

**CARACTERISATION DE LA DIVERSITE, DE
LA DIFFERENCIATION ET DE L'EVOLUTION
DU CANCER DU SEIN CHEZ LES FEMMES
AU SENEGAL**

To my beloved parents

REMERCIEMENTS

- *Je tiens tout d'abord à remercier toute ma famille pour tout le soutien qu'ils m'ont apporté depuis toujours*
- *Tous mes remerciements vont à l'endroit de tous le corps professoral de la faculté des sciences et techniques de l'université Cheick anta diop de Dakar pour la qualité de l'enseignement prodiguée au cours de ces cinq années d'études*
- *Mes sincères remerciements au **PROFESSEUR PAPE MBACKE SEMBENE** pour votre rigueur scientifique votre patience mais surtout votre humilité merci pour tous les efforts fournis à notre égard. Soyez convaincu que nous nous évertuerons à être ces hommes et femmes de valeurs que vous vous êtes tué à former*
- *Au **DOCTEUR FATIMA MBOYE** merci pour tout. Merci pour votre rigueur scientifique, votre bienveillance. Chaque année qui passe vous nous montrez que l'enseignement n'est point un fardeau pour vous que c'est avec la main sur le cœur que vous partagez vos connaissances. Merci d'être cette figure féminine en qui nous trouvons notre force d'évoluer dans ce domaine. Soyez sûre de mon estime à votre égard*
- *Mes vifs remerciements Au **PR GORA DIOP** qui malgré les charges professionnelles trouve toujours un temps pour nous. Merci de m'honorer en acceptant d'être membre du jury*
- *Mes REMERCIEMENTS Au **DOCTEUR BINTA KENEME** pour la qualité de la formation. Merci de m'honorer en acceptant d'être membres du jury.*

Liste des abréviations

- ADN : acide désoxyribonucléique
- Cyt.B : Cytochrome b
- dNTPs : désoxyribonucléotides
- ddNTPs : didésoxyribonucléotides
- pb : paire de base
- PCR : polymérase Chain reaction
- Ts : tissu sain
- Tc : tissu cancéreux

Liste des tableaux

Tableau 1 : réactifs de la PCR	12
Tableau 2 : Paramètres basique de la variabilité genetique.....	16
<i>Tableau 3 : Fréquences nucléotidiques</i>	<i>17</i>
Tableau 4:Fréquence des acides aminés dans les deux groupes de tissus	20
Tableau 5 : indices de variabilité genetique	21
<i>Tableau 6 : Distance genetique de NEI.....</i>	<i>22</i>
Tableau 7:facteur de différenciation genetique	22
Tableau 8: Résultat du test d'analyse moléculaire de la variance (AMOVA)	22
Tableau 9 : Résultat du test de neutralité.....	23
Tableau 10 : Résultat de l'analyse de mismatch distribution	24

Liste des figures

Figure 1 : Etapes de la cancérogenèse -----	4
Figure 2 : Anatomie du sein -----	4
Figure 3 : Organisation du génome mitochondrial -----	9
Figure 4 : Structure de la protéine codée par le gène Cyt.B-----	10
Figure 5 : exemples de Séquences corrigées, nettoyées et alignées -----	15
Figure 6: courbe de Raggedness des tissus sains-----	24
Figure 7 : courbe de Raggedness des tissus cancéreux -----	25

Table des matières

REMERCIEMENTS	ii
Liste des abréviations	iii
Liste des tableaux	iv
Liste des figures	v
Table des matières	vi
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	3
I-1 HISTOIRE NATURELLE DES CANCERS.....	3
I-1-1 L’initiation	3
I-1-2 La Promotion.....	3
I-1-3 La Progression	3
I-2 EXEMPLE DU CANCER DU SEIN	4
I-2-1 ANATOMIE DU SEIN	4
I-2-2 EPIDEMIOLOGIE DU CANCER DU SEIN	5
I-2-3 CLASSIFICATION DES CANCERS DU SEIN	5
I-3 GÉNÉTIQUE ET CANCER DU SEIN	8
I-3-1 HÉRÉDITÉ ET CANCER DU SEIN.....	8
I-3-2 INSTABILITÉ DU GÉNOME MITOCHONDRIAL ET NEPLASIE.....	9
I-3-3 RÔLES DU CYT.B DANS SURVENUE DU CANCER DU SEIN	10
CHAPITRE III : MATÉRIELS ET MÉTHODE	11
III-1 POPULATION D’ÉTUDE	11
III-2 ÉTUDE GÉNÉTIQUE.....	11
III-2-1 Extraction d’ADN.....	11
III-2-2 AMPLIFICATION DU GÈNE CYT B.....	12
III-2-3 RÉACTION DE SÉQUENÇAGE	13
III-3 ANALYSE MOLECULAIRE.....	13
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION.....	15
III-1 RESULTATS	15
III-1-1 ALIGNEMENT DES SÉQUENCES	15
III-1 -2 VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE.....	15
III-1 -3 DIFFÉRENCIATION GÉNÉTIQUE	21
III-1-3 ANALYSE DE L’ÉVOLUTION DÉMOGRAPHIQUE	23

III-2 DISCUSSION	25
CONCLUSION	28
Références bibliographiques	29

INTRODUCTION

L'organisme humain contient environ 30 milliards de cellules (1). Ces dernières sont des entités éminemment organisées et complexes. Cette complexité est une propriété évidente mais difficile à décrire, pour l'instant elle peut être décrite en termes d'ordre et de cohérences, en effet plus une structure est complexe plus important est le nombre de composant correctement positionné, moins bien sont tolérées les erreurs dans la nature et les interactions entre les éléments et enfin plus une régulation ou un contrôle est nécessaire pour maintenir ce système (2). En leur sein, les cellules possèdent ce qui permet de construire les organismes : le patrimoine génétique. Ce dernier n'est pas uniforme, en effet au cours de la vie il connaît une évolution qui se matérialise par des mutations. Celles-ci peuvent être à l'origine d'un dysfonctionnement cellulaire qui, lorsqu'il échappe au contrôle cellulaire génère des pathologies telle que le cancer

Le cancer est une prolifération incontrôlée d'une cellule capricieuse (2) en effet, ce sont des altérations héréditaires ou somatiques des gènes qui fait qu'une cellule normale ignore les signaux de contrôle de la croissance et forme une tumeur qui conduit finalement à la destruction de l'organisme (3).

Le cancer du sein est le cancer le plus répandu dans le monde avec près de 2261419 cas en 2020 soit 11,7% de tous les cancers et causant près de 20 millions de décès dans le monde en 2020 (4). De l'étiologie au traitement, le cancer du sein, est un sujet vaste et complexe (5). L'étiologie du cancer du sein n'est pas entièrement comprise. Une variété de facteurs interdépendants, tels que la génétique, les hormones, l'environnement, la sociobiologie et la physiologie peuvent influencer son développement(6). Un véritable problème de santé publique qui, autrefois était considéré comme une maladie des bourgeois. Aujourd'hui les grands avancés ont permis de faire un grand pas dans le diagnostic et le traitement de cette néoplasie. La réussite thérapeutique est en grande partie due à la génomique et ses techniques d'analyse moléculaire à haut débit qui ont révolutionné la recherche, en effet la caractérisation moléculaire des cancers a joué un rôle remarquable aussi bien dans le diagnostic que dans le traitement du sein.

Malgré de grand avancés dans la recherche en cancérogenèse une vaste partie de ce champ reste inexplorée et sombre.

C'est donc dans l'optique d'apporter notre pierre à l'édifice de la recherche en cancérologie que s'inscrit cette présente étude qui a pour objectif générale l'évaluation de l'étiologie du cancer du sein. De cet objectif général découle trois objectifs spécifiques que sont

- Caractérisations de la diversité génétique,
- Caractérisation de la différenciation génétique
- Et de l'évolution du cancer du sein

Pour atteindre ses objectifs notre travail tournera autour de trois chapitres.

- Le premier chapitre, consistera à faire une brève revue les différentes caractéristiques du cancer notamment celui du sein ;
- Dans le deuxième chapitre, nous étayerons la méthodologie et le matériel utilisé ;
- Et enfin dans le troisième chapitre nous présenterons les résultats obtenus, suivie d'une discussion.

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I-1 HISTOIRE NATURELLE DES CANCERS

L'histoire naturelle de cancer est difficile à retracer car la néoplasie est un processus dynamique, elle varie dans le temps et dans l'espace. Le cancer est une pathologie multifactorielle car plusieurs événements concourent à sa survenue (7). Toutefois 3 étapes fondamentales ont été décrites dans le processus de cancérogenèse : l'initiation, la promotion, et la progression

I-1-1 L'initiation

C'est la première étape de la cancérogenèse elle initie la transformation d'une cellule normale en une cellule maligne (8). Elle est d'ordre génétique et correspond à une lésion rapide et irréversible de l'ADN après exposition à un agent cancérigène

I-1-2 La Promotion

Elle correspond à la prolifération des cellules initiées. La promotion est déclenchée par des facteurs de promotion (9) qui activent les oncogènes et /ou inhibent les gènes suppresseurs ce qui va induire la prolifération et retarder la maturation des cellules initiées (10). Contrairement à l'initiation la promotion est réversible autrement dit la prolifération cellulaire s'arrête lorsque le facteur de promotion disparaît (9).

I-1-3 La Progression

C'est l'étape décisive de la cancérogenèse, les cellules initiées acquièrent de nouvelles propriétés telles que l'immortalité, la diminution des besoins en sérum pour la croissance et la perte de l'inhibition de contact (11). A ce stade le cancer est détectable et peut métastaser.

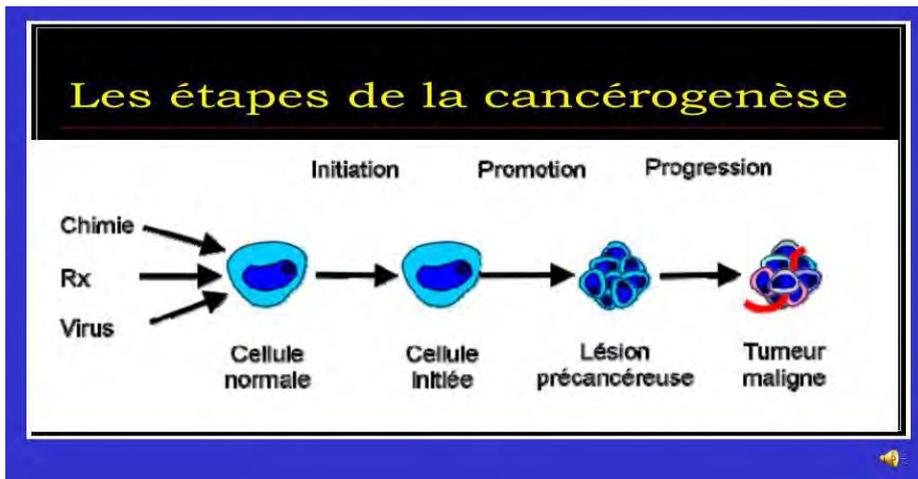


Figure 1 :
Étapes
de la
cancérogenèse

<https://slideplayer.fr/slide/1140271/>

I-2 EXEMPLE DU CANCER DU SEIN

I-2-1 ANATOMIE DU SEIN

Chez la femme, Le sein se situe au niveau de la partie antérieure de la paroi thoracique entre la deuxième et la sixième côte. Il est composé de peau, de tissu sous cutané et de tissu mammaire (12). Celui-ci est constitué de glandes sudoripares modifiées, capable de sécréter du lait : les glandes mammaires. A leur tour, les glandes mammaires sont formées d'environ 15 à 20 lobes s'ouvrant sur des canaux regroupés en mamelon (13).

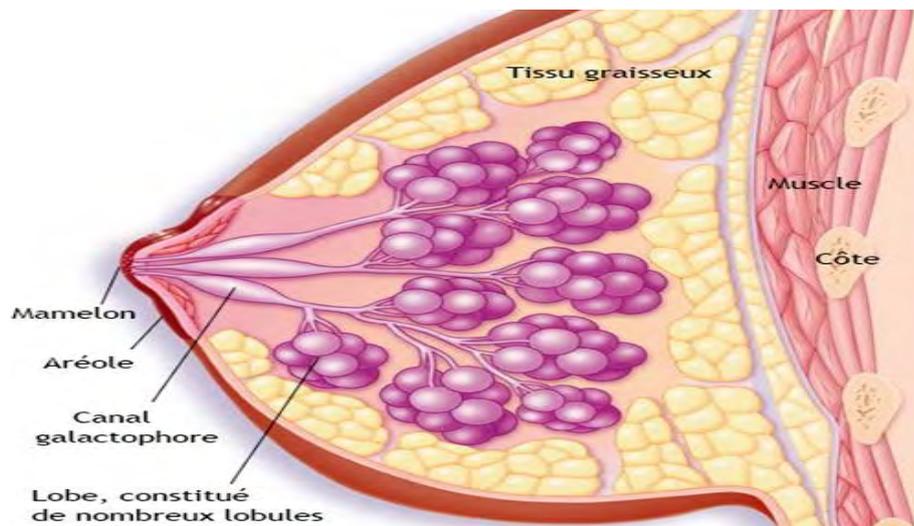


Figure 2 : Anatomie du sein

<https://www.carenity.com/infos-maladie/cancer-du-sein-155>

I-2-2 EPIDEMIOLOGIE DU CANCER DU SEIN

Selon l'OMS, le cancer du sein est le cancer le plus courant au monde, environ une femme sur 12 développe un cancer du sein dans sa vie. En 2020 plus de 2,2 millions de cas ont été recensés. Le cancer du sein est la première cause de décès chez la femme avec près de 685 000 décès en 2020. Les pays à revenu faible ou moyen étant les plus touchés. En effet la différence par rapport au pays développés est remarquable, le taux de survie à cinq ans s'élève à plus de 90 % dans les pays à revenu élevé, mais n'atteint que 66 % en Inde et 40 % en Afrique du Sud. C'est principalement en Afrique que l'on retrouve le taux le plus élevés de décès liés au cancer du sein de plus en Afrique subsaharienne, la moitié des femmes qui décèdent du cancer du sein ont moins de 50 ans (4).

En 2012, dans le monde, 1 674 000 nouveaux cas soit 25 % des cancers féminins, ont été recensés dont 788 000 dans les régions les plus développées et 883 000 dans celles en développement. Ces variations sont expliquées essentiellement par un déficit des cas post-ménopausiques liés à des espérances de vie beaucoup plus courtes et à de plus faibles expositions aux facteurs de risque dus à certains modes de vie. De 1975 à 2000, l'incidence des cancers du sein a augmenté dans tous les pays du monde de 0,5 à 1,5 % par an selon les pays. Ces augmentations peuvent s'expliquer par l'évolution des modes et durée de vie, mais aussi par l'amélioration de l'enregistrement des cas (14).

Selon la Ligue sénégalaise de lutte contre le Cancer (Lisca) le Sénégal enregistre 1 500 nouveaux cas de cancer du sein chaque année.

I-2-3 CLASSIFICATION DES CANCERS DU SEIN

I-2-3-1 CLASSIFICATION HISTOLOGIQUE

a- Le carcinome in situ

Le carcinome in situ est une prolifération de tumeurs malignes de cellules épithéliales dans le système ductulo-lobulaire du sein. Il existe en deux formes : Le carcinome in situ lobulaire (LIN) et Le carcinome in situ canalaire (15,16).

- Le carcinome lobulaire in situ

Néoplasie intraépithéliale lobulaire (LIN) est situé dans le conduit-lobulaire terminal unité, souvent accompagnée d'une implication pagetoïde des conduits terminaux adjacents. Il s'agit d'une prolifération monomorphe de cellules caractérisés par des noyaux sont ronds, réguliers

et uniformément espacés. Les lumens intracellulaires sont souvent présents le stroma est aminci
Aucune nécrose ou microcalcification des cations n'est généralement présente (15,16)

- Carcinome canalaire in situ

Le carcinome canalaire in situ (DCIS), d'autre part, est un groupe hétérogène de lésions pré-malignes qui sont généralement asymptomatiques et impalpables, mais qui peuvent être identifiées par mammographie comme des foyers de microcalcification La catégorisation du DCIS est basée principalement sur la différenciation cytonucléaire et, secondairement, sur la différenciation architecturale (polarisation cellulaire) (15,16)

- b- Carcinome infiltrant

Le cancer du sein invasif est un groupe de tumeurs épithéliales malignes caractérisées par une invasion des tissus adjacents et une tendance marquée à la métastase. à des sites éloignés. Le cancer du sein provient de l'épithélium mammaire, le plus souvent des cellules de l'unité lobulaire du conduit terminal. La grande majorité de ces tumeurs sont des adénocarcinomes (15,16)

- Carcinome canalaire infiltrant (CCI)

Il s'agit d'un groupe hétérogène, qui représente le type le plus courant de carcinome invasif, Le Carcinome canalaire infiltrant, comme toutes les autres grandes formes de sein cancer, sont moins fréquents en dessous de l'âge de 40 ans Ces tumeurs n'ont pas de caractéristique macroscopique spécifique ils peuvent avoir un contour irrégulier, étoilé ou nodulaire la configuration (15,16).

- Le carcinome lobulaire infiltrant (CLI)

Le carcinome lobulaire représente 5 à 15 % des tumeurs invasives du sein et est souvent multifocal et bilatéral. Elle se caractérise par des marges tumorales indistinctes. Ce néoplasme est composé de cellules non cohésives dispersées individuellement ou disposées en motif linéaire unique dans un stromafibrous. Les cellules néoplasiques avoir des noyaux ovoïdes ronds ou entaillés et un bord mince du cytoplasme avec un intra cytoplasme occasionnel lumen (15,16).

- c- Le cancer inflammatoire du sein

Le cancer inflammatoire du sein est un cancer rare. Les cellules cancéreuses se caractérisent par un déplacement rapide vers les vaisseaux lymphatiques de la peau du sein où elles se bloquent et provoquent une inflammation locale du sein (15,16).

I-2-3-2 CLASSIFICATION MOLECULAIRE

Les technologies à haut débit ont démontré l'hétérogénéité du sein au niveau moléculaire et conduit à des changements dans les théories antérieures de la biologie du cancer du sein. Les études mondiales de profilage de l'expression génique ont classé les cancers du sein en 5 sous-types intrinsèques par regroupement hiérarchique, à savoir les cancers du sein luminal A, luminal B, surexprimant HER2, basal-like (BLBC) et les tumeurs de type normal (17). L'expression du RE (récepteur d'oestrogène) stratifie les cancers du sein en 2 groupes distincts : ER+ et ER-. Les sous-types.

Luminal A et B ont été enrichis avec ER-positifs, alors que surexprimant HER2, BLBC et les tumeurs de type normal étaient ER-. En dehors de l'expression des gènes ER et liés à l'ER, différents sous-types ont montré une expression différentielle des gènes liés à la prolifération, HER2 amplicon et les cellules myoépithéliales. Ces différents sous-types intrinsèques ont révélé des différences d'incidence, de caractéristiques cliniques et pathologiques et, dans une large mesure, se chevauchent avec les activations. Le Luminal A est le sous type moléculaire le plus courant, il représente 40 à 50 % des cancers du sein invasifs. Typiquement, les cancers luminaux A sont de faible grade, avec le meilleur pronostic parmi tous les sous-types intrinsèques. Les cancers Luminaire B ont tendance à être de grade plus élevé et ont un plus mauvais pronostic que luminal A. Cliniquement, le groupe luminal A est susceptible de bénéficier de l'hormonothérapie seule, alors que les tumeurs lumineuses B peuvent être candidats à une chimiothérapie supplémentaire (13,17,18).

Le sous-type surexprimant HER2, représentant ~ 15 % de tous les cancers du sein invasifs, il se caractérise par la surexpression des gènes associés à la signalisation HER2/HER2 et des gènes situés dans l'amplicon HER2 sur le chromosome 17q12. Les tumeurs surexprimant HER2 sont susceptibles d'être de haut grade, ER et PR-, et suivre un cours clinique agressif. Néanmoins, ils sont très réactifs aux anti-HER2-ciblés thérapie, ce qui améliore considérablement les résultats. Tous les cancers du sous-type surexprimant HER2 ne sont pas cliniquement HER2+ et vice versa. Une minorité de cancers HER2-positifs coexpriment le RE et sont classés comme luminaux B (13,18,19).

Les BLBC sont associés à l'expression des gènes dans les cellules basales/myoépithéliales mammaires normales, y compris cytokératines basales. Ils montrent également une surexpression de gènes liés à la prolifération mais sans ER, PR et HER2-expression génique associée. Histologiquement, les BLBC sont généralement de haut grade, avec un indice de

prolifération élevée et présentent un phénotype triple négatif. Les patients BLBC ont un mauvais pronostic, et des rechutes peuvent survenir dans les 5 ans suivant le diagnostic (13,17,20).

Le type normal-like est caractérisé par l'expression de gènes similaires à la normale épithélium mammaire. Cependant, il s'agit d'un sous-groupe controversé et a été plus tard considéré comme un artefact (17).

I-3 GÉNIQUE ET CANCER DU SEIN

I-3-1 HÉRÉDITE ET CANCER DU SEIN

La forme héréditaire du cancer du sein représente 5 à 10% des cas de cancer du sein. La majorité de forme héréditaire résulte de modification de deux gènes : BRCA1 et BRCA2 (21).

BRCA1 et BRCA2 sont des gènes suppresseurs de tumeurs indispensables à la réparation des cassures d'ADN double brin par recombinaison homologue (22). Cependant, le BRCA1 est également connu pour plusieurs autres fonctions cellulaires importantes pour le maintien de l'intégrité génomique, notamment l'assemblage du fuseau mitotique, la duplication des centrosomes, le contrôle du cycle cellulaire et le remodelage de la chromatine sur les sites de rupture de l'ADN double brin (23). Outre le rôle précédemment cité, les fonctions du BRCA2 ne sont pas encore entièrement connues. Il semble principalement réguler la formation du filament RAD51 – Cette étape est critique pour catalyser l'invasion des brins et initier la recombinaison homologue. Les cellules dépourvues de BRCA1 ou BRCA2 sont incapables de réparer les cassures double brin par recombinaison homologue et, par conséquent, la réparation s'effectue par des voies sujettes aux erreurs, telles que la jonction d'extrémités non homologues (21). Ces cellules peuvent subir des mutations lors de la réparation des brins et accumulent souvent des réarrangements chromosomiques au cours des cycles successifs de division cellulaire (22). Alors que la majorité de ces réarrangements entraînent la mort cellulaire, dans certains cas, les cellules filles mutantes sont stables et conduisent à l'émergence d'une lignée cellulaire dominante qui acquiert les capacités de division cellulaire autonome et de potentiel métastatique, deux des caractéristiques du cancer (23). BRCA1 s'est également avéré nécessaire pour l'activation de l'arrêt du cycle cellulaire en phase S et G2/M après des dommages à l'ADN, ce dernier dépendant de la phosphorylation préalable de BRCA1 par le point de contrôle maître kinase ATM (24).

Des mutations au niveau de ces gènes conduisent à une prédisposition au cancer du sein et augmentent ainsi le risque d'en développer. En effet, 75% des femmes présentant des mutations au niveau de ces gènes développent le cancer du sein (23).

I-3-2 INSTABILITE DU GENOME MITOCHONDRIAL ET NEAPLASIE

L'ADNmt humain est une molécule bicaténaire, circulaire et fermée de 16 569 paires de nucléotides (pb). Il code pour un petit-sous unités (12S) et un grand sous unités d'ARNr (16S), 22 ARNt et 13 polypeptides. Tous les polypeptides codés par l'ADNmt sont des sous-unités de la phosphorylation oxydative (25). L'ADNmt humain possède un taux de mutation au moins 10 fois plus élevé que l'ADN nucléaire (26). Des réarrangements complexes et des substitutions à base unique dans l'ADNmt mitochondrial sont associés à un certain nombre de maladies dégénératives sporadiques et héréditaires maternelles qui affectent les tissus fortement dépendants de la bioénergétique de l'ADNmt (27). Très probablement, ces mutations sont liées à la forte production d'espèces réactives de l'oxygène dans la mitochondrie (28) et à un système de réparation de l'ADN moins efficace que celui de l'ADN nucléaire (29). Les variantes génétiques qui surviennent dans la lignée germinale femelle sont transmises à la génération suivante, où elles peuvent être observées sous forme de nouveaux polymorphismes ou de maladies mitochondriales (27). Des mutations peuvent également survenir dans les tissus somatiques, et elles semblent s'accumuler avec l'âge dans certains systèmes (25). Des mutations somatiques de l'ADNmt ont été observées dans les néoplasies humaines

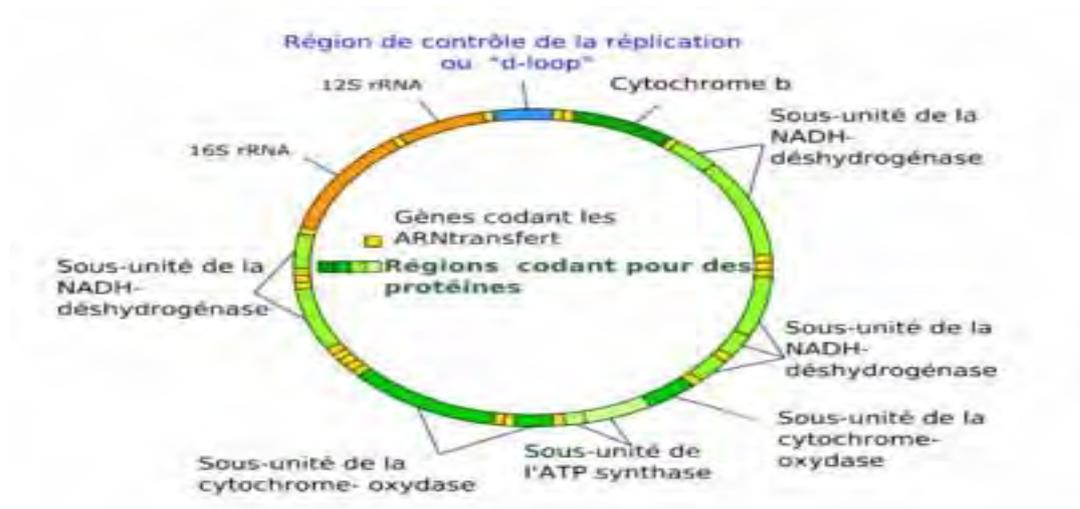


Figure 3 : Organisation du génome mitochondrial

<https://www.police-scientifique.com/adn/adn-mitochondrial/>

I-3-3 ROLES DU CYT.B DANS SURVENUE DU CANCER DU SEIN

Le Cyt.B ou encore le Mt-Cyb est un gène mitochondrial de 1140 pb qui code pour une protéine de même nom (30). Il joue un rôle vital dans l'assemblage et la fonction du complexe-III, un des cinq complexes du système de phosphorylation oxydative (31). Avec le Cytochrome c1 et la protéine fer-soufre, il forme le noyau catalytique des enzymes (32). Des mutations du gène Cyt.B sont associées à une déficience du complexe combiné I+III ou du complexe III uniquement (33). Ceci a pour conséquence le blocage du flux d'électrons dans la chaîne de transport d'électrons, provoquant une augmentation de la production de ROS et contribue ainsi à la survenue du cancer (28,34). De plus, la surexpression de Cyt.B entraîne une augmentation ROS accompagnée d'une augmentation consommation d'oxygène et production de lactate (25). Le Cyt.B , surexprimé induit une croissance tumorale significative in vitro et in vivo en déclenchant progression significative du cycle cellulaire grâce à une régulation à la hausse des voie de signalisation du facteur NFκB2 (31).

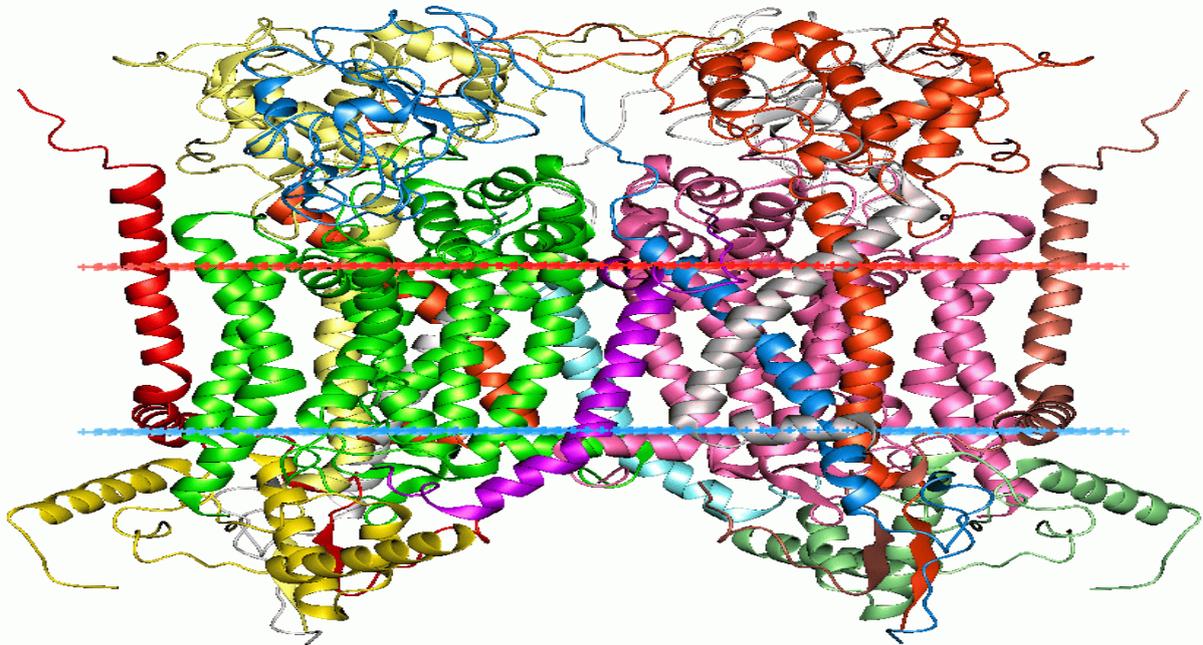


Figure 4 : Structure de la protéine codée par le gène Cyt.B

https://en.wikipedia.org/wiki/File:1101_opm.png

CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODE

III-1 POPULATION D'ETUDE

La population de cette étude est constituée par 75 femmes vivant au Sénégal. Cet échantillon total est scindé en un groupe témoin de 37 individus et un groupe de 38 individus ayant le cancer du sein. Les prélèvements ont été obtenus après un consentement libre et éclairé des volontaires.

III-2 ETUDE GENETIQUE

III-2-1 Extraction d'ADN

L'extraction de l'ADN a été faite suivant le protocole standard Quiagen. Tous d'abord les tissus ont été noyés dans une solution de tampon de digestion et le mélange incubé au bain marie à 55° C durant toute une nuit. Cette étape permet de séparer les cellules initialement jointes. 20µl de protéinase k ont été ajoutées pour dégrader toutes les protéines. Pour se débarrasser des déchets tissulaires le mélange a été centrifugé à 1361,35688 radians/seconde durant une minute puis on a récupéré le surnageant. Sur celui-ci on a ajouté 200µl de tampon de lyse cellulaire (AL), ce mélange a été incubé à 70° durant 10mins après avoir vortexer pendant 15 secondes. La phase suivante a consisté à ajouter 200µl d'éthanol absolu 70° dans le mélange et transvaser le tout, après vortex, dans une colonne contenant une membrane de silice placée au préalable dans un tube de 2ml (fourni par le kit). Cette étape permet de retenir l'ADN au niveau de la membrane siliceuse. En effet, l'ADN étant chargé négativement est retenu au niveau de la membrane par la silice qui est chargée positivement. Le tube collecteur a été jeté et la colonne placée dans un nouveau. Pour purifier l'ADN fixé sur la membrane de la colonne plusieurs séries de lavage ont été effectuées, d'abord 500µl du tampon AW1 ont été ajoutés puis après centrifugation à 1361,35688 radians/seconde pendant 1min on a ajouté 500µl du tampon AW2 et on a centrifugé de nouveau pendant 3min. Pour décoller l'ADN de la membrane de la colonne, 200 µl de tampon d'élution ont été versés à travers la membrane siliceuse. Le tampon a été préalablement incubé à 70°C pour augmenter le rendement de 15 à 20 %. L'éluat fut ainsi recueilli dans un tube de 1,5 ml et conservé à -20°C.

Pour vérifier la qualité de l'ADN obtenue une migration électrophorétique a été effectuée. Elle consiste en une séparation des fragments d'ADN qui migrent sur un support solide soumis à un champ électrique. En effet les molécules d'ADN étant de charge négative vont migrer vers

l'anode du champ électrique. Plus le fragment est lourd moins vite il migre vers le pôle positif ainsi on peut estimer la taille des fragments à l'aide du marqueur de taille smart ladder 200pb. 7 µl d'extrait ont été ajoutés mélangés avec 3µl de bleu de bromolphenol (bleu de charge) puis déposer sur les puits du gel d'agarose 1% et migrer à 100 volts pendant 30 à 35mn. La révélation s'est faite dans une chambre noire, sous UV après passage dans un bain de bromure d'éthidium.

III-2-2 AMPLIFICATION DU GENE CYT B

LA PCR (Polymérase Chain Réaction) est un procédé permettant d'amplifier une séquence d'ADN cible à partir d'une petite quantité ADN génomique. Elle a pour principe l'élongation des amorces par une polymérase en présence de dNTPs et de Mg²⁺. Le gène d'intérêt de cette étude est le Cyt.B, un gène de l'ADN mitochondriale de plus de mille paires de bases. Les réactifs et les volumes utilisés sont illustrés dans le tableau I

Tableau 1 : réactifs de la PCR

REACTIFS	VOLUME
Eau milli Q	28,9 µl
Tampon (x10 contenant du Mg ²⁺	5 µl 15MN
dNTPS	2 µl
Taq Polymérase	0,1 µl
Amorce Sens : H15915 (TCT-CCA-TTT-CTG-GTT-TAC-AAG-AC)	5 µl
Amorce Anti Sens : L14723 (ACC-AAT-GAC-ATG-AAA-AAT-CAT-GGT-T)	5 µl
Extrait d'ADN	4 µl
Volume réactionnel	50 µl

La réaction de PCR s'est faite dans un thermocycleur de type Eppendorf suivant le programme ci-dessus

94°	—————>	3 mn
92°	—————>	45 secondes} x 40 cycles
50°	—————>	1 mn
72°	—————>	1mn

III-2-3 REACTION DE SEQUENÇAGE

Le séquençage est une technique permettant de déterminer la succession nucléotidique d'un fragment d'ADN. Il existe plusieurs méthodes de séquençage, celle utilisée dans cette présente étude est la méthode développée par F Sanger en 1977. Elle repose sur l'utilisation de dNTPS, molécules qui bloquent la réaction d'amplification car ils sont dépourvus de groupement hydroxyle sur le carbone 3' et donc incapable de former une liaison phosphodiester avec un autre nucléotide. En d'autres termes c'est une réaction d'amplification qui a la particularité d'utiliser des dNTPS. Ces derniers sont couplés à des fluorochromes détectables après leur fixation (ddATP-vert, ddTTP-rouge, ddCTP-bleu et ddGTP-jaune). Les réactions de séquençages ont été effectuées dans un thermocycleur de type MJ Research PTC-225 Peltier avec les kits ABIPRISM BigDye TM Terminator Cycle. Chaque échantillon a été séquencé en utilisant l'amorce sens. Les fragments fluorescents ont été purifiés avec le protocole BigDye Xterminator purification. Les échantillons ont été suspendus dans de l'eau distillée et soumis à une électrophorèse dans ABI 3730xl séquencer (Applied Biosystems).

Le séquençage a été réalisé dans la ville de Seoul en Corée du Sud par une société américaine nommée Macrogen à partir de 30 µl du produit PCR et dans un seul sens.

III-3 ANALYSE MOLECUALIRE

Après correction, les séquences ont été soumises au logiciel BioEdit version 8.0.5 (Hall, 1999) pour un alignement en utilisant l'algorithme ClustalW. Les séquences obtenues ont été minutieusement vérifiées, nettoyées et alignées avant d'entamer toutes analyses phylogénétiques. La détermination des paramètres de variabilité et de diversité génétique, des paramètres de différenciation génétique, et des tests d'évolution démographique a été effectuée

grâce à une panoplie de logiciel. Les paramètres de la variabilité génétique correspondent en quelque sorte à la carte d'identité de notre jeu de données. Ces paramètres, composés du nombre de sites polymorphes, du nombre total de mutations, la nature des mutations (% de transitions et de transversions), de la composition en acides aminés ainsi que les diversités haplotypique et nucléotidique pour chaque type de tissus ont été obtenus grâce au logiciel DnaSP version 5.10 (Librado et Rozas, 2009) et MEGA version 6.06 (Tamura et al., 2013). La significativité des différences dans les fréquences en acides aminés entre les types de tissus a été testée grâce au logiciel R studio. D'abord la normalité a été testée puis selon le résultat, des tests paramétriques (test de student) ou non paramétriques (test de Wilcox) ont été effectués. Un seuil de significativité à 5% a été retenu. L'estimation de la différenciation génétique s'est faite selon deux indices : les distances génétiques de Nei, intra et inter-populations, obtenues avec le logiciel MEGA version 6.06 (Tamura et al., 2013) et les Fst (facteur de différenciation génétique) obtenus avec le programme Arlequin version 3.5.1.3 (Excoffier et al., 2010). Grâce à ce même logiciel les tests d'évolution ont été effectuées.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DICUSSION

III-1 RESULTATS

III-1-1 ALIGNEMENT DES SEQUENCES

Le séquençage a été effectué chez les 75 individus. Les séquences obtenues ont été corrigées, nettoyées puis alignées. La figure ci-après donne un aperçu des séquences après traitement.

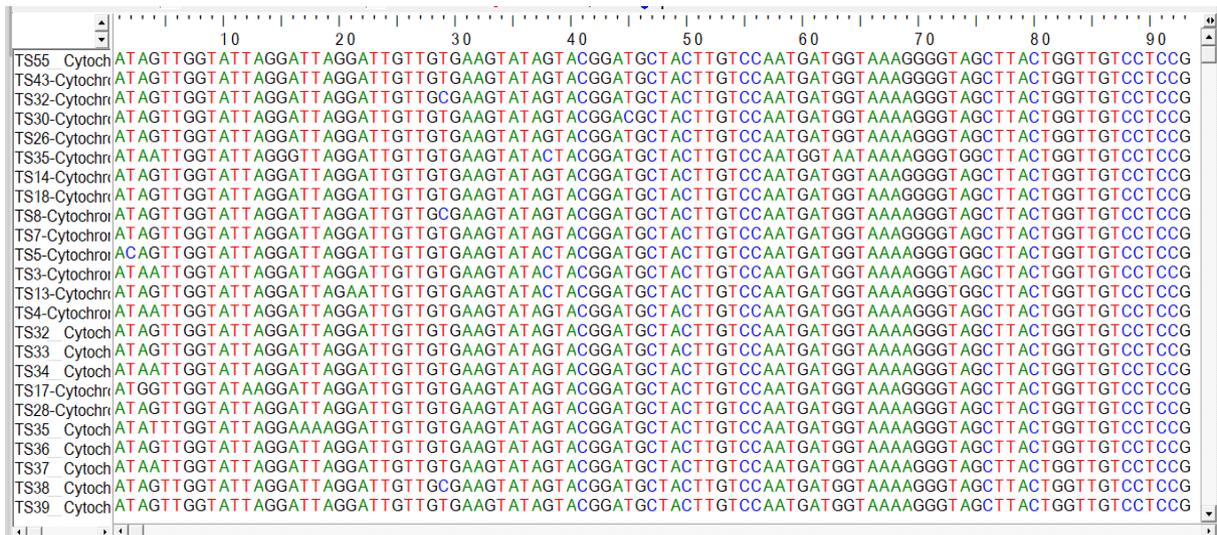


Figure 5 : exemples de Séquences corrigées, nettoyées et alignées

III-1 -2 VARIABILITE GENETIQUE

III-1 -2-1 LES PARAMETRES BASIQUES SE VARIABILTE GENETIQUE

Le Tableau 2 ci-après indique les indices de variabilité génétique aussi bien dans les tissus sains que dans les tissus cancéreux. La comparaison des indices entre les deux groupes de tissus étudiés montre que le gène Cyt.B est très variable. En effet aussi bien dans les tissus sains que dans les tissus cancéreux, on retrouve des sites polymorphes (102 sites dans les tissus témoins et 143 dans les tissus cancéreux). Ceci est confirmé par le nombre total de mutations (Eta) qui est de 128 mutations dans les tissus sains et 177 dans les tissus cancéreux. Cependant nous constatons que le nombre moyen de différence nucléotide est plus élevés dans les tissus cancéreux (31, 384) que dans les tissus sains (25,768) alors que le nombre d'haplotype est plus élevé dans les tissus sains, 38 haplotypes contre 35 dans les tissus cancéreux. Les pourcentages de transition et de transversion ainsi que le taux de mutation r sont sensiblement égaux dans les deux types de tissus. Dans les deux groupes de tissus on constate que le taux de transversion

est supérieur au taux de transition. Le taux de mutation synonyme (K_s) est supérieur au taux de mutation non synonyme (K_{ns}) dans les tissus sains respectivement (0,202 ; 0,046) alors que dans les tissus cancéreux on observe le contraire $K_s = 0,04$ est inférieur à $K_{ns} = 0,063$.

Tableau 2 : Paramètres basique de la variabilité genetique

Indice de variabilité	TISSUS SAINS	TISSU CANCEREUX
Taille de l'échantillon	37	38
Nombre de sites	325	325
Sites monomorphes	223	182
Sites polymorphes	102	143
Nombre total de mutations Eta	128	177
Nombre d'haplotype	38	35
Nombre moyen de différence nucléotidique k	25,768	31,384
%Transition	67,92	67.3
%Transversion	32,08	32.76
Taux de mutation R	1.976	1.968
Nombre d'haplotypes	36	35
Taux de mutation synonyme (K_s)	0,202	0,045
Taux de mutation non Synonyme (K_{ns})	0,046	0,063

Tableau 3 : Fréquences nucléotidiques

INDIVIDUS	T	C	A	G	A+T	C+G
TS55 Cytochrome b	30,2	12,3	26,5	31,1	57	43
TS43-Cytochrome b1	30,8	11,4	27,4	30,5	58	42
TS32-Cytochrome b1	30,5	11,1	26,8	31,7	57	43
TS30-Cytochrome b1	30,8	12,3	26,8	30,2	57,5	42
TS26-Cytochrome b1	30,5	11,1	26,5	32,0	57	43
TS35-Cytochrome b1	30,8	11,4	26,2	31,7	57	43
TS14-Cytochrome b1	31,1	11,1	26,5	31,4	58	42
TS18-Cytochrome b1	30,8	11,1	27,1	31,1	58	42
TS8-Cytochrome b1	30,5	12,3	25,5	31,7	56	44
TS7-Cytochrome b1	30,8	11,1	26,2	32,0	57	43
TS5-Cytochrome b1	29,2	12,9	27,1	30,8	56	44
TS3-Cytochrome b1	30,2	12,6	28,9	28,3	59	41
TS13-Cytochrome b1	30,2	12,0	26,2	31,7	56	44
TS4-Cytochrome b1	30,2	10,8	26,8	32,3	57	43
TS32 Cytochrome b	28,9	14,2	25,2	31,7	54	46
TS33 Cytochrome b	28,9	12,0	25,8	33,2	55	45
TS34 Cytochrome b	30,5	9,8	25,8	33,8	56	44
TS17-Cytochrome b1	30,2	9,8	24,6	35,4	55	45
TS28-Cytochrome b1	30,5	10,2	24,3	35,1	55	45
TS35 Cytochrome b	29,2	10,8	26,2	33,8	55	45
TS36 Cytochrome b	28,6	13,8	25,8	31,7	54	46

TS37 Cytochrome b	30,5	9,8	25,8	33,8	56	44
TS38 Cytochrome b	30,2	10,2	25,2	34,5	55	45
TS39 Cytochrome b	30,2	14,2	24,6	31,1	55	45
TS40 Cytochrome b	30,5	9,8	25,2	34,5	56	44
TS41 Cytochrome b	30,2	10,2	25,8	33,8	56	44
TS44 Cytochrome b	29,8	10,5	25,8	33,8	56	44
TS46 Cytochrome b	30,5	9,8	25,5	34,2	56	44
TS48 Cytochrome b	29,8	10,5	25,8	33,8	56	44
TS49 Cytochrome b	29,2	11,7	25,2	33,8	54	46
TS50 Cytochrome b	30,5	9,8	25,5	34,2	56	44
TS51 Cytochrome b	30,2	10,8	26,2	32,9	56	44
TS52 Cytochrome b	29,8	11,1	26,5	32,6	56	44
TS54 Cytochrome b	30,5	11,1	26,2	32,3	57	43
TS57 Cytochrome b	30,8	11,7	25,8	31,7	57	43
TS58 Cytochrome b	30,5	9,5	25,8	34,2	56	44
TS59 Cytochrome b	30,2	11,1	26,2	32,6	56	44
TC42 Cytochrome b	28,6	12,6	27,1	31,7	56	44
TC53 Cytochrome b	30,5	9,8	25,5	34,2	56	44
TC3-Cytochrome b1	29,5	11,1	27,4	32,0	57	43
TC4-Cytochrome b1	29,8	12,0	27,4	30,8	57	43
TC5-Cytochrome b1	30,5	11,7	26,8	31,1	57	43
TC7-Cytochrome b1	30,8	11,1	27,1	31,1	58	42
TC8-Cytochrome b1	30,5	11,4	26,2	32,0	57	43
	30,8	11,4	27,1	30,8	58	42

TC14-Cytochrome b1						
TC15-Cytochrome b1	31,1	12,0	27,4	29,5	58	42
TC26-Cytochrome b1	29,5	12,6	28,3	29,5	58	42
TC45 Cytochrome b	31,1	12,6	30,5	25,8	62	38
TC18-Cytochrome b1	30,2	11,7	27,1	31,1	57	43
TC20-Cytochrome b1	29,8	12,0	26,5	31,7	56	44
TC23-Cytochrome b1	30,8	11,1	26,8	31,4	58	42
TC28-Cytochrome b1	30,8	10,8	26,8	31,7	58	42
TC30-Cytochrome b1	30,8	13,2	27,7	28,3	58	42
TC37-Cytochrome b1	30,5	12,3	27,7	29,5	58	42
TC38-Cytochrome b1	30,8	11,4	28,0	29,8	59	41
TC36 Cytochrome b	30,8	12,0	26,2	31,1	57	43
TC38 Cytochrome b	29,5	12,0	26,2	32,3	56	44
TC39 Cytochrome b	29,2	10,2	25,8	34,8	55	45
TC40 Cytochrome b	29,2	12,6	28,3	29,8	58	42
TC42 Cytochrome b	27,1	13,5	27,4	32,0	54	46
TC31 Cytochrome b	30,5	9,8	25,2	34,5	56	44
TC19-Cytochrome b1	30,5	9,8	25,2	34,5	56	44
TC33 Cytochrome b	29,5	10,2	26,5	33,8	56	44
TC35 Cytochrome b	30,5	9,8	25,5	34,2	56	44
TC44 Cytochrome b	28,9	11,7	26,2	33,2	55	45
TC47 Cytochrome b	30,2	10,8	25,8	33,2	56	44
TC50 Cytochrome b	30,8	9,8	25,5	33,8	56	44
TC52 Cytochrome b	29,8	10,5	25,8	33,8	56	44

TC53 Cytochrome b	30,5	9,8	25,5	34,2	56	44
TC43 Cytochrome b	29,2	11,7	27,1	32,0	56	44
TC46 Cytochrome b	31,4	11,7	24,9	32,0	56	44
TC48 Cytochrome b	30,2	11,7	26,2	32,0	56	44
TC49 Cytochrome	29,5	11,7	25,8	32,9	55	45
TC51 Cytochrome b	31,1	11,1	26,8	31,1	58	42
TC54 Cytochrome b	30,2	11,1	26,8	32,0	57	43

La différence moyenne de la fréquence des acides aminés, le résultat du test de Wilcoxon sont illustrés dans le tableau 4. Malgré de nombreuses différences observées dans les deux groupes de tissus, le test de Wilcoxon montre que seules trois acides aminés ont une différence significative c'est-à-dire ont une P-value inférieure à 0,05. Il s'agit de glutamine (Glu) qui absent dans les tissus sains apparait dans les tissus cancéreux à une fréquence moyenne de 0,201, de la glycine dont la fréquence passe de 10,03 dans les tissus sains à 9,459 dans les tissus cancéreux, et de la Lysine dont la fréquence moyenne augmente également dans les tissus cancéreux.

Tableau 4:Fréquence des acides aminés dans les deux groupes de tissus

Acide amines	Fréquences des Aa dans les Tissus sains	Fréquences des Aa dans les Tissus cancéreux	Test de WILCOX P-VALUE
Ala	7,438	7,216	0.290
CYS	4,621	4,887	0.027
Asp	5,212	5,204	0.621
Glu	0	0,201	
Phe	1,070	0,948	0.288
Gly	10,03	9,459	0.001
His	1,606	1,983	0.086

Ile	8,650	8,395	0.195
Lys	4,959	5,635	0.013
Leu	7,889	8,079	0.137
Met	10,28	9,919	0.578
Asn	2,986	2,817	0.41
Pro	5,128	4,859	0.08575
Gln	2,254	2,070	0.136
Arg	1,831	1,523	0.076
Ser	8,453	8,510	0.679
Thr	5,804	5,721	0.303
Val	6,649	6,958	0.344
Trp	3,155	3,450	0.186
Tyr	1,972	2,156	0.498

III-1 -2-2 INDICES DE DIVERSITE GENETIQUE

Les indices de diversité de chaque groupe de tissus sont indiqués dans le tableau IV. On constate que la diversité haplotypique (Hd) est élevée dans les tissus sains et dans les tissus cancéreux (respectivement 0,997 et 0,995) alors que la diversité nucléotidique est faible dans ces deux groupes avec 0,0792 dans les tissus sains et 0,096 dans les tissus cancéreux.

Tableau 5 : indices de variabilité génétique

TISSUS INDICES	SAINS	CANCEREUX
Diversité haplotypique (hd)	0,997	0,995
Diversité nucléotidique (pi)	0,0792	0,0965

III-1 -3 DIFFERENCIATION GENETIQUE

III-1 -3-1 DISTANCE GENETIQUE DE NEI

L'analyse de la distance génétique au sein des tissus sains, au sein des tissus cancéreux et entre ces deux groupes révèle que la distance génétique est moins élevée au sein des tissus sains (0.195) qu'au sein des tissus cancéreux (0.247). On constate également que la distance génétique inter-groupes qui est de 0.225, est beaucoup plus proche de la distance génétique au sein des tissus sains.

Tableau 6 : Distance génétique de NEI

Tissus	Distance génétique intragroupe	Distance génétique intergroupes
Sain	0.195 (0.043)	0.225 (0.044)
Cancéreux	0.247 (0.045)	

III-1 -3-2 FACTEUR DE DIFFERENCIATION GENETIQUE ET TEST D'AMOVA

Les tableaux 7 et 8 ci-après illustrent respectivement la valeur de Fst dans chaque sous population (témoins et tumoraux) et les résultats du test de l'analyse moléculaire de la variance (AMOVA) Ces résultats sont accompagnés d'une p-value qui renseigne sur significativité des valeurs obtenues. On constate que la valeur du facteur de différenciation (Fst) est plus élevée dans les tissus sains (0.01308) que dans les tissus cancéreux (0.00790) et que la valeur de la P-value est supérieure à 0.05 donc non significatif. Les résultats du test d'AMOVA montre une également une valeur de p-value non significatif

Tableau 7:facteur de différenciation génétique

GROUPE	FST	P-VALUE
TISSUS SAINS	0.01308	0.14370
TISSUS CANCEREUX	0.00790	

Tableau 8: Résultat du test d'analyse moléculaire de la variance (AMOVA)

SOURCES DE LA VARIATION	POURCENTAGE DE VARIATION	FST GLOBAL
INTRERPOPULATION	1.05	0.01046
INTRAPOPULATION	98.95	

III-1-3 ANALYSE DE L'EVOLUTION DEMOGRAPHIQUE

Les tests de neutralité D de Tajima qui mesure la différence entre les sites polymorphes et le nombre moyen de différence nucléotidique et le FS de Fu qui représente la probabilité d'obtenir un nombre d'haplotype attendu supérieur ou égal au nombre d'haplotype observé ont donné les résultats du tableau 9. On constate que pour le test de neutralité D de Tajima la valeur de probabilité statistiquement non-significative Pour les deux groupes par contre pour les test FS de fu la p-value est inférieure à 0,005 dans les deux groupes de tissus donc statistiquement significative.

Tableau 9 : Résultat du test de neutralité

TISSUS	D de Tajima	P-value (D de Tajima)	FS de FU	P-Value (Fs de fu)
SAINS	0.19599	0.64800	-12.60095	0.00200
CANCEREUX	-0.29800	0.43100	-11.09388	0.00000

Les résultats du test de neutralité étant contradictoire, l'analyse du mismatch distribution a révélé les résultats suivants : pour l'indices SSD la valeur de probabilité est non significative aussi bien pour les tissus sains que pour les tissus cancéreux respectivement (0.93000, 0.99000). Le même résultat est observé pour l'indice de Raggedness, les valeurs de probabilité sont non significatives dans les groupes de tissus et la valeur des indices (SSD et Raggedness) toutes supérieure à 0.

L'analyse des courbes de Raggedness montre la distribution démographique par paire observée (en rouge) est unimodale dans les groupes de tissus

Tableau 10 : Résultat de l'analyse de mismatch distribution

INDICES	TISSUS SAINS	TISSUS CANCEREUX
SSD	0.00336	0.00248
SSD P-value	0.93000	0.99000
Raggedness index	0.00445	0.00303
Raggedness P-value	0.87000	0.96000

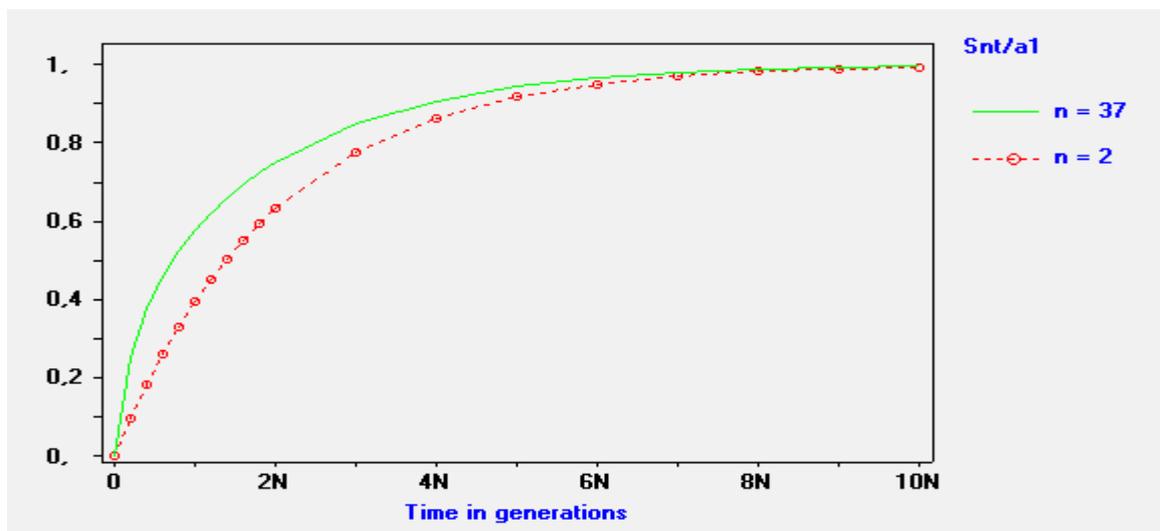


Figure 6: courbe de Raggedness des tissus sains

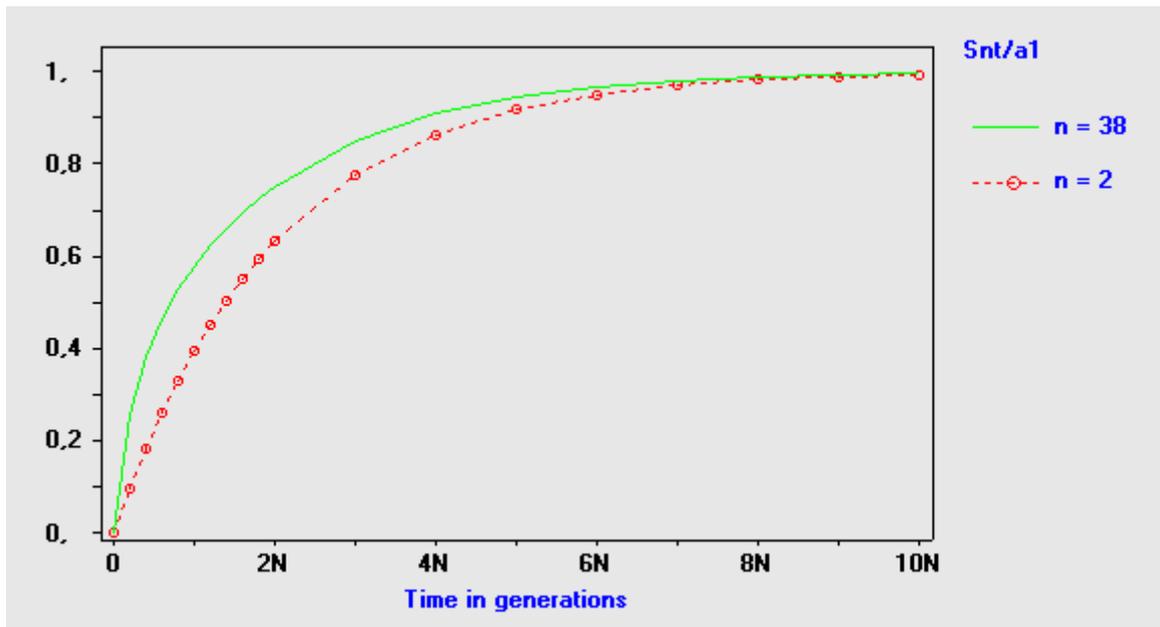


Figure 7 : courbe de Raggedness des tissus cancéreux

III-2 DISCUSSION

Dans cette présente étude le gène mitochondrial Cyt.B qui est impliqué dans le mécanisme de phosphorylation oxydative est le gène cible. L'objectif à long terme est d'identifier des marqueurs génétiques permettant de faire le diagnostic et/ou le traitement du cancer du sein. La méthodologie utilisée relève de l'analyse phylogénétique par l'étude de la diversité génétique, de la différenciation genetique et de l'analyse de l'évolution démographique.

Nos résultats ont révélé que le gène Cyt.B est un gène présentant beaucoup de variabilité. En effet beaucoup de sites polymorphes ont été découvert aussi bien dans le groupe de tissus sains que dans le groupe de tissus cette forte variabilité pourrait donc être expliquée par le fait que la mitochondrie est le central énergétique de la cellule elle produit des ROS qui sont capable de perturber la stabilité du génome mitochondrial ce qui fait que celui-ci est sujette à de nombreuses mutations Par conséquent, les molécules d'ADNmt sont nettement exposées aux espèces réactives de l'oxygène (ROS) et y sont très sensibles en raison de l'absence d'action protectrice des histones. La réplication et la réparation des mt-génomes dépend des gènes nucléaires et est sujet à erreur avec les adduits volumineux étant la lésion la plus inefficacement réparée, suivis d'un mauvais appariement des brins glissés et Dommages ROS. En raison de l'agression accrue des ROS, de la sensibilité élevée aux dommages et de la réparation déficiente

des lésions, le taux de mutations de l'ADNmt est remarquablement supérieur à celui de l'ADN nucléaire.(35)

La comparaison des taux de transitions et transversions ont révélé un des caractéristiques du génome mitochondrial qui contrairement au génome nucléaire subit plus de mutations de type transition comme démontrée par l'étude de *Bromham et al.* (36).

Dans les deux groupes la comparaison des taux de mutations synonymes et mutations non synonymes révèle une sélection négative éliminant de mutations non synonymes dans les tissus sains et une sélection positive avec changement d'acide aminés ainsi les substitutions non synonymes sont favorisées dans les tissus cancéreux ceci explique le fait que malgré qu'il est une grande variabilité dans les tissus sains il n'y pas de chargement d'acide aminés donc la protéine produite est normale d'où l'absence de cancer. Ceci confirme donc le fait les mutations de type transition induisent moins de changement d'acides aminés.

Pour tous les individus, le pourcentage de A+T était supérieur au pourcentage de C+G ceci veut donc dire que l'ADN de ses individus sont susceptibles aux mutations ce qui confirme davantage l'instabilité du génome mitochondrial. Ces résultats sont en accord avec ceux de Mbaye et *al* (2012). (37)

L'apparition de la glutamine dans les tissus cancéreux n'est étonnante en effet cet acide aminé joue un rôle dans la croissance cellulaire en stimule également l'expression du gène de l'IGFBP1 (Insuline like Growth Factor Binding Protein 1) (38). La glycine est l'un des précurseurs de la glutathion (GSH), la principale molécule antioxydante soluble endogène dans les cellules de mammifères. Il offre une protection contre le stress oxydatif en servant de substrat aux enzymes antioxydantes (39). Une diminution de la glycine entraîne donc une diminution de la GSH or Deneke et *al* ont démontré qu'une déplétion du GSH entraîne une augmentation de la production de radicaux libres (40).

La comparaison de la distance génétique entre les tissus sains et les tissus cancéreux montre qu'il existe une grande diversité au sein de chaque groupe de tissus mais également entre les deux groupes. Ceci ne fait que confirmer la grande variabilité tantôt évoquer.

Le test de significativité de facteur de différenciation génétique (fst) révèle une p-value non significative indiquant ainsi qu'il n'a pas de différenciation génétique en fonction du type de tissus. Par rapport au test d'AMOVA, la valeur de p-value étant significative (p-value < 0.05) on peut dire qu'il existe une structuration génétique en fonction du type de tissus de plus la valeur du Fst global renseigne que 1,046 % de la variabilité observé est due à la différenciation

genétique inter tissus entre témoins et tumoraux. En d'autres termes 1,046% de la variabilité génétique observée est due à une différenciation intragroupe.

L'étude de l'évolution démographique à travers les indices D de Tajima et F_S de F_u révèle des résultats contradictoires. En effet le D de Tajima revient avec une p-value non significative ($< 0,05$) ce qui signifie selon la théorie neutraliste de Kimura que les mutations évoluent aléatoirement. A l'opposé la p-value de F_S de F_u est quand a-t-elle significative avec une valeur de F_S de F_u inférieure à 0 ce qui signifie que la population est expansion démographique. L'analyse du mismatch distribution à travers les indices Raggedness et SSD révèle des p-value non significative avec des valeurs supérieures à 0 ce qui veut donc dire qu'on a un excès de variants rares et qu'on assiste forte expansion démographique.

CONCLUSION

La recrudescence des cas de cancers du sein chez les femmes tire la sonnette d'alarme sur la nécessité de compréhension de l'étiologie de cette pathologie.

Nos résultats ont révélé une forte variabilité génétique au sein des groupes de tissus mais également entre eux, une absence de différenciation en fonction des tissus et enfin une forte expansion démographique avec un excès de variant rare. Deux acides aminés ont eu une variabilité de fréquences significative : la glutamine et la lysine. Les pourcentages de A+T et C+G observés montrent que le gène Cyt.B est susceptible aux mutations.

La forte variabilité du génome mitochondrial est en fait une grande barrière pour la mise au point de marqueurs moléculaires.

Il ne fait l'ombre d'aucun doute que la compréhension de l'étiologie de cette néoplasie passe par l'analyse phylogénétique cependant la nécessité de basculer vers des études d'associations génétiques pour éradiquer cette pathologie devient plus qu'évidente.

Références bibliographiques

1. Roy AL, Conroy RS. Toward mapping the human body at a cellular resolution. *Mol Biol Cell*. 1 août 2018;29(15):1779-85.
2. KARP G. BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE. 3e éd. De Boeck; 2002. 850 p.
3. Shipitsin M, Polyak K. The cancer stem cell hypothesis: in search of definitions, markers, and relevance. *Mai 2008*; 459-63.
7. Foulds L. The natural history of cancer. *J Chronic Dis*. 1 juill 1958 ;8(1):2-37.
8. EPIGENECTIQUE ET ORIGIN OF CANCER.pdf.
9. Tubiana M. Généralités sur la cancérogène. *C R Biol*. 1 févr 2008 ;331(2):114-25.
10. Berenblum I. Carcinogenesis and tumor pathogenesis. *Adv Cancer Res*. 1954 ;2:129-75.
11. Cuthill S. Cellular epigenetics and the origin of cancer. *BioEssays*. 1994 ;16(6):393-4.
12. Pandya S, Moore RG. Breast Development and Anatomy. *Clin Obstet Gynecol*. Mars 2011 ;54(1) :91-5.
13. DIENHART CM. Anatomie et Physiologie humaine. 2eme EDITION. Montréal: Les editions HRW LTEE; 239 p.
14. Sancho-Garnier H, Colonna M. Épidémiologie des cancers du sein. *Presse Médicale*. oct 2019;48(10):1076-84.
15. Phipps AI, Li CI. Breast Cancer Biology and Clinical Characteristics. In: Li C, éditeur. *Breast Cancer Epidemiology* ; 2010 p. 21-46.
16. Fabbri A, Carcangiu ML, Carbone A. Histological Classification of Breast Cancer. In: Bombardieri E, Gianni L, Bonadonna G, éditeurs. *Breast Cancer : Nuclear Medicine in Diagnosis and Therapeutic*
17. Tsang JYS, Tse GM. Molecular Classification of Breast Cancer. *Adv Anat Pathol*. 6 janv 2020; 27(1):27-35.
18. Provenzano E, Ulaner GA, Chin S-F. Molecular Classification of Breast Cancer. *PET Clin*. juill 2018;13(3):325-38.
19. Pusztai L, Mazouni C, Anderson K, Wu Y, Symmans WF. Molecular Classification of Breast Cancer: Limitations and Potential. *The Oncologist*. 2006;11(8):868-77.
20. Al-thoubaity FK. Molecular classification of breast cancer: A retrospective cohort study. *Ann Med Surg*. 1 janv 2020;49:44-8.
21. Casey G. The BRCA1 and BRCA2 breast cancer genes. *Curr Opin Oncol*. 1 janv 1997;9(1):88-93.

22. Narod SA, Foulkes WD. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat Rev Cancer*. sept 2004;4(9):665-76.
23. Narod SA, Salmena L. BRCA1 and BRCA2 Mutations and Breast Cancer. *Discov Med*. 25 nov 2011;12(66):445-53.
24. Xu B, Kim St null, Kastan MB. Involvement of Brca1 in S-phase and G(2)-phase checkpoints after ionizing irradiation. *Mol Cell Biol*. mai 2001;21(10):3445-50.
25. Wallace DC. Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc Natl Acad Sci*. 13 sept 1994;91(19):8739-46.
26. Brown WM, George M, Wilson AC. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci*. 1 avr 1979;76(4):1967-71.
27. Parrella P, Xiao Y, Fliss M, Sanchez-Cespedes M, Mazzarelli P, Rinaldi M, et al. Detection of Mitochondrial DNA Mutations in Primary Breast Cancer and Fine-Needle Aspirates. *Cancer Res*. 15 oct 2001;61(20):7623-6.
28. Richter C, Gogvadze V, Laffranchi R, Schlapbach R, Schweizer M, Suter M, et al. Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. 24 mai 1995;1271(1):67-74.
29. Croteau DL, Bohr VA. Repair of Oxidative Damage to Nuclear and Mitochondrial DNA in Mammalian Cells *. *J Biol Chem*. 10 oct 1997;272(41):25409-12.
30. MT-CYB Gene - GeneCards | CYB Protein | CYB Antibody [Internet]. [cité 21 nov 2021]. Disponible sur: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MT-CYB>
31. Gazi N. Genetic Variations of Mitochondrial Cytochrome B and Breast Cancer. *Austin Biomark Diagn*. 11 déc 2014;01:1-5.
32. Burgart LJ, Zheng J, Shu Q, Strickler JG, Shibata D. Somatic mitochondrial mutation in gastric cancer. *Am J Pathol*. oct 1995;147(4):1105-11.
33. Yeh JJ, Lunetta KL, van Orsouw NJ, Moore FD, Mutter GL, Vijg J, et al. Somatic mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in papillary thyroid carcinomas and differential mtDNA sequence variants in cases with thyroid tumours. *Oncogene*. 13 avr 2000;19(16):2060-6.
34. Richard SM, Bailliet G, Páez GL, Bianchi MS, Peltomäki P, Bianchi NO. Nuclear and mitochondrial genome instability in human breast cancer. *Cancer Res*. 1 août 2000;60(15):4231-7.
35. Bianchi NO, Bianchi MS, Richard SM. Mitochondrial genome instability in human cancers. *Mutat Res Mutat Res*. 1 mars 2001;488(1):9-23.
36. Bromham L, Rambaut A, Harvey PH. Determinants of rate variation in mammalian DNA sequence evolution. *J Mol Evol*. déc 1996;43(6):610-21.
37. Mbaye F, Dem A, Fall M, Sembène M, Techniques FDSE, Cheikh U, et al. Research Article IMPLICATION OF THE CYTOCHROME B NUCLEOTIDE AND PROTEIN MUTATIONS IN THE OCCURRENCE OF BREAST CANCER IN SENEGAL.

38. Deneke SM, Fanburg BL. Regulation of cellular glutathione. Am J Physiol. oct 1989;257(4 Pt 1):L163-173.
39. Balendiran GK, Dabur R, Fraser D. The role of glutathione in cancer. Cell Biochem Funct. 2004;22(6):343-52.
40. Habchi ZB, Benbayer WN. REGULATION DE L'EXPRESSION DU GENE DE LA GLUTAMINE : FRUCTOSE-6-PHOSPHATE AMIDOTRANSFERASE PAR LE GLUCOSE ET LA GLUTAMINE DANS LA LIGNEE CELLULAIRE juillet 2014

Webographie

4. Cancer du sein [Internet]. Disponible sur : <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer> visité le 29/10/2021 à 23H : 00
5. Cancer du sein - un aperçu | Sujets de ScienceDirect [Internet]. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/breast-cancer> visité le 29/10/2021 à 01H : 05
6. الصحة فبو. Ministry Of Health Saudi Arabia [Internet]. Ministry Of Health Saudi Arabia. Disponible sur : <https://www.moh.gov.sa/en/Pages/Default.aspx> 05/11/2021 à 05/11/2021 à 15H 35

Résumé

La néoplasie mammaire représente l'un des cancers les plus communs au monde et le plus mortel chez la femme. Dans tous les pays du monde son incidence ne cesse d'augmenter. Au Sénégal, la Lisca déclare près de 1500 nouveaux cas chaque année. L'objectif de cette étude est de comprendre l'étiologie du cancer du sein à travers le gène mitochondrial cytochrome b chez les femmes au Sénégal. L'étude a porté sur 75 femmes dont les 37 sont des témoins et les 38 des femmes vivant avec le cancer du sein. L'analyse des paramètres de variabilité génétique et la détermination de la distance génétique ont été effectuées avec les logiciels DNAsp et MEGA7. La détermination du facteur de différenciation, l'analyse de la variance moléculaire et le test de l'évolution démographique ont été quant à eux effectués grâce au logiciel Arlequin. Nos résultats ont montré une forte variabilité du gène Cyt.B, une absence de différenciation entre les tissus sains et les tissus cancéreux, une structuration génétique en fonction du type de tissus et enfin une forte évolution démographique avec excès de variants rares. Deux acides aminés ont eu une différence de fréquences significatives entre les deux types de tissus : la lysine, la glutamine.

Mots clés : Cancer, Sein, variabilité, génétique

ABSTRACT

Breast neoplasia is one of the most common cancers in the world and the deadliest in women. In all countries of the world, the incidence of this pathology is steadily increasing. In Senegal, Lisca declares nearly 1,500 new cases each year. This study aims to understand the etiology of breast cancer through the mitochondrial cytochrome b gene in women in Senegal. The study involved 75 women of which 37 controls and 38 women living with breast cancer. The analysis of genetic variability parameters and the determination of genetic distance were performed with DNAsp and MEGA7 software. The determination of the differentiation factor, the analysis of molecular variance and the test of demographic evolution were carried out using Arlequin software. Our results showed a strong variability of the Cyt.B gene, no genetic differentiation between healthy tissues and cancerous tissues, a genetic structuring according to the type of tissues and finally a strong demographic evolution with excess of rare variants. Two amino acids had a significant difference in frequencies between the two types of tissue : glutamine, glycine.

Key words : Cancer, Breast, Variability, genetic