.org/10.3892/ol.2017.6608).
175. Yang J, RA Weinberg. 2008. Epithelio-mesenchymal transition: at the crossroads of tumor development and metastasis. *Dev Cell*. 14 (6): 818-29.
URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18539112>
176. Zehir A, Benayed R, Shah RH, Syed A, Middha S, Kim HR, Srinivasan P, Gao J, Chakravarty D, Devlin SM, Hellmann MD, Barron DA, Schram AM, Hameed M 1, Dogan S 1, Ross DS 1, Hechtman JF 1, DeLair DF 1, Yao J 1, Mandelker DL Cheng DT, Chandramohan R, Mohanty AS, Ptashkin RN, Jayakumaran G, Prasad M, Syed MH, Rema AB, Liu ZY, Nafa K, Borsu L, Sadowska J, Casanova J, Bacares R, Kiecka IJ, Razumova A, fils JB, Stewart L, Baldi T, Mullaney KA, Al-Ahmadie H, Vakiani E, Abeshouse AA, Penson AV, Jonsson P, Camacho N, Chang MT, Gagné HH, Gross BE, Kundra R, Heins ZJ, Chen HW, Phillips S, Zhang H, Wang J, Ochoa A, Wills J, Eubank M, Thomas SB, Gardos SM, Reales DN, Galle J, Durany R, Cambria R, Abida W, Cercek A, Feldman DR, Gounder MM, Hakimi AA, Harding JJ, Iyer G, Janjigian YY, Jordanie EJ, Kelly CM, Lowery MA, Morris LGT, Omuro AM, Raj N, Razavi P, Shoushtari AN, Shukla N, Soumerai TE, Varghese AM , Yaeger R, Coleman J, Bochner B, Riely GJ, Saltz LB, Scher HI, Sabbatini PJ, Robson ME, Klimstra DS, Taylor BS, Baselga J, Schultz N, Hyman DM, Arcila ME, Solit DB, Ladanyi M, Berger MF. 2017. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med*. 23(6): 703–713. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5461196/>.
177. Zhang J, Yang PL, Gray NS. 2009. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 9(1):28–39.
178. Zheng G, LL Tseng, G Chen, Haley L, P Illei, CD Gocke, Eshleman JR, Lin MT. 2015. Détection clinique et catégorisation des mutations rares et concomitantes impliquant BRAF. *BMC Cancer*. 15 : 779. doi: 10.1186 / s12885-015-1811-y.

ANNEXES

ANNEXE 1 : FICHE CLINIQUE

Fiche Clinique

IDENTIFICATION PATIENT

Numéro d'ordre.....N° Dossier :

Nom :.....Prénom :.....Age (ans):

Date et lieu de Naissance :..... Adresse actuelle :

Poids (kg) :Taille (cm) :Ethnies :

Profession :État matrimonial :

ANTECEDENTS

DPR.....DDR.....

Gestité : parité.....

Ménopause

Antécédent médical particulier :

Exposition personnelle à un facteur de risque de cancer.....

Exposition professionnelle à un facteur de risque.....

Exposition environnementale à un facteur de risque.....

Notion de Maladie génétique.....

Notion de maladie héréditaire.....

Antécédent familial similaire..... ; degré de parenté.....

Antécédent familial de cancer..... ; lequel..... ; degré de parenté.....

ANNEXE II : PUBLICATIONS ISSUES DE LA THESE :

Ahmed Mohamed Mze, Fatimata Mbaye, Binta Keneme and Mbacke Sembene. 2017. Cytochrome b and beta-fibrinogen implication in the genetic evolution of breast malignant tumour in senegalese women. *Journal IJAR*. 5(7), 503-509. http://www.journalijar.com/uploads/192_IJAR-18568.pdf.

Ahmed Mohamed Mze, Fatimata Mbaye and Mbacke Sembene. 2019. Genetic Diversity and Structuring of the *BRAF* gene in Breast Tumors. *Eur J Med Res Clin Trials* 1: 1-11. <http://www.jscholaronline.org/articles/EJMRC/Genetic-Diversity.pdf>



RESEARCH ARTICLE

CYTOCHROME B AND BETA-FIBRINOGEN IMPLICATION IN THE GENETIC EVOLUTION OF BREAST MALIGNANT TUMOUR IN SENEGALESE WOMEN.

Ahmed Mohamed Mze¹, Fatimata Mbaye¹, Bintu Keneme¹ and Mbacke Sembene^{1,2}

1. Departement de Biologie Animale, Faculté des Sciences et Techniques, Université C.A. Diop, B.P. 5005 Dakar, Senegal.
2. Centre de Biologie des Populations Animales SahéloSoudanaises (BIOPASS), UMR 022, Institut de Recherche pour le développement, IRD/Bel-Air, Senegal.

Manuscript Info

Manuscript History

Received: 5 May 2017
 Final Accepted: 7 June 2017
 Published: July 2017

Key words:-
 cancer, breast, mutation, DNAmt,
 Senegal.

Abstract

The International Cancer Centre (CIRC) stated that there is an important increase of breast cancer throughout the world. In Senegal, breast cancer is known as the malicious tumour more developed among women. From thirty (30) Senegalese women were tested, the notice is that a mitochondrial (*Cytochrome b*) and a nuclear (*Beta-fibrinogen*) gene evaluated the level of genetic diversity, genetic differentiation and demographic evolution. Our results showed a real diversity of *Cytochrome b* compared to *Beta-fibrinogen*. A significant difference has been found between normal tissues and cancerous ones within *Cytochrome b*. these results showed an implication of mitochondrial DNA compared to nuclear DNA.

Copy Right, IJAR, 2017. All rights reserved.

Introduction:-

Cancer is a sickness characterized by the proliferation of an abnormal cell within a normal tissue of a body. These cells come from all from a same clone, the initiator cell of cancer that has acquired some characteristics that permit it to divide itself and to be able to form metastases (Bertram, 2001). There are two types of tumour: benign tumour and malignant ones. In the first case, the tumour is drowned into conjunctive tissue. This encapsulation permits the considerable slowdown of neoplasm's growth, making them less dangerous. Beauty spots and warts are examples of this type of tumour easily eliminable by surgical intervention. In the second case, malignant tumours include no capsulated neoplasm. Tumour mass can, then, increase limitlessly what facilitates its infiltration into tissues as well as its invasion by other organs. Contrary to benign tumours, malignant tumours can kill (Voet, 2002). The International Research Cancer Centre (CIRC) valued the new cases of cancer to 14, 1 thousand (CIRC, 2013). It notices an increase of breast cancer throughout the world and with 1,7 thousand of women diagnosed every year. These last years, incidence and mortality have increased respectively of 20% and 14% in the world (OMS, 2013). Breast cancer is the most frequent cause of women death by cancer and the most frequent cancer diagnosed among women in the world. It still be the most serious public health problem, particularly among women of less under 35 year's old where it is aggressive (Axelrod *et al.*, 2008). In Senegal, breast cancer is the second from all the feminine cancers (Dem *et al.*, 2008). Only 5 to 10% of cancers are hereditary ones (Claus et Risch, 1991) attributable, in majority, to *BRCA1* and *BRCA2* (Dumitrescu et Cotaria, 2005). Mitochondria have been suspected for a long time as playing an important role in the development and the progression of cancers. Many associated mitochondrial alteration have been identified and described in literature. These alterations include modification of mitochondrial genes, structural or quantitative mitochondrial abnormalities, or abnormalities of enzymatic components of

Corresponding Author:- Ahmed Mohamed Mze.

Address:- Departement de Biologie Animale, Faculté des Sciences et Techniques, Université C.A. Diop, B.P. 5005 Dakar, Senegal.

503

respiratory chain (Wilkie *et al.*, 1983) and currently thanks to technological development of molecular biology, ADNmt mutations.

It was in this framework that we proposed to study *Cytb* and *FGB* genetic diversity in malignant breast cancer among Senegalese women.

Material and Methods:-

Samples:-

The tissues samples used for this study is obtained but surgery of patients affected by breast cancer. In each patient, normal tissues and cancerous tissues were sampled from Aristide Le Dantec Hospital.

Genetic Study:-

DNA Extraction, Polymerase chain reaction and Sequencing of *Cyt b* and *FGB*:-

DNA was extracted from patients normal tissues and cancerous tissues using DNA tissue Kit (Qiagen). *Cytb* and *FGB* were amplified. The amplification has been realized in a reactive volume of 50 μ l containing 28.9 μ l of MilliQ water, 5 μ l of buffer (10X) that contain Mg^{2+} ions to an initial concentration of 15 mM, 2 μ l of dNTP. *Cytb* was amplified using: H15915 (TCT-CCA-TTT-CTG-GTT-TAC-AAG-AC) and L14723 (ACC-AAT-GAC-ATG-AAA-AAT-CAT-GGT-T) primers as for *FGB*: F1 (ATT-CAC-AAC-GGC-ATG-TTC-TTC-AG) and F2 (AAN-GCK-CAC-CCC-AGT-ATC-TG). PCR happened in a thermocycler of Eppendorf in the following conditions: For *Cyt b*: preliminary distortion to 94°C (3 minutes) followed by a repetition of 40 cycles of initial distortion to 92°C (45 seconds), hybridization to 50°C (1 minute) and complementary DNA strands elongation to 72°C during 1 minute 30 seconds and closed by a final elongation (10 minutes) and for *FGB*: preliminary distortion to 94°C (3 minutes) followed by a repetition of 40 cycles of initial distortion to 94°C (30 seconds), hybridization to 67°C (1 minute) and complementary DNA strands elongation to 72°C during 1 minute 30 seconds and is closed by a final elongation (10 minutes). An electrophoretic migration 1.5% agarose gel was performed to confine the amplification. Sequencing reactions were performed in a thermocycler MJ Reseceed PTC 225 pettree type with ABI PRISM Big Dye TM terminatos cycle Kit. Each samples was sequenced using the for word primer for each gene (*Cytb*, *FGB*).

Molecular Analysis:-

Alignment of *Cyt b* and *FGB* sequences:-

Cyt b and *FGB* sequences, of normal and cancerous tissues, are carefully verified, corrected and aligned with BioEdit version 7.0.8 (Hall, 1999) software. The alignment is, in fact an important step of data's analysis. It is also used to bring to light similarities between sequences in finding the position of deletions or of possible insertions.

Cyt b and *FGB* genetic diversity:-

In order to study the genetic diversity of cancerous tissues in the level of each gene, we determined the number of variable and invariable sites, the number of informative sites, the total number of mutations, the number of haplotypes, the average number of various nucleotides, haplotypical (h) and nucleotide (π) diversity using to DnaSP 5.10 (Librado et Rozas, 2009) software. Nucleotide frequencies, the nature of mutations (% of transitions and transversions) and molecular distances with Kimura 2 parameter (K2P) model were executed in MEGA version 6.00 (Tamura *et al.*, 2013). Nucleotide frequencies and molecular distances were only calculated for *Cyt b* which is a coding gene in various positions of the codon.

Study of *Cyt b* amino acids variability:-

Cyt b nucleotides sequences are transformed into amino acids sequences using to MEGA software version 6.06 5 (Tamura *et al.*, 2013) with the best reading frame. The frequencies of amino acids were stand out for normal and cancerous tissue. Chi2 test was realized to see the amino acids that presented significant differences.

Cyt b and *FGB* genetic structure:-

Genetic distances between sane and cancerous tissues at intra and inter individual level for the two genes were explained by the genetic distance of Nei (Nei, 1978) using MEGA software version 6.06 version software (Tamura *et al.*, 2013).

Signature selection test:-

We have made demo-genetic tests that compare the level of adjustment between the two genes diversity and theoretical expected values under the hypothesis of the evolution under a neutralist model (to mutation-derive

balance). We have, among these tests Tajima D (Tajima, 1989), F_s of Fu (Fu, 1997) and R_2 of Ramos (Ramos, 2002). These three tests were realized on *FGB*. These various estimators are obtained using DnaSP version 5.10 (Librado et Rozas, 2009) and Arlequin version 3.5.1.3 (Excoffier et al., 2010). As for *Cyt b*, the existence of any selection was apprehended by report dN/dS thanks to MEGA 6 software with using Kimura model. dN is the substitution rate not synonymous and dS the substitution rate synonymous. The level of significance was held to 5% and a bootstrap value of 1000 replications. The distribution disparity analysis (Mismatch Distribution) that is the graphic representation of distances genetic distribution existing between individuals was also determined. Mismatch analysis is accompanied by two indices that test the quality of distribution adjustment. These indices are SSD (squared sums of deviation) and Rag (irregularity indices). The graphs are built with DnaSP software version 5.10.5 (Librado et Rozas, 2009). SSD and Rag indices are obtained with Arlequin software version 3.5.1.3 (Excoffier et al., 2010).

Results:-

Nucleotides sequences alignment:-

An area of *Cyt b* and an area of *FGB* were sequenced for normal and cancerous tissues among 30 patients suffering from breast cancer.

Study of *Cyt b* and *FGB* genetic diversity:-

Cyt b presents a most polymorphism compared to *FGB*. Transition percentages are more important than that of transversions among *Cyt b* (60%). Contrariwise, among *FGB* percentages of transversions are higher than that of transitions (58.9%) (table 1). The results revealed a predominance of A and T (57.17% for *Cyt b*; 62.6% for *FGB*) with respect to C+G (42.83% for *Cyt b*; 37.4% for *FGB*). Our results revealed a mutation bias in C and G to the third position of the codon. *Cyt b* substitution evolve most rapidly in the third position of the codon with a molecular distance of 0.285 ± 0.026 compared to the molecular distances to the first (0.161 ± 0.015) and the codon second position (0.195 ± 0.019). Genetic diversity indices analysis show high values of h and π for *Cyt b* and a strong h and a weak π for *FGB* (table 1).

Table 1:- *Cyt b* and *FGB* genetic parameters for cancerous tissues

Settings	<i>Cyt b</i>	<i>FGB</i>
Sample size, n	30	30
Number of sites, N	325	623
Monomorphic sites	108	612
Polymorphic sites	217	11
Singleton variable sites	76	8
Parsimony informative sites	141	3
Total number of mutations, Eta	315	13
Number of haplotypes, h	30	10
Average number of nucleotide differences (k)	47.030	1.467
Nucleotide frequencies (%)	ATCG 26.75 30.42 12.13 30.70	ATCG 31.41 31.19 17.50 19.90
1 st position	18 13.1 42.8 25.7	
2 nd position	30 18.3 19.9 32	
3 rd position	43 5.8 16.2 34.6	
Molecular distances 1 st position 0.161±/0.015	2 nd position 3 rd position 0.195±/0.019 0.285±/0.026	
Transitions	60%	41.06%
Transversions	40%	58.9%
R (Transition rate / Transversion rate)	1.453	0.637
Haplotypes diversity (h)	1.000	0.800
Nucleotide diversity (π)	0.14471	0.00235

Cyt b Amino acids variability:-

We remark that the frequency of *Cyt b* amino acid is lightly difference between sane tissues and cancerous ones without any significant statistic (table 2). However, we observe a significant value on glutamine.

Table 2:-Cyt b amino acids frequency

Aminosacids	Normal tissues	Cancerous tissues	P- Value
Ala	7.46695	7.07778	0.936
Cys	4.57306	5.08058	0.868
Asp	5.25187	4.76524	0.870
Glu	0	0.42046	0.038
Phe	1.07181	1.40154	0.795
Gly	10.11075	9.11002	0.810
His	1.39335	2.06727	0.697
Ile	8.71739	8.05886	0.858
Lys	4.78742	5.95655	0.704
Leu	7.89567	8.05886	0.958
Met	10.46802	9.25017	0.775
Asn	3.00107	2.97827	0.966
Pro	5.14469	4.87035	0.922
Gln	2.32225	2.10231	0.923
Arg	1.89353	1.47161	0.821
Ser	8.50303	8.51436	1
Thr	5.71632	6.13174	0.904
Val	6.64523	6.93763	0.932
Trp	3.00107	3.43377	0.872
Tyr	2.03644	2.31254	0.883

Genetic differentiation:-

Genetic distances analysis between normal tissues and cancerous ones for each gene revealed an important genetic diversity for *Cyt b* ($d = 0.136$), with respect to *FGB* that has no mutation ($d = 0.003$). Results are consigned in table III. For *Cyt b*, the value of genetic distance inside cancerous tissues is superior to that of sane tissues ($d = 0.093$). Contrariwise, no difference is noticed inside sane tissues for *FGB* ($d = 0.006$) and inside cancerous tissues ($d = 0.000$).

Table 3:-intra and inter-group genetic distance

Genes amplified	Groupes	Genetic distances Intra-groupe	Genetic distances inter-groupe
<i>Cyt b</i>	Normal tissues	0.093	0.136
	Cancerous tissues	0.112	
<i>FGB</i>	Normal tissues	0.006	0.003
	Cancerous tissues	0.000	

Section signature tests:-

Under a neutrality hypothesis ($dN = dS$) the probability value is -3.16 with a value of $p(0.002)$ which is < 0.05 . From this result, the starting hypothesis is accepted. So, substitutions at the level of *Cyt b* follow the Kimura neutral model evolution. For the whole *Cyt b* codons, ATA (AUA) triplet that cods for methionine is positively sub selected ($dS = 1.618$; $dN = 8.561$, $dN - dS = 6.943$ with a value $p. = 0.048$). As for *FGB*, the respective values F_s of F_u (-6.917 ; $P = 0$) and of R_2 (0.162 ; $P = 0$) of Ramos are significantly negative and positive. However, Tajima D (-0.56656 ; $P > 0.3$) is not significantly negative (table 4).

Table 4:-signature selection tests value

	<i>Cyt b</i>	P-value
dN/dS	-3.162	0.002
	<i>FGB</i>	P-value
D de Tajima	-0.56656	0.30600
F_s of F_u	-6.91799	0.00000
R_2	0.16261	0.0000

Distribution disparity analysis (Mismatch distribution):-

Distribution disparity of base pairs for both genes shows the expected and observed frequencies (full of dotted lines respectively) differences by pairs between samples. Results testify multimodal distributions for both genes (figure 1).

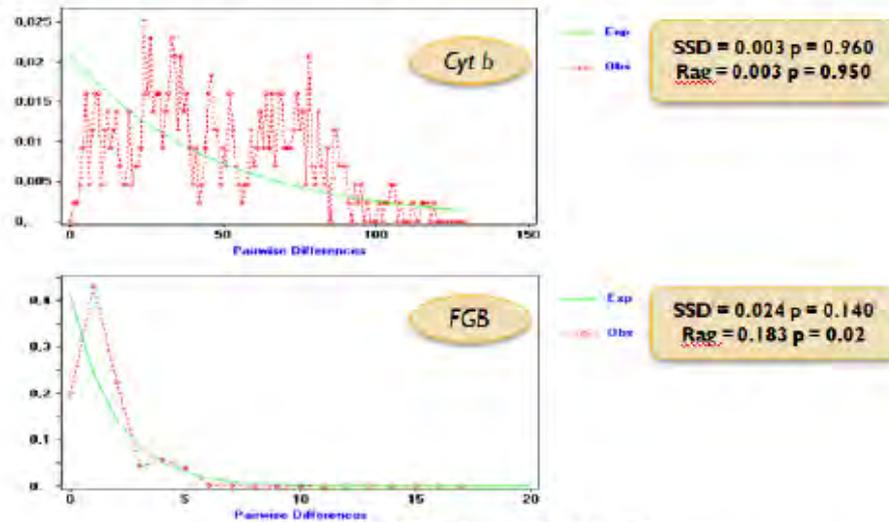


Figure 3:-Cyt b and FGB mismatch distribution curb

Cyt b SSD values (0.00336); $p > 0.9$, FGB (0.02400; $p > 0.1$), are positive and no significant for both gene (pictures V). Contrariwise, Rag values, Cyt b (0.00368; $p > 0.9$, FGB (0.18309), are positive and significant in FGB whereas they are negatives and no significant for Cyt b (table 5).

Table 5:-Values of SSD, Rag and their P-values

	Cyt b	FGB
SSD	0,00336	0,02400
P- value	0,96000	0,14000
Rag	0,00368	0,18309
P- value	0,95000	0,02000

Discussion:-

In this study, Cyt b which is a mitochondrial gene and FGB which is a nuclear gene were analyzed among 30 Senegalese patients suffering from cancer breast. We proceeded to the study of genetic variability, of genetic differentiation and genetic evolution in order to compare cancerous tissues sequences of Cyt b and FGB for the purpose of determining the implication of both genes in the mammary carcinogenesis.

Our results revealed a strong variability of Cyt b compared to FGB. This strong variability of Cyt b is in mutual agreement with the works by Mbaye *et al.*, (2014). Several types of explanations can be considered.

It can be mentioned: a sparsely regular replication (Kunkel & Loeb, 1981), mitochondrial polymerase would be less regular than that of the core, a deficiency or an absence of systems of correction and reparation and apparent absence of recombination as well as a rate of renewal and so, of more important replication than that of nuclear DNA (Brown *et al.*, 1982).

Cyt b number of variability (217) and *FGB* (11) as well as that the substitutions of *R*, *Cyt b* (1.453), *FGB* (0.637) lead to nucleotide variability rate of DNAm. That rate of substitutions was noticed by (Tan *et al.*, 2002) while examining the presence of DNAm mutation in breast cancer, of which 58% were the substitutions of gene *Cyt b* and the no coding area (*D-Loop*). Among mammal it was accurately estimated, that rate is higher than that described for only nuclear sequence and of a multiplicative factor of 5 or 10 (Brown *et al.*, 1982). That rate is variable following genome area considered but remains globally higher.

DNAm general characteristics of mutations are transitions C-T and A-G (Beckman & Ames, 1997) that are in correlation with our results with 60% of substitutions that are transitions among *Cyt b*. They declared that the main reason of DNAm mutations in tumour is the high level of ROS. On contrast, among *FGB* transversions types mutations (58.9%) are high with respect to that of transitions (41.06%). These transversion types substitutions wouldn't have not effect since they happened in an intronic area of *FGB*.

Our results reveal that each amino acid frequency deriving from cytochrome b sequences are weakly differentiated between sane tissues and cancerous ones without a statistic signification except glutamine. Most of cancers like breast cancer depend on a high rate of aerobic glycolysis for their growth and survival. Paradoxically, some cells lineages of cancer present also the dependence to glutamine in spite of the fact that glutamine is a no essential amino acid that can be synthesized from glucose. The high absorption rate of glutamine by exposed cells depending on glutamine seemed not coming only from its role as nitrogen donor in nucleotides and amino acids of biosynthesis. Instead of that, glutamine plays a role in the required absorption of amino acid essential in the maintaining and the activation of the TOR kinase. Furthermore, in many cancerous cells, glutamine is the primary mitochondrial substrate as well as the support to maintain the potential of the mitochondrial membrane and integrity as well as the support of NADPH production necessary for oxydoreduction control and macromolecular synthesis (Levine et Puzio-Kuter, 2010).

In this present work, we have made a comparative study of genetic distance intra and inter sane and cancerous tissues of both genes. As for *Cyt b*, inside cancerous tissues the value of genetic distance ($d = 0.112$) is higher than that of sane tissues ($d = 0.093$). This can be explained by the fact that, cancerous cells are no longer under the control of cellular division regular mechanisms. One of the characteristics of cancer is the rapid proliferation of abnormal cells (OMS, 2012). And as for *FGB*, values don't nearly present a difference inside sane tissues (0.006) and inside cancerous tissues (0.000). This is explained by the aspect of nuclear DNA gene which has a less important replication than that of DNA mt (Brown *et al.*, 1982). On contrast, the weak distance of *FGB* (0.003), confirms the characteristic of nuclear DNA which has a mutation rate less important than that of DNAm. Methionine is under positive selection for *Cyt b* gene ($dS = 1.618$; $dN = 8.561$. $dN - dS = 6.943$ with a value of $p = 0.048$). In other words, it is advantageous to tumour evolution. Contrary to sane cells, most of tumour cells need a exogenous contribution of Methionine, an essential amino acid (Durando *et al.*, 2008). Molecular mechanisms that help explain their dependence to Methionine are numerous. In vivo, various approaches were realized in order to lack in Methionine. As the main source of Methionine is food, synthetic diet plan lacked in Met have been widely used. Other alternatives were to use metabolism inhibitors of Methionine or an enzymatic degradation thanks to Methioninase. Among animal, deficiency in Methionine permit to limit tumour growth and reduce the height of some tumours. However, some studies also showed a limited effect over time with an upturn of the tumour growth after the interruption of the deficiency. These different modifications suggested the use of a deficiency in Methionine in tumour cells in association with conventional chemotherapy. Many pre-clinical studies showed a synergic effect of a deficiency association in Met and various cytotoxic agents. Currently, little clinical investigations were realized in order to explore this therapeutic strategy.

The observed number of differences between haplotypes doubly taken produced a multimodal distribution. The amount of variances squared SSD, *Cyt b* (0.00336; $p > 0.9$), *FGB* (0.02400; $p > 0.1$) are positive and aren't significant for both gene. As for *FGB*, respective values: F_s of F_u (-6.917; $P = 0$) and R_2 (0.162; $P = 0$) of Ramos are significantly negative and positive. However, Tajima D (-0.56656; $P = > 0.3$) is not significantly negative. These positive and negative values of neutrality tests are due to bare mutations. These results suggest a constant height of cancerous cells population for both genes, as show multimodal distribution (Ramos-OnsisnetRozas, 2002).

Conclusion:-

Cyt b implication in cancers, in particular in breast malignant tumour, is no more demonstrated and is more and more studied. However, *FGB* is less implicated in breast malignant tumour than *Cyt b*. As the role of mitochondria

is known in the apoptosis, the presence of these mutations could contribute to alter cellular response to anticancerous agents.

A significant difference of glutamine frequency between normal tissues and cancerous tissues was obtained. These results from Senegalese women suffering from breast cancer should be confirmed in quantifying the level of twenty amino acids from serum or plasma of these patients unpaired to subject of control. Cancerous cells need glucoses for their development and glutamine is a no essential amino acid that can be synthesised from glucose. As glucose comes from carbohydrates, to eliminate carbohydrates, replaced by proteins and sane greases, would be less an anticancerous treatment without medicines. Methionine is necessary in carcinogenic processes. So, their inhibition is a means of reducing the growth of cancerous tumour.

References:-

1. Axelrod D., Smith J., Kornreich D., Grinstead E., Singh B., Cangiarella J. et Guth AA. (2008). Breast Cancer in Young Women. *Journal of the American College of Surgeons*. 206 (6): 1193-1203
2. Beckman KB. et Ames BN. (1997). Oxydatifd composition de l'ADN. *The Journal of Biological Chemistry*. 272: 19633-19636.
3. Bertram J. S. (2001). «The molecular biology of cancer». *Molecular Aspects of Medicine*. 21 (6):167-223.
4. Blakely E.M., Mitchell A.L., Fisher N., Meunier B., Nijtmans L.G., Schaefer A.M., Jackson M.J., Turabull D.M. et Faylor R.W. (2005). A mitochondrial cytochrome b mutation causing severe respiratory chain enzyme deficiency in human and yeast. *Federation of European Biochemical Societies*. 272 (14): 3583-3592.
5. Blankenship & Robert. 2009. Molecular Mechanisms of photosynthesis. *Blackwell Publishing*. 43 (2): 124-132.
6. Brown W.M., Prager E.M., Wang A. et Wilson A.C., (1982). Mitochondrial DNA sequences of Primates: tempo and mode of evolution. *Journal of molecular evolution*. 18 : 225-239.
7. CIRCC; Le cancer dans le monde. Rapport, IARC Press, (2013), 354 pages. Consultable à l'URL : [http : www.iarc.fr/fr/publications/pdfs-online/wcr/2003/Le cancer dans le monde.pdf](http://www.iarc.fr/fr/publications/pdfs-online/wcr/2003/Le_cancer_dans_le_monde.pdf)
8. Claus E.B. et Risch N. (1991). Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study. *The American Journal of Human Genetics* 48 (2): 232-242.
9. Dem A., Traoré B., Dieng M.M., Diop P.S., Lalami M.T., Diop M., Dangou J.M. et Touré P. (2008). Les cancers gynécologiques et mammaires à l'institut du cancer de Dakar. *Cahiers d'études et de recherche francophones/ Santé*, 18 (1): 25-29
10. Dumitrescu R.G. et Cotarla I. (2005). Understanding breast cancer risk – where dowe stand in 2005? *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 9:208-221.
11. Durando X., Thivat E., Gimbergues P., Cellarier E., Abrial C, Dib M, Tacca O. et Chollet P. (2008). D pendance en M thionine des cellules cancéreuses : une nouvelle approche thérapeutique. *Bulletin du cancer*. 15 (1) : 69-77.
12. Excoffier L. et Lischer H.E.L. (2010). Arlequinsuite version 3.5: A new series of perform population genetics analyses under linux and windows. *Molecular, Ecology Resources*. 10 : 564-567.
13. Hall J., et Angele S. (1999). Radiation, DNA damage and cancer. *Molecular Medicine Today*. 5 :157-164.
14. Kunkel T.A. et Loeb L.A. (1981). Fidelity of mammalian DNA polymerases. *Science* 213 : 765-767.
15. Librado P et J Rozas (2009). "DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data." *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
16. Levine A.J. et Puzio-Kuter A.M. (2010). The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science*. 330 : 1340-1344.
17. Mbaye F., Dem A., Fall M., Mbaye E.S., Diop G. R., Ndiaye M.S., Nianga D. et Sembène M. (2014). Correlation of clinical and pathological parameters with the diversity and genetic evolution of breast cancer in Senegalese women. *British Journal of Medicine and Medical Sciences*. 4 (14): 2627-2638.
18. Nei M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 89: 853-859.
19. OMS ; communiqué de presse n  223, 12 décembre 2013. Consultable à l'URL : www.iarc.fr/fr/media-centre/pr/2013/pdfs/pr223_F.pdf
20. OMS. (2012). Cancer. Accès. Consultable à l'URL : <http://www.who.int/topics/cancer/fr/>
21. Ramos-Onsins S.E. et Rozas J. (2002). "Statistical properties of new neutrality tests against population growth." *Molecular Biology and Evolution*. 19: 2092-2100.
22. Tajima F., 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123, 585-595.
23. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A et Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
24. Tan D.J., Bai R.K. et Wong L.J. (2002). *Cancer Research*. 62: 972-976.
25. Voet D. et Voet J. G. 2002. *Biochimie*. Trad. de l'anglais par Y. Gaudemer. Paris: De Boeck Université, 1361 p.
26. Willie D., Evans I.H., Eglisson V., Dials E.S. et Collier D. (1983). Mitochondria, cell surface, and carcinogenesis. *International review of cytology. Supplement*. 15: 157-189.

Genetic Diversity and Structuring of the BRAF gene in Breast Tumors

Ahmed Mohamed Mze, Fatimata Mbaye* and Mbacké Sembène

Genetics and Population Management Team, Department of Animal Biology, Faculty of Sciences and Techniques, Cheikh Anta Diop University, Dakar 5005

*Corresponding author: Fatimata Mbaye, Genetics and Population Management Team, Department of Animal Biology, Faculty of Sciences and Techniques, Cheikh Anta Diop University, Dakar 5005, Tel: +221773665998, Email: fatimata.mbaye@ucad.edu.sn

Received Date: December 03, 2019 Accepted Date: December 27, 2019 Published Date: December 30, 2019

Citation: Ahmed Mohamed Mze (2019) Genetic Diversity and Structuring of the BRAF gene in Breast Tumors. Eur J Med Res Clin Trials 1: 1-11.

Abstract

The International Agency for Research on Cancer (IARC) estimates an increase in breast cancer worldwide. In Senegal, the most common malignant tumour in women is breast cancer. But also in Senegal as in most African countries, benign tumours occupy an important place in mammary pathologies. To better understand the impact of nucleotide variability and genetic instability of benign and malignant breast tumours, we used the *BRAF* gene, which is a nuclear gene. This work allowed us to compare the polymorphism, diversity, structure and genetic evolution of exon 15 of the *BRAF* gene between patients with benign tumours, malignant breast tumours and control subjects. The analysis of the identification of mutation of exon 15 of the *BRAF* gene led us to conclude that *BRAF* was mutated in (1.5%) of cases. We observed a synonymous mutation A598A in malignant tumours. Our results showed that somatic mutations of this *BRAF* gene were common in Senegalese patients with both benign and malignant breast tumours. So our results allowed us to conclude that the *BRAF* gene is involved in breast tumours.

Keywords: cancer; breast; mutations; *BRAF*

Introduction

BRAF is a proto-oncogene involved in the KRAS MAP-kinase intracellular signaling pathway. The activation of membrane receptors by binding with their specific ligands induces a cascade activation of this pathway and the stimulation of several cellular functions. This occurs in many types of cells. *BRAF* is normally activated by RAS proteins. It can also be activated by mutations called "function gain" or "activators"; the proto-oncogene then becomes an oncogene. Activating mutations of the *BRAF* gene were first detected in human tumors about eighteen years ago [1], and their frequency varies greatly according to tumour type. Mutations generally appear during the early phases of oncogenesis. *BRAF* mutations are mainly located in the exon 15 activator segment, i.e. acquired, somatic and non-germline mutations [2]. The absence of germline mutation can be explained by molecular genetic experiments in mice: *BRAF* mutations induce embryonic lethality [2]. The most frequent mutation is a localized punctually mutation at exon 15 (thymine [T] 1799 has been transformed into adenine [A] - gTg/gAg) substituting a valine (V) into glutamic acid at position 600 of the protein (V600E); this mutation is found in the vast majority of cancers with a mutated *BRAF* form [1]. The mechanisms of acquisition of the V600E mutation in the protein are probably linked to alternative mechanisms that have not yet been identified. The mutated protein *BRAF* V600E has 500 times more kinase activity than the wild form of *BRAF*, which stimulates ERK protein phosphorylation and cell signaling in a disproportionate way [1]. Apart from the V600E mutation, other somatic mutations of *BRAF* have been described in human melanomas:

In mutated melanomas for *BRAF*, 74 to 90% are V600E and 16 to 29% are V600K. Depending on the studies, the proportions of one type of mutation compared to another are slightly different. *BRAF*'s amino acid V600 is located in the kinase activation domain, near the threonine 599 and serine 602 residues on which phosphorylation induces kinase activity. The V600E mutation could thus simulate the phosphorylation of threonine 599 and serine 602. Another hypothesis of the uncontrolled activation mechanism is the increase in exposure of the activation segment when a small hydrophobic amino acid (valine) is replaced by a hydrophilic residue (glutamic acid), [3]. The *BRAF* gene is mutated in the majority of patients with melanoma and a minority of patients with breast, colon and lung cancer [4]. In this study, the hypothesis of the existence of nucleotide mutations involved in breast tumors in Senegalese women has been put forward. For this purpose, exon 15 of the *BRAF* gene, which is a nuclear gene, was chosen to test this hypothesis.

Methodology

Patients and samples

The study involves sixty-six (66) surgical samples composed of malignant and benign tumors and twelve (12) blood samples from patients who are managed at the Aristide Le Dantec Hospital Cancer Institute. Samples were collected from these patients after informed and written consent in a standardized form.

DNA extraction, amplification and sequencing

DNA extraction was performed from tissues using the Qiagen DNeasy kit. Quality of the extracted DNA was verified by electrophoretic migration in 1,5% of agarose gel; DNA was then stored at a temperature of 20°C. PCR amplification of exon 15 of *BRAF* gene was carried out at a reaction volume of 50 µL containing 1 µL of DNA and 49 µL of the PCR mix comprising 34.9µL of MilliQ water, 5 µL of buffer 10X, 2 µL of MgCl₂, 4µL of dNTP, 1.5 µL of each primer (Forward 5'- TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA -3') (Reverse 5'- GGCCAAAATTAATCAGTGGGA -3'). The PCR program included the following conditions: 95°C for 3 min; 35 cycles (95°C for 30 s; 55°C for 30 s; 72°C 30 s); 72°C for 10 min. PCR products were purified and sequenced. Sequencing reactions were performed using an MJ Research PTC-225 Peltier thermocycler with the ABI PRISM kit and electrophoresed in an ABI 3730 XL sequencer.

Molecular analyses

The exon 15 sequences of the *BRAF* gene, from the three groups (malignant, benign and control), are carefully verified, corrected and aligned with Bio Edit software version 7.0.8 [5]. Alignment is indeed an important step in data analysis. It is used in particular to highlight the similarities between the sequences by finding the position of deletions, insertions, and probable substitutions.

To determine the position, nature and frequency of exon 15 mutations in the *BRAF* gene, the raw sequencing data were submitted to Mutation Surveyor version 5.0.1 (www.softgenetics.com). Indeed, this software compares the chromatograms submitted with the reference sequence of the gene of interest incorporated in the database of the said software but also with sequences from the Genbank database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Thus this software allows detecting the presence of heterozygous mutations (het), insertions (in) and deletions (del).

In addition to the universality of the DNA molecule in the living world, there is its variability. This variability results in random changes in the DNA sequence (mutations) that can affect the cellular activity and the entire body. Therefore, to estimate the genetic diversity of the *BRAF* gene, we determined the number of variable and invariable sites, the number of informative sites, the total number of mutations, the number of haplotypes (h), the average number of nucleotide differences (k), the haplotypic (HD) and nucleotide (π) diversity, using the DnaSP software version 5.10 [6]. Nucleotide frequencies, nature of mutations (% transitions and transversions) and molecular distances with the Kimura 2 Parameter (K2P) model were calculated with the MEGA program version 6.06 [7]. Nucleotide frequencies and molecular distances were also calculated at each codon position.

The nucleotide sequences of the *BRAF* gene are transformed into amino acid sequences using MEGA software version 6.06 [7], using the best reading frame. The level of significance of amino acid frequency variations between the three groups (controls, benign tumors, and malignant tumors) was demonstrated by the chi2 test with a level of significance (P-value) of 0.05.

Genetic distances between controls vs TB, controls vs TM and TB vs TM at the intra- and inter-individual level were explained by Nei's genetic distance using the MEGA software version 6.06 [7].

We conducted demogenetic tests that compare the level of adjustment between diversity to the three groups and expected theoretical values. Among these tests: the D of Tajima [8], the D* and F* of Fu and Li [9] and the H of Fay and Wu [10] and the R2 of Ramos [11]. These different estimators are obtained with the DnaSP version 5.10 programs [6] and Harlequin version 3.5.1.3 [12]. By choosing as a starting hypothesis that exon 15 of the *BRAF* gene is under positive selection, the existence of any selection has been apprehended by a postivity ($dN > dS$) thanks to the MEGA 6 software with dN is the non-synonymous substitution rate and dS is the synonymous substitution rate. This test was performed using the Nei-Golobort model and the pairwise deletion method. A value of $P < 0.05$ was considered significant with a bootstrap value of 10000 replications. After the demogenetic tests, we determined the analysis of the distribution disparity (Mismatch distribution), which is the graphical representation of the distribution of genetic distances existing between individuals. Mismatch's analysis is accompanied by two indices that test the quality of adjustment of the distribution. These indices are the SSD (sum of squares of deviations) and the Rag (Irregularity index). The graphs are built with DnaSP software version

5.10 [6]. The SSD and Rag indices were obtained with Harlequin software version 3.5.1.3 [12].

Results

A total of 86 sequences (12 for controls, 31 for benign tumors and 35 for malignant tumors) were sequenced, aligned and analyzed.

Nature and frequency of mutations

In benign tumors, we find the mutations L588H and D594V (1.5%), which correspond to a change of amino acid in position 588 in *BRAF*, with leucine (L) replaced by a histidine (H) and D594V to a change of amino acid in position 594 in *BRAF* with an aspartic acid (D) replaced by valine (V), Table 1. We also observe a synonymous mutation A598A, in malignant tumors.

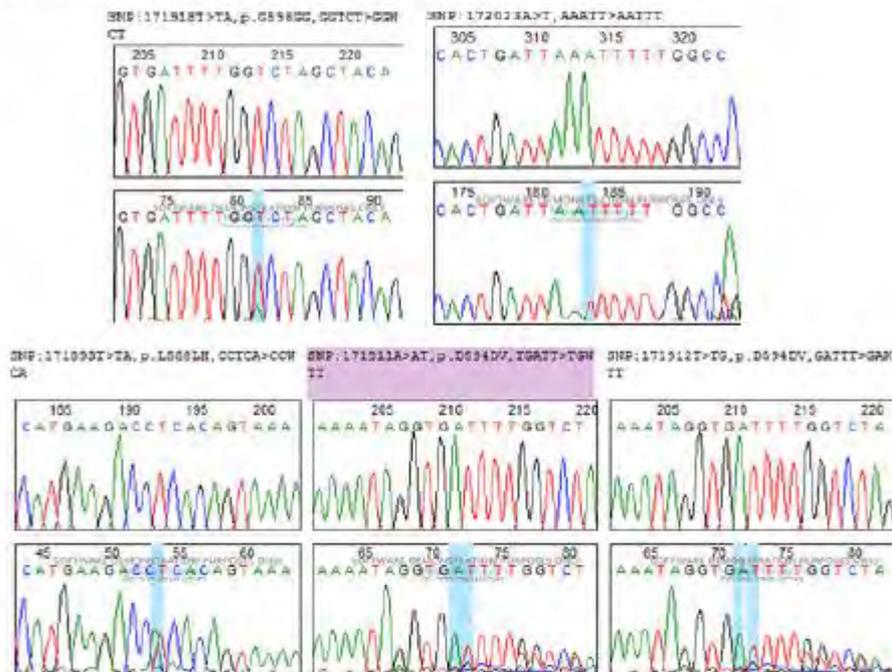
Genetic diversity

The analysis in Table 2 shows that the *BRAF* gene is more diverse in terms of malignant tumors and TB than in controls. However, we note a great diversity among TMs. This increased diversity in malignant tumors is reflected in a high number of variable sites (20) compared to TB (17) and controls (8). We also note a higher total number of mutations (26) for TMs compared to TB (22) and controls (10). The average number of nucleotide differences (k) is higher at the TM levels (3.615) compared to TB (3.009) and controls (2.045). We find that the percentages of transversions are higher than those of transitions in the three groups. However, we note that in the percentages of transversions they are higher in controls and benign tumors respectively (73.42%) and (78.82%) compared to the TM (53.16%). In contrast, in malignant tumors, transitions (46.82%) are higher compared to TB (21.18%) and controls (26.51%) (Table 2). Analysis of the diversity indices reveals high haplotypic diversity of (0.818), (0.920) and (0.934) respectively in malignant, benign and control tumors against low nucleotide diversity (0.01130), (0.01662) and (0.01997) (Table 2).

In the nucleotide frequency diagram, we see that bases A and T are the most dominant with respectively 27% and 35% for all three groups compared to bases C and G respectively 17.5% and 20%. And we also notice a predominance of (A + T) in all three groups with a percentage of 62% compared to (C + G) 38%.

NUCLEOTIDE POSITION	AMINO ACIDS	NUMBER
CONTROLS		
172023A>AT		2
BENIGN TUMORS		
171893T>TA ; mut het T1763A	L588H	1
171918T> TA ; mut het T1788A	G596G	1
171911A>AT ; mut het A1781T	D594V dbSNP 121913338	1
171912T>TC ; mut het T1782C	D594V	1
172023A>AT		3
172032C>CA		1
MALIGNANT TUMORS		
171924T>TA ; mut het T1794A	A598AA	1
172021A>AT		4
172020T>TA		1
172023A>AT		1
172032C>CA		1
172032C>CT		1

Table 1: Nature and frequency of mutations



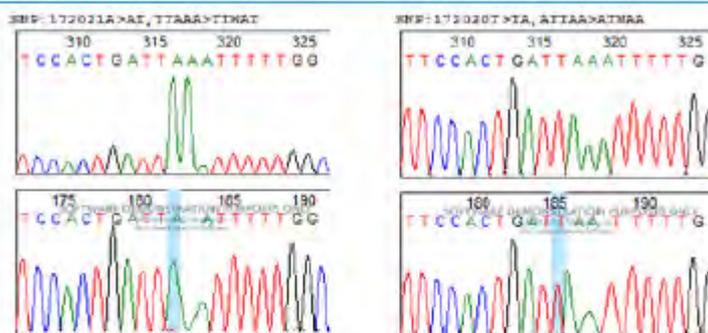


Figure 1: BRAF gene mutations

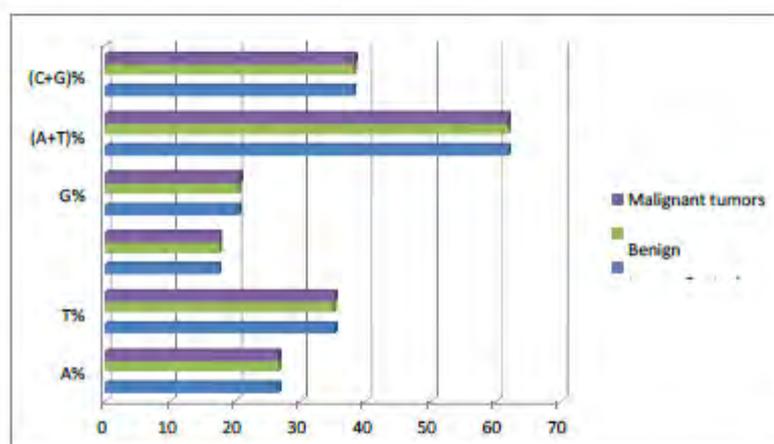


Figure 2: Nucleotide frequencies of the sequences

Variability of BRAF amino acids

The analysis of inter-tissue protein diversity (Table 3) by highlighting amino acid variations indicates that, despite slight variations in amino acid frequencies between the three groups, no significant difference could be determined.

Genetic differentiation

The genetic distance values (d) at the intra and inter tissue level and the degree of genetic differentiation (F_{st}) between controls and benign tumors and between controls and malignant tumors as well as benign and malignant tumors are recorded in Table 4. The analysis of genetic distances between controls and malignant tumors and benign and malignant tumors revealed a low respective genetic diversity ($d=0.0159$), (0.0186), but great-

er than that between controls and benign tumors ($d=0.0139$). We note that within malignant and benign tumors the values of the genetic distance are equal ($d=0.02$), higher than those of the controls ($d=0.01$). We also find that the degree of genetic differentiation shows an F_{st} that is equal to 0 and not significant (0; P -value=0.86486), (0; P -value=0.76577) and (0; P -value=0.48649) respectively between controls and benign tumors, controls and malignant tumors and between benign and malignant tumors.

Neutrality tests

Under the assumption of positive selection ($dN>dS$) the probability values for controls and benign and malignant tumors are respectively (0.01), (0.037) and (0.064) with p (1.023), (1.802) and (1.529) values that are not significant. Based on

these results, the initial hypothesis is not accepted; therefore the substitutions at the level of exon 15 of the BRAF do not follow the positive selection. For Tajima D, the values for controls (-0.90996; $p=0.2$), TB (-0.99594; $p=0.154$) and TM (-0.86541; $p=0.211$) are not significantly negative. The D^* and F^* tests of (Fu & Li) and the H of (Fay & Wu) are negatively insignificant for all three groups; the values are reported in Table 5. Unlike the other indices for those of R2 de Ramos, the control values (0.16074; $p=0.000$), TB (0.16370; $p=0.000$) and TM (0.16088; $p=0.000$) are significantly positive.

Mismatch distribution analysis

The disparity of distribution (Mismatch distribution), base pairs for exon 15 of the BRAF gene between the three groups, shows the expected and observed frequencies (solid and dotted line respectively) of the differences per pair between the samples (Figure 3). Under the assumption of a constant population and an expanding population, we have a unimodal distribution for controls. However, the distribution is multimodal for benign and malignant tumors.

Diversity indices	Controls	Benign tumors	Malignant tumors
Number of sequences, n	12	31	35
Number of sites, N	181	181	181
Monomorphic sites	173	164	161
Polymorphic sites	8	17	20
Singleton variable sites	6	10	9
Parimony informative sites	2	7	11
Total number of mutations, Eta	10	22	26
Total number of singleton mutations Eta (s)	8	17	20
Number of haplotypes, h	6	18	23
Average number of nucleotide differences (k)	2.045	3.009	3.615
Transitions (%)	26.51	21.18	46.82
Transversions (%)	73.42	78.82	53.16
R (transition rates/ transversion rates)	0.318	0.238	0.807
Haplotypical diversity (hd)	0.818	0.920	0.934
Nucleotide diversity (π)	0.01130	0.01662	0.01997

Table 2: Values of genetic diversity indices for each population

Amino acids	Controls	Bentgn	Malignant	P-value	P-value	P-value
		tumours	tumours	T vs TB	T vs TM	TB vs TM
Ala	5.15	5.07	5.15	0.9795	1	0.9795
Cys	0.14	0.05	0.05	0.8363	0.8363	1
Asp	5.01	5.02	5.00	0.9974	0.9974	0.9948
Glu	5.01	5.02	5.00	0.9974	0.9974	0.9948
Phe	9.74	9.49	9.68	0.9522	0.9886	0.9636
Gly	6.68	6.69	6.67	0.9977	0.9977	0.9955
His	3.34	3.34	3.34	1	1	1
Ile	10.15	10.30	10.15	0.9721	1	0.9721
Lys	5.01	4.96	4.81	0.987	0.9478	0.9608
Leu	11.82	12.03	11.96	0.9635	0.9756	0.9878
Met	1.67	1.73	1.76	0.9738	0.9609	0.9871
Asn	0.00	0.05	0.10	0.823	0.7518	0.8972
Pro	1.67	1.94	2.05	0.886	0.8424	0.9556
Gln	3.34	3.34	3.34	1	1	1
Arg	3.34	3.40	3.34	0.9812	1	0.9812
Ser	10.15	10.30	10.30	0.9721	0.9721	1
Thr	6.68	6.47	6.34	0.9522	0.9224	0.9701
Val	5.01	5.02	5.00	0.9974	0.9974	0.9948
Trp	3.34	3.34	3.34	1	1	1
Tyr	2.78	2.43	3.34	0.8765	0.8182	0.7007

Table 3: Frequencies of BRAF amino acids

Groupes	Intra group genetic distances	Inter group genetic distances	Fst
Controls	0.01	0.0139	0
Bentgn tumors	0.02		
Controls	0.02	0.0159	0
Malignant tumors			
Bentgn tumors	0.0186	0.0186	0
Malignant tumors			

Table 4: Intra- and inter-group genetic distances and differentiation index (Fst)

Parameters	Controls	Benign tumors	Malignant tumors	P-value Controls	P-value TB	P-value TM
dN/dS	0.01	0.037	0.064	1.023	1.802	1.529
D de Tajima	-0.90996	-0.99594	-0.86541	0.2	0.154	0.211
D ^s de Fu et Li	-0.06286	-0.07713	-0.11543	0.46000	1.13637	0.48800
F ^s de Fu et Li	-0.07359	-0.05006	-0.06326	0.47100	0.45200	0.45500
H de Fay et Wu	-0.14000	-0.06436	-0.22133	0.35400	0.33500	0.33300
R2	0.16074	0.16370	0.16088	0.000	0.000	0.000

Table 5: Values of the Selection Signature Tests

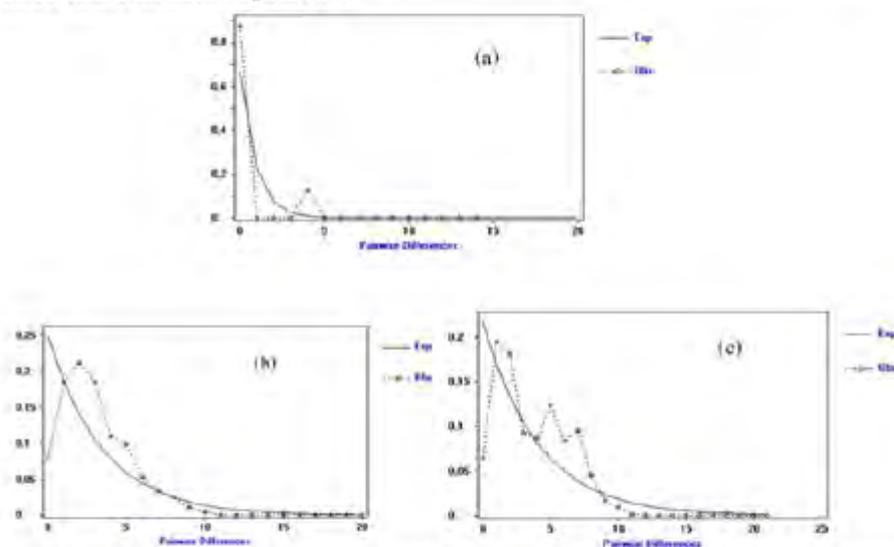


Figure 3: Mismatch curves distribution of controls (a), benign tumors (b) and malignant tumors (c). The SSD, control (0.01093; $p=0.55000$), TB (0.00346; $p=0.59000$) and TM (0.00988; $p=0.48000$) values are positive and not significant for the three groups (Table 6). The values of Rag, controls (0.05005; $p=0.78000$), TB (0.02122; $p=0.83000$) and TM (0.03150; $p=0.36000$) are positive and not significant (Table VII).

Parameters	Controls	Benign tumors	Malignant tumors
SSD	0.01093	0.00346	0.00988
	P-value= 0.55000	P-value= 0.59000	P-value= 0.48000
Rag	0.05005	0.02122	0.03150
	P-value= 0.78000	P-value= 0.83000	P-value=0.36000

Tables 6: Values of SSDs, Rags, and their P-values

Discussion

We have identified mutations, studied genetic variability, genetic differentiation, and genetic evolution in order to determine the involvement of exon 15 of the *BRAF* gene in breast cancer in Senegalese women. 35 patients with breast cancer and 31 patients with benign breast tumors were included in this study. The data from these patients were compared to 12 control subjects used as controls. *BRAF*, which is a nuclear gene, is part of the RAF-MEK-ERK signaling cascade that regulates cell growth, proliferation and differentiation in response to stimulation by growth factors, cytokines and hormones [13]. For this role that plays in the cell justifies the study of the variability of its exon 15 in the context of cancer.

The mutation identification analysis of exon 15 of the *BRAF* gene showed us in benign tumors, the presence of mutations L588H and D598V which correspond to a change of amino acid in position 588 in *BRAF*, with a leucine (L) replaced by a histidine (H) and D598V to a change of amino acid in position 598 in *BRAF* with an aspartic acid (D) replaced by a valine (V). It has been shown by [14] that *BRAF* activating mutations are common in some benign tumors, such as scalloped colonic polyps, where their frequency reaches 51%, and melanocytic nevi. We observe a synonymous mutation A598A in malignant tumors. These results are different from the substitution of *BRAF* V600E resulting in the substitution of glutamic acid by valine, which accounts for 80% of mutations and is thought to be involved in 66% of malignant melanomas [3], and also involved in several other cancers [15]. In most cases, B-raf mutations are located in exon 15 [16]. In our study of the variability of exon 15 of the *BRAF* gene, several mutations have been described both in malignant and benign tumour sequences. This increased diversity in malignant tumors is reflected in a high number of variable sites (20) compared to TB (17) and controls (8). This justifies that the ability of tumour cells to invade and colonize distant sites is a major characteristic differentiating malignant and benign cancers [17]. We had transition percentages (46.82%) at

the malignant tumour levels that are higher compared to benign (21.18%) and control (26.51%) tumors. Our results are in line with those of [18] working on the diagnosis of melanoma. The sequencing of *BRAF* showed the presence of very many mutations and 80% of the mutations were C > Transitions.

A comparative analysis of the genetic distance and degree of genetic differentiation (Fst), intra and inter healthy tissue, benign tissue and cancer tissue, of exon 15 of the *BRAF* gene was performed in a series of 78 patients with breast tumors. The analysis of genetic distances between controls and malignant tumors and benign and malignant tumors revealed a low respective genetic diversity ($d=0.0159$), (0.0186), but greater than that between controls and benign tumors ($d=0.0139$). And also we find that the degree of genetic differentiation shows a negative and insignificant Fst (-0.02652 ; P-value=0.86486), (-0.01890 ; P-value=0.76577) and (-0.00294 ; P-value=0.48649) respectively between controls and benign tumors, controls and malignant tumors as well as between benign and malignant tumors. We also found that within malignant and benign tumors, the genetic distance values are equal ($d=0.02$), higher than those of the controls ($d=0.01$). This shows that cancer cells have a different property from healthy cells [19], and it may also explain that during carcinogenesis, cancer-related changes the internal structures of the cells but also their environment. Cancer cells have been shown to be less rigid than normal cells due to a reorganization of the cytoskeleton [20]. Breast cancer cells deform more than non-cancerous cells [21].

The analysis of inter-tissue protein diversity by highlighting amino acid variations indicates that, despite slight variations in amino acid frequencies between the three groups, no significant difference could be determined. This can be explained by the aspect of the nuclear DNA gene that has less replication than the mtDNA gene.

Conclusion

Genetic mutations and molecular pathway activation play a vital role in tumour formation. The analysis at the identification of mutation of exon 15 of the BRAF gene led us to conclude that BRAF was mutated

References

1. Davies H, Bignell GR, and Cox C (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417: 949-954.
2. Dhomen N, Da Rocha Dias S, and Hayward R (2010) Inducible expression of V600E BRAF using tyrosinase-driven Cre recombinase results in embryonic lethality. *Pigment Cell Melanoma Research* 23:112-120.
3. Christine L and Lionel L (2012) BRAF : biologie et fonction. *Correspondances enOnco-Théranostic*.
4. Wang YL, Dai X, Li YD, Cheng RX, Deng B, et al. (2015) Study of PIK3CA, BRAF, and KRAS mutations in breast carcinomas among Chinese women in Qinghai. *Genetics and molecular research: GMR*.7p.
5. Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 44:211.
6. Librado P and Rozas J (2009) DnaSP v5: Software for Comprehensive Analysis of DNA Polymorphic Data. *Bioinformatics* 25:1451-1452.
7. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, et al. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *The Society for Molecular Biology and Evolution*, Oxford University, Oxford.
8. Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595.
9. Fu YX and Li WH (1993) Statistical tests of neutrality of mutations. *Pub Med* 133:693-709.
10. Fay JC and Wu CI (2000) Hitchhiking under positive Darwinian selection. *Genetics* 155:1405- 1413.
11. Ramos-Onsins SE and Rozas J (2002) Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*19: 2092-2100.
12. Excoffier L and Lischer HEL (2010) Arlequin suite, Ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecologie*

Resources 10: 564- 567.

13. Robinson MJ and Cobb MH (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Current Opinion in Cell Biology* 9:180-186.
14. Spring KJ, Zhao ZZ, Karamatic R, et al. (2006) High prevalence of sessile serrated adenomas with BRAF mutations: a prospective study of patients undergoing colonoscopy. *Gastroenterology* 131:1400-1407.
15. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE (2002) Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 418: 934.
16. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z (2003) High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 63:1454-1457.
17. Eccles SA (2000) Cell biology of lymphatic metastasis. The potential role of c-erbB oncogene signaling. *Recent Results Cancer Research* 157:41-54.
18. Benfodda M, Marinho E, Kuma R, Beaudoux O, Lamoril J, Deschamps L, et al. (2016) MELADIAG : un panel de biomarqueurs d'ADN dédié au diagnostic du mélanome.
19. Hanahan D and Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-74.
20. Lekka M, Laidler P, Gil D, Lekki J, Stachura Z, et al. (1999) The elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy. *European Biophysics Journal* 28:312-316.
21. Guck J, Schinkinger S, Lincoln B, Wottawah F, Ebert S, Romeyke M, Lenz D, et al. (2005) Optical Deformability as an Inherent Cell Marker for Testing Malignant Transformation and Metastatic Competence. *Biophysical Journal* 88: 3689-3698.

Submit your manuscript to a JScholar journal and benefit from:

- ☛ Convenient online submission
- ☛ Rigorous peer review
- ☛ Immediate publication on acceptance
- ☛ Open access: articles freely available online
- ☛ High visibility within the field
- ☛ Retaining the copyright to your article

Submit your manuscript at
<http://www.jscholaronline.org/submit-manuscript.php>