LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNmt : ADN mitochondrial

ARN : acide ribonucléique

BIOPASS : Biologie des Populations Animales Sahélo-Soudaniennes

Cyt. B : Cytochrome B

DNTPs : désoxyribonucléotide

DdNTPs : didésoxyribonucléotides

HMG : high mobility group

IRD : Institut de Recherche pour le Développement

ISRA : Institut Sénégalais de Recherche Agricole

Pb : paire de base

PCR : polymerase chain reaction

Rad/s : radian par seconde

SNP : single nucleotide polymorphism

TS : tissus sains

TC : tissus cancéreux

UCAD : Université Cheikh Anta Diop

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Variants du gène *cytochrome b* chez les tissus témoins. 23
Tableau II: Variants du gène *cytochrome b* chez les tissus cancéreux. 24
Tableau III: Indices de variabilité et de diversité génétique. 25
Tableau IV: Fréquences en acides aminés du gène *cytochrome b* 26
Tableau V: Test de sous sélection par codon 27
Tableau VI: Distance génétique de Nei 27
Tableau VII: Facteur de différenciation génétique de Wright (Fst) 27
Tableau VIII: Test AMOVA (test de la structuration génétique) 28
Tableau IX: Tests démo-génétiques. 28
Tableau X: Analyse de Mismatch distribution 29

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma d'un sein en coupe. 6
Figure 2 : Différentes étapes de la cancérogenèse 8

SOMMAIRE

DEDICACE ..... **I**
REMERCIEMENTS ..... **II**
LISTE DES TABLEAUX ..... **IV**
LISTE DES FIGURES ..... **IV**
INTRODUCTION GENERALE **1**
CHAPITRE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE **4**
I.1. Rappels : Le sein 5
I.2. Exemple du cancer du sein 7
I.3. Facteurs de risque 9
I.4. Mutations et Cancer 11
I.5. ADN Mitochondrial et Cancérogenèse 12
CHAPITRE II. MATERIELS ET METHODES **14**
II.1. Population d'étude 15
II.2. Etude génétique 15
II.3. Analyse génétique 18
CHAPITRE III. RESULATS ET DISCUSSION **22**
III.1. Résultats 23
III.2. Discussion 30
CONCLUSION **34**
REFERNCES BIBLIOGRAPHIQUES **36**
ANNEXES

INTRODUCTION GENERALE

On estime que le fardeau mondial du cancer à aujourd'hui atteint 18,1 millions de nouveaux cas en 2018 contre en 2012, 14,1 millions nouveaux cas de cancer et 12,7 millions en 2008 (OMS, 2012). Un homme sur cinq (1/5) et une femme sur six (1/6) dans le monde développeront un cancer au cours de leur vie, et un homme sur huit (1/8) et une femme sur onze (1/11) meurent de cette maladie (OMS, 2018).

Le cancer, en particulier le cancer du sein chez la femme, est l'une des principales causes de mortalité dans le monde entier, occasionnant un fardeau émotionnel financièrement important pour les individus, familles et sociétés.

La compréhension des facteurs pouvant affecter l'initiation et la progression du cancer comme les facteurs génétiques pouvant être associés à une prédisposition à développer un cancer, est primordiale.

Mais le cancer est perçu comme un problème de santé secondaire dans les pays émergents. Pourtant, l'incidence annuelle des cancers y est en pleine croissance actuellement en Afrique. Cela peut s'expliquer par l'incidence élevée des pathologies infectieuses à risque oncogène comme les hépatites, VIH, Helicobacter, accompagné d'un diagnostic tardif et une survie beaucoup moindre en Afrique (Ly et al, 2010).

Tous sexes confondus, le cancer du sein est le deuxième cancer le plus couramment diagnostiqué dans le monde en 2018 juste après le cancer du poumon. Avec 2,1 millions de nouveaux cas estimés chez la femme, il représente 24,2% des nouveaux cas de cancers. Il est ainsi le cancer le plus fréquent loin devant le cancer du côlon-rectum et du poumon chez la femme. Il représente également la première cause de décès par cancer chez la femme avec 626 679 décès estimés en 2018 à travers le monde (Bray *et al,* 2018). Son taux d'incidence est plus élevé dans les pays développés (Amérique du Nord, Europe, Australie) alors que la mortalité touche davantage les pays moins développés.

Avec une telle incidence, le cancer du sein demeure un véritable problème de santé publique dans le monde et surtout dans les pays en développement (Oms, 2018).

Le sein est soumis à d'importantes modifications tout le long de la vie de la femme et tout particulièrement au moment de la gestation, de la lactation et de l'involution.

Ces étapes physiologiques s'accompagnent de trois mécanismes cellulaires très important qui sont la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire. La dérégulation de ces mécanismes est à l'origine des cellules cancéreuses (Payre b. 2008).

La résistance à la mort cellulaire est une des caractéristiques que la cellule tumorale acquiert au cours de la cancérogenèse. La cellule devient incapable de s'autodétruire en présence des

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

signaux habituels. On peut supposer qu'une anomalie génétique quelconque les empêche de se tuer (Feng *et al,* 2018).

C'est dans ce sens que s'inscrit cette étude qui nous a permis de mieux comprendre l'histoire des cellules tumorales, la distribution de la variabilité génétique et à terme de déterminer l'implication des gènes dans la cancérogenèse, mais plus précisément entre les mutations génétiques et le *cytochrome b*.

L'objectif général de cette étude est de connaitre la caractérisation génétique des mutations du *cytochrome b* dans l'occurrence du cancer du sein au Sénégal. De cet objectif général découle comme objectifs spécifiques:

- Évaluer la variabilité et la diversité génétique du *cytochrome b* afin de déterminer la pénétrance de ce gène codant pour le cas du cancer du sein;
- Rechercher les éventuelles mutations ponctuelles du *cytochrome b* associées au cancer du sein dans le but d'identifier les probables variants statistiquement impliqués.

Cette étude comporte trois chapitres. Le premier chapitre, consiste à passer en revue les différentes caractéristiques du cancer du sein. Dans le second chapitre, nous exposerons le matériel et l'approche méthodologique utilisés pour atteindre les objectifs de cette étude. Les résultats obtenus seront présentés dans le troisième chapitre suivi d'une discussion avant de terminer l'étude par une conclusion générale.

CHAPITRE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Rappels : Le sein

I.1.1. Histoire naturelle des cancers

Les maladies cancéreuses existaient déjà il y a 4 000 à 5 000 ans, comme en témoignent les travaux réalisés sur les momies de l'Egypte pharaonique par Granville en 1825.

Hippocrate décrit les tumeurs de la peau, les tumeurs du rectum, celles du sein et celles de l'utérus. La cancérologie moderne naît entre 1750 et 1850. Les découvertes scientifiques qui la fondent, relèvent principalement de l'anatomie pathologique.

Schleiden et Schwann, les précurseurs, démontrent la nature cellulaire de tous les organismes en 1838. Muller est le premier à pouvoir affirmer que les cancers sont des masses cellulaires. Cependant, c'est avec la découverte de l'ADN que la cancérologie connaîtra un grand tournant. On distinguera d'une part l'origine du cancer qui peut être due à un dérèglement au niveau du génome et d'autre part des facteurs internes ou externes qui peuvent être responsables de ces dérèglements et de l'apparition des tumeurs (Coig, Aurélie, 2020).

Le corps humain est constitué de plusieurs milliards de cellules contenant chacune un noyau qui contient l'ADN. Chaque cellule entre en mitose et donc se divise pour donner un clone cellulaire contenant la même information génétique que la cellule-mère. Cependant, il arrive des fois qu'il y ait des perturbations du génome au niveau de la cellule mère, qui lors de la mitose aboutit à une cellule avec un ADN endommagé. Ainsi, ces nouvelles cellules filles seront soit réparées, soit détruites en entrant en apoptose. En résumé, une cellule saine effectue trois processus au cours de sa vie : elle se divise, se différencie et à la fin meurt. Il existe donc un équilibre entre la formation des nouvelles cellules et la destruction des anciennes.

On parlera de cancer lorsque cet équilibre sera rompu par des cellules qui échapperont au mécanisme de régulation du corps humain. En effet, lors de la division cellulaire, certaines cellules filles obtenues peuvent échapper à l'apoptose et au fur et à mesure de l'accumulation des mutations, elles peuvent devenir immortelles. Le cancer consiste donc en une « perte de contrôle de la régulation des cellules qui aboutit à leur prolifération anarchique ». Cette prolifération anarchique des cellules est causée d'une part par la diminution de l'apoptose et d'autre part, par une activation des oncogènes ainsi qu'une inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs (Sever and Brugge, 2015).

I.1.2. Anatomie du sein

Au nombre de deux, les seins occupent la partie antéro-supérieure du thorax en avant du muscle grand pectoral. Ils s'étendent de la 3ème à la 7ème côte. Et transversalement du bord externe du sternum à la ligne axillaire antérieure. Ces limites sont cependant variables d'un sujet à l'autre (Keita, 2018).

Le revêtement cutané du sein n'est pas homogène au niveau externe, on lui décrit trois zone :

- zone périphérique : elle est lisse, souple et douce au toucher.
- zone moyenne : c'est l'aréole, elle est pigmentée, circulaire de 35 à 50 mm de diamètre. Son aspect est rendu granuleux par la présence de glandes sébacées : tubercules de MORGAGNI. Ces glandes deviennent plus volumineuses au cours de la grossesse et prennent le nom de tubercules de MONTGOMERY.
- zone centrale : c'est le mamelon, il occupe le centre de l'aréole, sa pigmentation est identique à celle de l'aréole.

Au niveau interne, il est formé de la glande exocrine qui est la glande mammaire, d'un tissu adipeux et conjonctif (Keita, 2018).

La glande mammaire est organisée en une vingtaine de lobes. Chaque lobe est composé de 20 à 40 lobules possédant chacun leur canal excréteur ou canal galactophore, dans lequel se jettent les canaux secondaires des acini et des lobules. Les canaux galactophores convergent vers le mamelon, ils s'élargissent pour former les sinus lactifères, puis se rétrécissent et débouchent au niveau des pores du mamelon (Stingl, 2011).

C'est un organe très important chez la femme en raison de sa fonction biologique, qui est la production du lait permettant de nourrir le nouveau-né, mais aussi de sa fonction sexuelle responsable de sa féminité. L'esthétique de cet organe est donc tout aussi importante que sa fonction biologique (Russo et al, 2011).

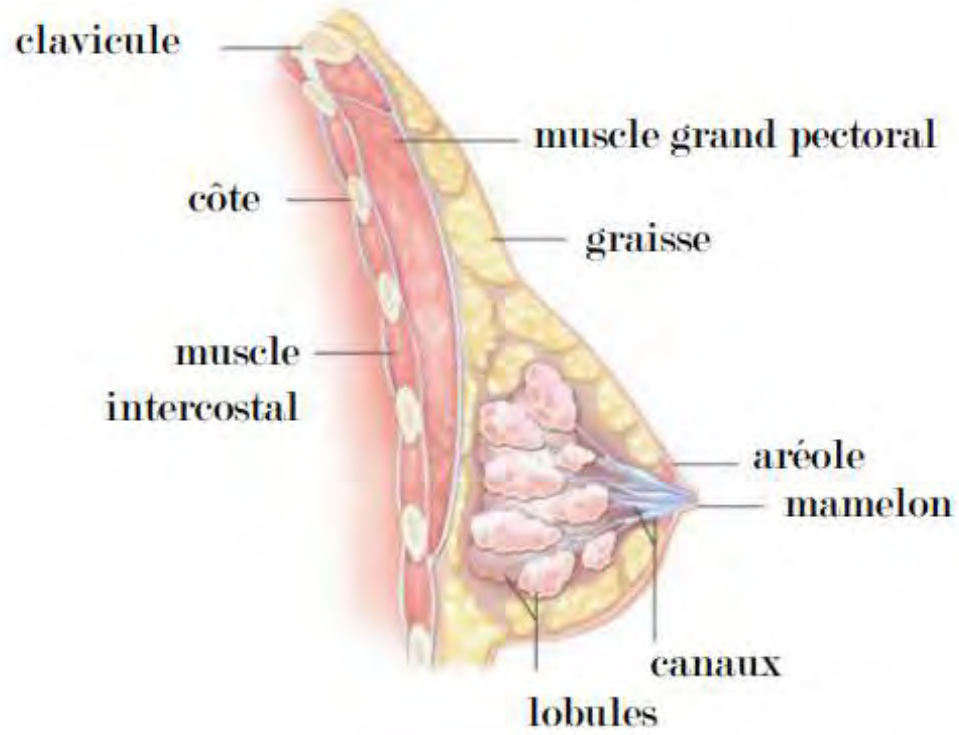

Figure 1 : Schéma d'un sein en coupe (Blein, 2014).

I.1.3. Physiologie du sein

Le sein est une glande hormonodependante et les changements physiologiques qui s'y produisent, sont sous le contrôle du complexe neuroendocrinien qui gouverne le système reproducteur.

Les hormones majeures de la physiologie mammaire se composent: des œstrogènes, de la progestérone, de la prolactine et de l'ocytocine (Key et al, 2001).

Donc le tissu mammaire renferme des récepteurs hormonaux dont ceux des œstrogènes (ER) et de la progestérone (PR) concentrés en particulier dans la zone glandulaire et dont le nombre varie avec l'âge (Villeneuve, 2011) et (Heu, 2018).

Cependant d'autres hormones semblent aussi agir sur la glande mammaire, tout au moins in vitro. Ce sont l'insuline, l'aldostérone, l'hormone de croissance, les androgènes, les glucocorticoïdes, les hormones thyroïdiennes stimulant la croissance galactophorique. L'aldostérone et l'insuline auraient un rôle facilitant la différenciation lobulaire (Daniel Doupa, 2016).

I.2. Exemple du cancer du sein

I.2.1. Définition

Le cancer est associé à une croissance anormale des cellules, qui présentent une dérégulation des processus de prolifération et de mort cellulaire. Ces cellules peuvent acquérir de nouvelles capacités, telle la propriété d'envahir les tissus adjacents et de former des métastases à d'autres tissus ou organes, pouvant ainsi entraîner la morbidité ou la mort de l'hôte (Stratton et al, 2008 ; Williams et al, 2007 ; Durocher et al, 2005).

Les changements observés au niveau de ces cellules sont le résultat d'une expression anormale de gènes. Ces altérations génétiques ont deux conséquences bien différentes. Elles peuvent conduire à l'augmentation de l'activité de certains gènes favorisant au sens large la croissance tumorale ; ces gènes sont appelés oncogènes. A l'inverse, elles peuvent inactiver d'autres gènes dont l'activité physiologique s'oppose à la transformation tumorale, d'où leur nom de gènes suppresseurs de tumeurs (Segal et al, 2008).

Au niveau de la cellule tumorale, les oncogènes ont une action dominante : l'activation d'un seul allèle est généralement suffisante à sa contribution au phénotype tumoral ; à l'inverse, les gènes suppresseurs de tumeurs sont récessifs : l'inactivation des deux allèles est nécessaire (Stoppa-Lyonnet et al, 2010).

En outre, la majorité de ces mutations et remaniements de l'ADN acquis et transmis lors de la division cellulaire, sont appelées des mutations somatiques contrairement à celles présentes

dès la conception, appelées mutations germinales. Ces dernières expliquent les prédispositions génétiques aux cancers (Stoppa-Lyonnet et al, 2010).

On peut distinguer, principalement trois étapes dans la genèse d'un cancer. On a une première phase appelé l'initiation qui ne concerne qu'une seule cellule. Elle rend la cellule immortelle. Elle correspond à une lésion rapide et réversible de l'ADN après une exposition due qu'à un seul facteur (chimique, physique, ou génétique) et que ce phénomène ne survient qu'une seule fois. La deuxième phase correspond à une exposition prolongée, répétée ou continue, à une substance qui entretient et stabilise la lésion initiée. Ces étapes peuvent être réversibles, et sont modulées par des nombreux facteurs immunitaires, hormonaux. La dernière phase correspond à l'acquisition des propriétés de multiplication non contrôlée, l'acquisition de l'indépendance, la perte de la différenciation, l'invasion locale et métastatique des cellules filles issues de la cellule mère transformée (Russo et al, 2000).

Figure 2 : Les différentes étapes de la cancérogenèse

(Dr Yacine Seye Cours Oncologie Master II : Histoire Naturelle Des Cancers).

I.2.2. Typologie des cancers du sein

Il faut noter qu'il n'y a pas un cancer du sein mais des cancers du sein : en fonction du stade d'évolution, du lieu et des cellules à partir desquelles il s'est propagé, sa prise en charge est différente (Mbaye et al, 2012).

Il existe différents types de cancers :

- Le carcinome canalaire est le plus fréquent et se forme à l'intérieur des canaux de lactation. Diagnostiqué assez tôt, grâce à la mammographie, il reste non invasif et on en guérit dans presque tous les cas avec un traitement adapté. En revanche, sans traitement, il peut poursuivre sa croissance et devenir invasif en se propageant à l'intérieur des canaux de lactation.
- Le carcinome lobulaire se forme dans les lobules. Les cellules cancéreuses traversent les parois et se développent dans les tissus environnants.

- D'autres cancers plus rares sont de caractéristiques plus visibles comme le carcinome inflammatoire. Le sein devient rouge, enflé, chaud et peut aussi avoir un aspect peau d'orange. Les cellules cancéreuses se forment d'abord dans les canaux mammaires puis migrent rapidement vers les vaisseaux lymphatiques de la peau.
- La maladie de Paget du sein, caractérisée par une petite plaie au mamelon qui ne guérit pas, se forme au niveau de la partie superficielle de la glande mammaire. Il est fréquemment associé à un autre cancer du sein.

I.2.3. Classification des tumeurs malignes

Lorsqu'un cancer du sein est suspecté lors d'une palpation ou d'une mammographie, le diagnostic est posé sur la base d'une biopsie et d'un examen anatomopathologique ainsi que par le bilan d'extension qui recherche d'éventuels foyers métastatiques.

La classification du cancer en stades 0 a IV, qui décrivent l'expansion des cellules cancéreuses dans l'organisme, dépend de la classification TNM de l'American Joint Committe on Cancer décrite par Pierre Denoix (1912-1990). La classification TNM des cancers du sein prend en compte 3 critères : la taille de la tumeur (T0 à T4), l'envahissement ganglionnaire (N0 à N3) et la présence ou non de métastases à distance (M0 : pas de métastases ou M1 : présence de métastases) (Feng *et al,* 2018).

La classification du cancer en grades I à III dépend quant à elle de l'examen anatomopathologique qui classe les cancers selon l'architecture des cellules, la forme des noyaux et l'activité mitotique. On parle également de grade histopronostique de Scarff Bloom et Richardson (grade SBR) ou d'Elston et Ellis qui permet d'apprécier le degré d'agressivité des tumeurs reposant sur trois paramètres morphologiques : l'architecture des cellules cancéreuses, la forme du noyau et le nombre de cellules en division (Amat et al, 2002). A partir de ces paramètres les tumeurs mammaires sont classées selon trois grades : le grade I correspondant aux tumeurs les moins agressives, le grade III correspondant aux tumeurs les plus agressives, le grade II étant un grade intermédiaire. A l'issue de ces examens, la réunion de concertation pluridisciplinaire permet de choisir le traitement le mieux adapté à la patiente.

I.3. Facteurs de risque

L'épidémiologie du cancer de sein est parallèle aux changements hormonaux survenant au cours de la vie. En effet, le cancer du sein constitue une préoccupation majeure de santé publique en raison de l'augmentation de son incidence (Nkondjock et al, 2005).

Les causes exactes du cancer du sein ne sont pas encore toutes connues. Cependant, nous savons qu'il existe de nombreux facteurs de risque qui augmentent la probabilité de contracter un cancer du sein. Ces facteurs peuvent être classés en trois catégories: génétiques, hormonaux et environnementaux (Dallagi, 2010).

- ***Les facteurs génétiques***: sont responsables de 5 à 10% des cancers du sein. Il s'agit en fait de la transmission héréditaire d'une anomalie génétique impliquée dans les processus de cancérisation, comme par exemple une forme altérée de gènes tels que BRCA1, BRCA2 ou P53. Un tel risque concerne les femmes ayant un parent proche (mère, sœur ou fille) atteint d'une de ces anomalies (Wooster et Weber., 2003; Keen et Davidson., 2003).
- ***Les facteurs hormonaux***: Les hormones endogènes sont très impliquées dans le développement de la glande mammaire et de ce fait jouent un rôle important en tant que facteurs de risque du cancer du sein. L'apparition précoce des règles (avant 12 ans), une ménopause tardive (après 55 ans) et l'absence de grossesse menée à terme avant 30 ans sont autant de facteurs favorisant l'apparition d'une tumeur mammaire. En revanche, une grossesse menée à terme avant 20 ans ainsi que l'allaitement diminue considérablement les risques. Le risque élevé est en relation avec une surexposition aux œstrogènes endogènes (Clavel-Chapelon., 2002).
- ***Les facteurs environnementaux***: Les variations d'incidence existantes d'un pays à l'autre amènent à parler de risques environnementaux. Les hypothèses concernant le rôle d'une alimentation trop riche en graisses animales comme facteur de risque n'ont pas encore été démontrées à ce jour. En revanche, d'autres facteurs environnementaux sont reconnus comme impliqués dans l'apparition de cancers du sein. Notamment, on retrouve l'exposition à de fortes radiations (cas des femmes de Nagasaki et Hiroshima). Signalons encore d'autres facteurs de risque possibles, l'obésité qui fait augmenter le taux d'œstrogènes et un traitement substitutif hormonal de la ménopause (Million Women Study Collaborators *et al*, 2003).

I.4. Mutations et Cancer

Une mutation se définit comme une modification d'une ou plusieurs bases d'une séquence d'ADN, (Bartsch et al, 2007) et qui apparaît au cours de la vie d'un individu et de façon rare (moins d'1% des individus). L'apparition d'une mutation est le résultat d'un processus du à :

- une modification qui apparaît à la suite d'une erreur lors de la réplication de l'ADN, ou à l'exposition à un agent mutagène, modifier une base ou induire des liaisons anormales entre différents nucléotides;
- les systèmes de réparation de l'ADN qui ne fonctionnent pas correctement et qui ne réparent pas les erreurs ou les lésions présentes sur l'ADN;
- au cours de la division cellulaire, l'ADN est répliqué et les lésions sont incorrectement remplacées, la modification devient irréversible.

Les mutations peuvent être classées selon leur type et/ou leur effet. Il existe deux grands types de mutation (substitution et insertion/délétion).

Parmi les substitutions de bases (changement d'une base en une autre), on distingue :

- les mutations faux-sens : le changement de base a lieu dans une séquence codante et entraîne un changement d'acide aminé dans la protéine correspondante. (Wren, 2007). Ce changement peut avoir un effet plus ou moins important sur la fonction de la protéine.
- les mutations non-sens : la substitution a lieu dans une séquence codante et entraîne l'apparition d'un codon stop anormal. La protéine correspondante est alors tronquée et généralement dégradée.
- les mutations silencieuses : la substitution n'entraîne aucun changement au niveau protéique, dû à la redondance du code génétique.
- des substitutions peuvent également avoir lieu hors d'une séquence codante. Si elles interviennent au niveau d'un promoteur, elles peuvent changer l'expression de protéines. Si elles interviennent au niveau d'un site d'épissage, les protéines synthétisées peuvent être modifiées (plus longues ou tronquées en fonction de la séquence des introns impliqués). Ces mutations peuvent également n'avoir aucun effet.

Il existe des modifications par insertions ou délétions. Ces modifications peuvent avoir des conséquences identiques aux substitutions en fonction du site où elles interviennent. Dans une séquence codante, si les nucléotides délétères ou insérés ne sont pas un multiple de 3, le cadre de lecture est décalé, ce qui induit généralement la production de protéines tronquées ou aberrantes.

Dans les cancers, les propriétés acquises par les cellules sont souvent des mutations, mais il existe également des remaniements chromosomiques ou des modifications épigénétiques (qui ne changent pas directement la séquence de l'ADN mais l'expression des protéines) comme les méthylations de l'ADN et les acétylations de la chromatine (Le Roux-Goglin, 2007).

I.5. ADN Mitochondrial et Cancérogenèse

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).

La mitochondrie a également pour fonction de participer à la synthèse des hormones stéroïdes générées à partir du cholestérol, par l'intermédiaire du cytochrome P450.

Enfin, la mitochondrie est impliquée dans le processus de la mort cellulaire programmée, l'apoptose (Rasola et al, 2011 ; Webster, 2012).

La mitochondrie possède son propre génome, qu'on désigne de manière générale par le chromosome M ou MT. L'ADN mitochondrial - ou ADNmt - se présente sous la forme d'un fragment d'ADN circulaire et haploïde. Le génome mitochondrial sous sa forme la plus fréquente mesure 16 569 bases (environ 17kb). Il porte 37 gènes, qui ne comportent pas d'introns.

La mitochondrie n'utilise pas les mécanismes de synthèse protéique de sa cellule-hôte, mais possède son propre système de synthèse protéique. De plus, la mitochondrie utilise également ses propres ARNs de transfert (ARNt) pour la synthèse des acides aminés qu'elle utilise. On trouve donc 22 gènes codant pour ces ARNt. Enfin, la mitochondrie n'utilise pas le même code génétique que celui utilisé par le reste de l'organisme humain. Elle possède des gènes codants pour des protéines membranaires mitochondriales ayant un rôle structurel dans les complexes de la phosphorylation oxydative (Blein, 2014).

Il existe des pathologies qui trouvent leur origine dans des dysfonctionnements au niveau du génome mitochondrial. Mais qu'en est-il du rôle de la mitochondrie dans le cancer ? Les efforts soutenus de la recherche contre le cancer ont abouti à la définition de propriétés caractéristiques du développement tumoral (Hanahan et al, 2011). Ces capacités biologiques acquises au cours de ce processus sont :

- l'activation de cascades de signalisation favorisant la prolifération cellulaire ;
- une déficience en facteurs d'inhibition de la croissance cellulaire ;
- la résistance à la mort cellulaire programmée (apoptose) ;
- l'activation de la réplication anarchique des cellules ;

- l'activation de l'angiogenèse (développement et croissance de nouveaux vaisseaux sanguins) ;
- l'acquisition des mécanismes d'invasion (colonisation de tissus différents au sein d'un même organe) et du potentiel métastatique (migration vers d'autres organes par le système
  sanguin ou lymphatique) ;
- la dérégulation énergétique, en favorisant la glycolyse en situation aérobie ;
- l'insensibilité au contrôle exercé par le système immunitaire.

La mitochondrie est impliquée de manière directe dans au moins deux des mécanismes altérés lors du développement tumoral : l'induction de l'apoptose et la production énergétique de la cellule. Cependant, le rôle exact exercé par la mitochondrie dans le développement tumoral est aujourd'hui controversé.

En particulier la question se pose de déterminer si la mitochondrie est impliquée dans l'apparition des premières néoplasies conduisant au cancer ou si les altérations de son génome et l'inactivation de certaines de ses fonctions ne sont qu'une conséquence de l'instabilité génomique tumorale (Grzybowska-SzatkowSka et al, 2012).

CHAPITRE II. MATERIELS ET METHODES

II.1. Population d'étude

Le matériel biologique utilisé pour cette étude est obtenu par chirurgie chez les patientes atteintes de cancer du sein. Les prélèvements (TS et TC pour chaque patiente) ont été effectués par les médecins de l'institut de cancérologie de l'hôpital Aristide Le Dantec. Ils ont été acheminés au Laboratoire Commun UCAD-IRD-ISRA de Biologie moléculaire du Centre de Biologie et de Gestion pour les Populations (CBGP) de l'IRD de Bel-Air où ont été effectuées les différentes étapes de l'analyse. Les prélèvements ont été conservés dans l'alcool 96% pour assurer l'intégrité de la molécule d'ADN. Les tissus cancéreux sont codés TC et les tissus sains (témoins) sont codés TS.

II.2. Etude génétique

II.2.1. Extraction d'ADN des tissus

L'extraction d'ADN des tissus mammaires (30 TS et 30 TC) a été réalisée grâce à la méthode Standard Qiagen (Kit Qiagen Dneasy Tissue).

On prélève 25mg des tissus témoins qu'on découpe puis les mettre dans un tube eppendorf et pour tissus cancéreux il faut prélever le noyau du tissu. Les 25mg sont obtenus à l'aide d'une balance. Toutes les coupes doivent avoir la même masse. Le travail se fait sur des individus codés préalablement.

- **Protocole d'extraction d'ADN avec le kit Qiagen Dneasy Tissue**

  - ***La digestion tissulaire***

La digestion se fait par ajout de 180µl de tampon ATL et 20µl de protéinase k dans chaque tube eppendorf. Après avoir ajouté les produits, on vortex les tubes et on les incube dans un bain marie à 55°C pendant toute la nuit.

  - ***La lyse cellulaire***

A la fin de la digestion, on entame la lyse cellulaire pour cela les tubes sont sortis du bain marie et seront vortexé pendant 15s puis on ajoute 200µl de tampon AL et on vortexe à nouveau ensuite on réincube dans le bain marie pendant 10min à 70°C.

A la fin des 10min on sort les tubes et on ajoute 200µl d'éthanol 96-100% et vortexez.

  - ***La purification de l'ADN***

Le mélange final de la lyse cellulaire est pipeté et mis dans une colonne préalablement placée dans un tube collecteur de 2ml puis on centrifuge à 13000rpm pendant 1min ensuite les tubes collecteurs sont jetés.

On place à nouveau la colonne dans un nouveau tube collecteur de 2ml et on ajoute 500µl de tampon de lavage AW1 et on centrifuge encore à 13000rpm pendant 1min.
A la fin de la minute on récupère les colonnes puis les placées dans de nouveaux tubes collecteurs. On ajoute 500µl de tampon AW2, puis on centrifuge à 13000rpm pendant 3min pour sécher la membrane de silice. Jetez les tubes collecteurs.
Les colonnes sont placées à la fin de la centrifugation sur des tubes eppendorf de 1.5ml et on ajoute 50µl de tampon AE directement sur la membrane pour récupérer l'ADN après incubation à température ambiante pendant 5min et centrifugation à 13000rpm pendant 1min.
Le tampon AE est incubé à 70°C pour augmenter le rendement d'extraction de 15 à 20%.
L'ADN est conservé à -20°C.
La qualité des extraits d'ADN a été appréciée après avoir effectué une migration électrophorétique sur gel d'agarose. Pour ce faire, 5 µl d'extrait d'ADN ont été mélangés avec 2 µl de bleu de bromophénol (bleu de charge) et le mélange a été déposé sur un gel d'agarose 1,5% et migré à 100 Voltes pendant 30 minutes.
La visualisation s'effectue grâce à une machine appelée Gel doc à bloc UV mais avant de mettre le gel dans la machine on le plonge d'abord dans du bromure d'Ethidium (BET) pendant 20 min. Le BET est un agent intercalent entre les bases complémentaires pour rendre l'ADN fluorescent en contact des UV.

II.2.2. Choix du gène *cytochrome b* et Polymérase Chain Reaction (PCR)

II.2.2.1. Choix du gène cytochrome b

Le génome mitochondrial est haploïde, ne subit pas de recombinaison et est transmis uniquement par la lignée maternelle. Ces caractéristiques en font un modèle d'étude de l'évolution des génomes des plus intéressants.
Il a été établi que le taux de mutation intrinsèque du génome mitochondrial est beaucoup plus élevé que celui du génome nucléaire (Larsen, 2005) avec une valeur de 10 à 200 fois supérieure, selon les estimations. Plusieurs facteurs expliquent ce taux de mutation élevé : l'absence de protection de l'ADN par des histones comme c'est le cas pour le génome nucléaire, un mécanisme de correction des erreurs d'incorporation de nucléotides par les polymérases dont l'efficacité est moindre que le mécanisme s'exerçant dans le génome nucléaire, et enfin l'exposition directe de l'ADN mitochondrial à des composés occasionnant des dommages à l'ADN (Song et al, 2005).
La forte variabilité du génome mitochondrial, sa structure haploïde, et le fait qu'il ne soit transmis que par la lignée maternelle sans recombinaison font de l'ADN mitochondrial une

molécule précieuse pour comprendre les relations évolutives entre les individus, les populations et les espèces (Van Oven et al, 2009).

Le génome mitochondrial est utilisé dans de nombreux champs disciplinaires. En médecine génétique, le génome mitochondrial est analysé dans le cadre du diagnostic ou de la recherche de variants de prédisposition de certaines pathologies. En sciences, il est utilisé pour identifier ou établir des liens de parenté entre plusieurs individus.

Mais le génome mitochondrial est également très utilisé à la fois comme support pour étudier les flux de migrations humaines, et comme concept d'étude de l'évolution des génomes.

II.2.2.2. Amplification du gène *cytochrome b*

La PCR est une méthode permettant l'amplification d'une courte séquence d'ADN appelée séquence cible, à partir d'une infime quantité d'ADN génomique. Elle consiste à une amplification sélective in vitro d'une séquence particulière d'ADN matrice par extension de deux amorces par une ADN polymérase, en présence de désoxyribonucléotide (dNTP) et d'ions Mg 2+. Nous avons amplifié le gène *cytochrome b* qui présente beaucoup d'intérêts. Le gène *cytochrome b* est une région de plus d'un millier de paires de bases du génome mitochondrial, situé en positions 14201 et 15341 dans la séquence humaine (Anderson, 1981), possède un taux de recombinaison faible (lié à son hérédité exclusivement maternelle) et présente une variabilité relativement élevée malgré qu'il s'agisse d'une séquence codante, ce qui justifie le choix de ce marqueur.

L'amplification est réalisée dans un volume réactionnel de 50 µl 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 chaque amorce qui sont : 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 4 µl d'extrait d'ADN. L'amplification est effectuée par une répétition de cycles qui assure une multiplication par deux, de l'ADN cible à chaque cycle. La PCR a lieu dans les conditions suivantes : dénaturation préliminaire à 94°C (3 minutes), suivie d'une répétition de 40 cycles de dénaturation initiale à 92°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 (10 minutes).

La PCR est assurée par un thermocycleur de type eppendorf qui répète les différentes étapes de la réplication cellulaire.

II.2.3. Séquençage

Cette technique consiste à déterminer la séquence en nucléotides d'un fragment d'ADN. Elle permet en comparant les séquences d'un même gène chez différents individus de la même espèce ou d'espèces différentes, de mettre en évidence des mutations ponctuelles, mais également des insertions ou des délétions. La méthode utilisée aujourd'hui, proposée par F. Sanger en 1977, repose sur l'utilisation de nucléotides particuliers appelés didésoxyribonucléotides, qui bloquent la synthèse d'ADN par les ADN polymérases après leur incorporation.

En d'autres termes, c'est une réaction de PCR particulière utilisant, en plus des composés habituels (ADN matrice, polymérase, amorces, dNTP, Mg2+), des nucléotides modifiés : les didésoxyribonucléotides (ddNTP). Ces ddNTPs ont la particularité d'être couplés à des fluorochromes : ddATP-vert, ddTTP-rouge, ddCTP-bleu et ddGTP-jaune. Ce blocage est dû à l'impossibilité qu'ont ces nucléotides de former une liaison phosphodiester avec un autre nucléotide en raison de l'absence du groupement hydroxyle sur le carbone 3'. Le séquençage a été réalisé dans la ville de Séoul en Corée du Sud par une société Américaine nommée Macrogen à partir de 30 µl du produit PCR et dans un seul sens.

II.3. Analyse génétique

II.3.1. Recherche de mutations

Pour la recherche des mutations, les séquences ont été soumis au logiciel Alamut-Visual version 2.12.0 (©Interactive Biosoftware). Pour notre étude, ce logiciel nous fournit la localisation des variants, leur changement protéique prédit, leur numéro d'accession s'ils ont déjà été répertoriés dans la base de données des variants dbSNP (Sherry *et al*. 2001), ainsi que la prédiction de la pathogénicité des variants grâce aux logiciels de prédiction SIFT (Sim *et al*., 2012), Polyphen2 (Adzhubei *et al*., 2013) et MutationTaster (Schwarz *et al*., 2014). Toute variation non répertoriée sur cette base de données est considérée comme nouvelle. Le logiciel Polyphen2 utilise un classificateur Bayes pour éventuellement prédire le potentiel pathologique d'une altération.

Il s'agit d'un classificateur probabiliste qui calcule la signification fonctionnelle d'un changement d'allèle par Naive Bayes, un ensemble d'algorithmes d'apprentissage supervisé pour identifier les mutations délétères.

Les options d'entrée pour cette méthode constituent le numéro d'acquisition de la base de données ou la séquence protéique ainsi que les détails des variantes. Toute mutation avec un

score ≥ 0,9 (nombre indépendant de positions spécifiques) est classée comme «mutation potentiellement dommageable».

Une fois que le classificateur Bayes est exécuté et la probabilité de prédiction faite automatiquement est affichée. La valeur de probabilité représente le score de prédiction, c'est-à-dire qu'une valeur proche de 1 indique une ″sécurité″ élevée de la prédiction.

Le logiciel SIFT (*Sorting Intolerant From Tolerant*) utilise une homologie de séquence pour prédire si une substitution d'acide aminé affectera la fonction de la protéine et par conséquent modifiera potentiellement le phénotype. SIFT considère la position à laquelle le changement s'est produit et le type de changement d'acide aminé. Étant donné une séquence protéique, SIFT choisit des protéines apparentées et obtient un alignement de ces protéines avec la requête. Sur la base des acides aminés apparaissant à chaque position dans l'alignement, SIFT calcule la probabilité qu'un acide aminé à une position soit toléré, à condition que l'acide aminé le plus fréquent soit toléré. Si cette valeur normalisée est inférieure à une valeur limite, la substitution devrait être délétère (Ng et Henikoff, 2003). Toutes les mutations avec un score de probabilité inférieur à 0,05 sont considérés comme délétères ; celles avec un score supérieur ou égal à 0,05 sont considérées comme tolérées.

II.3.2. Analyses moléculaires

II.3.2.1. Alignement des séquences

Les séquences des tissus sains (TS) et de tissus cancéreux (TC) obtenues sont nettoyées et corrigées à l'aide du logiciel BioEdit version 7.1.9 (Hall, 1999). Les séquences sont alignées en utilisant l'algorithme ClustalW (Thompson *et al*, 1994) permettant de mettre en évidence les similitudes, laissant ainsi paraitre la position des insertions, des délétions ou encore des substitutions.

II.3.2.2. Variabilité génétique

La variabilité et la diversité génétique des gènes choisis ont été étudiées. Pour cela nous avons sorti le nombre de sites (N), le nombre de sites invariables et variables (informatifs), le nombre d'haplotype (h), le nombre moyen de différence nucléotidique (k), le nombre de mutation (Eta), la nature des mutations et le taux de mutation (R). Ces paramètres sont considérés comme étant la carte d'identité des gènes choisis et permettent de détecter les événements de sélection. L'ensemble de ces paramètres sont obtenus grâce au logiciel DnaSP version 5.10.01 (Rozas *et al.*, 2010) exceptés la nature des mutations et le taux de mutation qui ont été déterminés grâce au logiciel MEGA version 7.0.14 (Kumar *et al*., 2015). Pour voir

le degré de variabilité des gènes, les paramètres de diversité haplotypique et de diversité nucléotidique ont été déterminés grâce au logiciel DnaSP version 5.10.1.

Les séquences nucléotidiques du *cytochrome b* sont transformées en séquences d'acides aminés grâce au logiciel MEGA version 7.0.14 (Tamura *et al*, 2013), en utilisant le meilleur cadre de lecture (cadre avec lequel on obtient moins de codons stops). Les fréquences des acides aminés ont été ressorties pour les TS et les TC. A l'aide du logiciel R version 1.0.153, le test de normalité de Shapiro a été effectué pour voir si les données suivent une distribution normale. Dans le cas d'une distribution normale, le test t de Student est effectué pour la comparaison de moyennes ; dans le cas contraire le test de Wilcox est utilisé. Dans notre cas d'étude, les données ne suivent pas une distribution normale donc le test de Wilcox a été effectué. Un seuil de significativité fixé à 5% a été retenu.

Le test de sélection par codon a été déterminé uniquement pour les tissus tumoraux puisque le *cytochrome b* est codant. Pour chaque codon, des estimations du nombre de substitutions synonymes (dS) et non synonymes (dN) ont été faites. La statistique du test dN - dS est utilisée pour détecter les codons ayant fait l'objet d'une sélection positive. Une valeur positive pour la statistique du test indique une surabondance de substitutions non synonymes. Dans ce cas, la probabilité de rejeter l'hypothèse nulle d'évolution neutre (valeur P) est calculée. Les valeurs de P inférieures à 0,05 sont considérées comme significatives.

II.3.2.3. Différenciation et structuration génétique

Pour la différenciation et la structuration génétique, nous nous intéressons à trois paramètres: la distance génétique de Nei (D) intra et inter-populations, obtenue avec le logiciel MEGA version7.0.14, le facteur de différenciation génétique de Wright (Fst) et de la structuration génétique par analyse de la variance moléculaire (AMOVA) obtenus avec le programme Arlequin version 3.5.1.3 (Excoffier *et al*. 2010).

La distance génétique de Nei : basée sur l'indice de similitude est le nombre moyen de substitutions par site survenu depuis la divergence entre deux espèces données. La distance génétique est déterminée à l'intérieur de chaque population (distances génétiques intra-population) et entre populations prises deux à deux (distances génétiques inter-populations).

Fst : Wright l'a défini comme étant l'hétérogénéité des fréquences haplotypique entre subdivisions d'une population. La Pvalue permet d'accepter la valeur du Fst lorsqu'elle est significative ($P<0,05$) ou de la rejeter lorsqu'elle est non significative ($P>0,05$). L'utilisation du Fst dans la diversité génétique relève du fait qu'il mesure la différenciation génétique entre sous-populations, d'où son appellation indice de différenciation génétique.

AMOVA : permet de quantifier la variabilité suivant un facteur. L'analyse de la variance moléculaire estime les indices de structuration génétique en utilisant l'information du contenu alléliques des haplotypes.

II.3.2.4. Tests démo-génétiques

Nous avons fait des tests démo-génétiques qui comparent le niveau d'ajustement de la diversité génétique de gène *cytochrome b* et des valeurs théoriques attendues sous l'hypothèse de l'évolution sous un modèle neutraliste. Parmi ces tests on a le D de Tajima (Tajima, 1989), le Fs de Fu (Fu, 1997) 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). Pour le *cytochrome b*, l'existence d'une quelconque sélection a été appréhendée par le rapport dN/dS grâce au logiciel MEGA 7 avec comme modèle la théorie neutre de l'évolution de Kimura. DN est le taux de substitution non-synonyme et DS est le taux de substitution synonyme. Le niveau de significativité a été retenu à 5% et une valeur de bootstrap de 10000 réplications. Après les tests démo-génétiques nous avons déterminé l'analyse de Mismatch qui 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 indices SSD et Rag ont été obtenus avec le logiciel Arlequin version 3.5.1.3 (Excoffier *et al*, 2010).

CHAPITRE III. RESULATS ET DISCUSSION

III.1. Résultats

III.1.1. Nature et position des variantes

Les séquences obtenues sont au nombre 70 dont on s'est servie pour établir les paramètres de variabilité génétique, de la différenciation et de la structuration sans oublier les tests démo génétiques. Pour l'identification des mutations, on s'est basée uniquement que sur 52 séquences avec une longueur maximale de 325 paires de bases compatibles deux à deux.

III.1.1.1. Variant connus du gène cytochrome b chez les tissus témoins

La recherche des mutations a permis de retrouver les variants connus des tissus témoins recensés dans le tableau I et ceux des tissus cancéreux recensés dans le tableau II du gène *cytochrome b.*

Tableau I: Variants du gène *cytochrome b* chez les tissus témoins.

DbSNP	Tissus Témoins	Changement de protéine	Effet sur le codage	Fréquence de la mutation
rs527236194	c.1038T>C		Synonyme	2/26
rs879113411	c.900C>T	p.CYTB:(Ile300=)	Synonyme	2/26
rs386829253	c.870C>G		Synonyme	2/26
rs386829250	c.795T>C	p.CYTB:(Pro265=)	Synonyme	8/26
rs28357373	c.883T>C	p.CYTB:(Leu295=)	Synonyme	2/26
rs878890251	c.907A>G	p.CYTB:(Met303Val)	Non-synonyme	2/26
rs193302997	c.924T>C	p.CYTB:(His308=)	Synonyme	1/26
rs3094281	c.1105A>G	p.CYTB:(Ile369Val)	Non-synonyme	1/26
rs878971797	c.840T>C	p.CYTB:(Ile280=)	Synonyme	2/26
rs28357371	c.789C>G	p.CYTB:(Asn263Lys)	Non-synonyme	2/26
rs527236189	c.807G>A	p.CYTB:(Lys269=)	Synonyme	3/26
rs879116676	c.819T>C	p.CYTB:(Tyr273=)	Synonyme	1/26
rs202225494	c.1103C>T	p.CYTB:(Thr368Ile)	Non-synonyme	1/26

Au total 13 variants connus (dbSNP) ont été retrouvés sur le gène *cytochrome b* chez les tissus témoins dont 4 (30,77%) variants sont des mutations non synonymes toutes bénignes et tolérées. Ces mutations peuvent être responsable d'autres mutations qui à leur tour pourront donner la maladie. Les 9 variants restant n'ont aucun effet car ils donnent le même acide aminé (voir tableau I).

III.1.1.2. Variants connus du gène cytochrome b chez les tissus cancéreux

On a pris en compte uniquement les variants qui donnent la probabilité d'influer sur la maladie selon au moins deux logiciels sur trois de prédiction de la pathogénicité à savoir dans notre cas les logiciels SIFT et Polyphen2.

Tableau II : Variants du gène *cytochrome b* chez les tissus cancéreux.

DbSNP	Tissus cancéreux	Changement de protéine	Effet sur le codage	Fréquence de la mutation
rs386829253	c.870C>G		synonyme	3/26
rs878890251	c.907A>G	p.CYTB:(Met303Val)	Non-synonyme	5/26
rs369851331	c.917T>C	p.CYTB:(Ile306Thr)	Non-synonyme	2/26
rs879129589	c.986C>T	p.CYTB:(Ala329Val)	Non-synonyme	4/26
rs879113411	c.900C>T		synonyme	5/26
rs3094280	c.916A>G	p.CYTB:(Ile306Val)	Non-synonyme	1/26
rs193302997	c.924T>C		synonyme	1/26
rs199967113	c.926T>C	p.CYTB:(Met309Thr)	Non-synonyme	1/26
rs527236192	c.936A>G		synonyme	1/26
rs879011405	c.975T>C	p.CYTB:(Tyr325=)	synonyme	1/26
rs386829259	c.988G>A	p.CYTB:(Ala330Thr)	Non-synonyme	1/26
rs527236194	c.1038T>C	p.CYTB:(Pro346=)	synonyme	1/26
rs879063269	c.1044C>T	p.CYTB:(Thr348=)	synonyme	1/26
rs28357373	c.883T>C	p.CYTB:(Leu295=)	synonyme	4/26
rs879116676	c.819T>C	p.CYTB:(Tyr273=)	synonyme	8/26
rs878971797	c.840T>C	p.CYTB:(Ile280=)	synonyme	8/26
rs28357371	c.789C>G	p.CYTB:(Asn263Lys)	Non-synonyme	7/26
rs527236189	c.807G>A	p.CYTB:(Lys269=)	synonyme	7/26
rs386829250	c.795T>C	p.CYTB:(Pro265=)	synonyme	2/26

Au total 134 variants (voir annexe) ont été retrouvés sur ce gène dont 77 sont bénins, tolérés et 57 sont délétères, probablement dommageable. Parmi ces variants, 20 ont déjà été répertoriés dans les bases de données des variants (dbSNP). On ne prendra en compte que 19 variants connus sachant que sur un des variants (c.1066G>A), les deux logiciels ne donnent pas la même conclusion. Sur ces 19 variants restants, 7 sont des mutations non-synonymes et elles sont toutes classées comme bénignes. Les 12 autres mutations sont synonymes et n'ont pas de conséquences sur les protéines.

III.1.1.3. Variabilité et diversité génétique

Les valeurs relatives de la variabilité et de diversité génétique du ***cytochrome b*** sont représentées dans le tableau III.

Tableau III : Indices de variabilité et de diversité génétique.

Paramètres		**Tissus Témoins**	**Tissus cancéreux**
Taille de l'échantillon		35	35
Nombre de sites		325	325
Sites monomorphes		229	183
Sites polymorphes		96	142
Nombre total de mutations ETA		121	174
Nombre d'haplotypes		33	34
Sites informatifs		69	99
Sites non informatifs		27	43
Nombre moyen de différence nucléotidique K		24,892	31,291
Taux de mutation R		2,02	1,945
Nature des mutations	Transition (%)	68,56	66,99
	Transversion (%)	31,44	33
Diversité haplotypique (hd)		0,997	0,998
Diversité nucléotidique (Pi)		0,07659	0,09628
A+T		56,24	56,83
C+G		43,77	43,17
Ks (Substitution synonyme)		0,057(0,017)	0,090(0,020)
Kns (Substitution non synonyme)		0,089(0,016)	0,124(0,016)

La nature des mutations montre que les transitions sont beaucoup plus importantes que les transversions aussi bien pour les tissus cancéreux que pour les tissus témoins. Le nombre moyen de différences nucléotidiques k est très élevé pour les tissus cancéreux que pour les tissus témoins. L'analyse du polymorphisme a révélé une valeur élevée de diversité haplotypique (hd) et une faible valeur de diversité nucléotidique (Pi) tant pour les tissus cancéreux que pour les tissus témoins. Cette dernière traduit un signal d'une croissance démographique rapide à partir d'une population ancestrale à faible taille efficace depuis un temps suffisant pour un rétablissement de la diversité haplotypique par mutation, mais trop court pour l'accumulation de fortes différences entre séquences. Le taux de substitution non

synonyme (Kns) > taux de substitution synonyme (Ks) : c'est une sélection positive avec changement d'acides aminés, ainsi les substitutions non synonymes sont favorisées.

III.1.1.4. Fréquence en acides amines

La fréquence en acides aminés du gène *cytochrome b* entre tissus témoins et tissus cancéreux est représentée dans le tableau IV.

Tableau IV : Fréquences en acides aminés du gène *cytochrome b*

Acides aminés	Tissus Témoins	Tissus cancéreux	Pvalue (wilcox)
Ala	6,554	6,368	0.5938
Cys	0,508	0,695	0.101
Asp	0,989	0,936	0.9808
Glu	0,856	0,856	0.4565
Phe	4,788	5,004	0.1646
Gly	4,440	4,227	0.08954
His	1,738	2,033	0.03125
Ile	11,128	10,864	0.2241
Lys	3,263	3,398	0.3625
Leu	19,154	19,186	0.9695
Met	4,654	4,415	0.4702
Asn	1,417	1,177	0.1643
Pro	8,747	8,375	0.02836
Gln	5,056	5,325	0.03867
Arg	1,578	1,311	0.09286
Ser	7,597	7,894	0.05281
Thr	5,751	6,101	0.1247
Val	4,975	5,084	0.9287
Trp	2,835	2,916	0.3004
Tyr	3,959	3,826	0.4387

Nous constatons que la fréquence de chaque acide aminé du *cytochrome b* se différencie légèrement entre tissus témoins et tissus cancéreux, avec une différence statistiquement non significative (Pvalue > 0,05) sur la plupart des acides aminés. Cependant nous observons des valeurs significatives pour trois (3) acides aminés qui sont statistiquement significatives (Pvalue < 0,05 en bleu) à savoir l'histidine, la glutamine et la proline.

III.1.1.5. Test de sélection

Le test sous sélection nous permet de voir si les mutations se font de manières hétérogènes ou bien si les mutations vont ciblées un codon.

Tableau V : Test de sous sélection par codon

	DS	DN	DN-DS	Pvalue
Codon 74 (274 CGA tissus).	0	4,9840	4,9840	0,0216

Sous l'hypothèse d'une neutralité (dN = dS) avec une valeur de Pvalue (0.0216) qui est < à 0.05, l'hypothèse de départ est rejetée et l'hypothèse alternative est acceptée. Pour l'ensemble des codons du gène *cytochrome b*, le triplet CGA (CGU) qui code pour l'arginine est sous sélection positive. La substitution dS=0 ; dN=4,9840 ; dN-dS= 4,9840 pour l'arginine induit le changement d'acide aminé, autrement dit, elle est avantageuse à l'évolution tumorale, c'est-à-dire ce codon est susceptible de muter plus rapidement que les autres, on peut le considérer comme étant la principale source du polymorphisme

III.1.1.6. Paramètres de différenciation et structuration génétique

On constate que la distance génétique intra-groupe est plus grande au sein des tissus cancéreux par rapport à la distance chez les tissus témoins qui est plus faible.

Tableau VI : Distance génétique de Nei

Distance génétique	Intragroupe	Intergroupe
Tissus Témoins	0,102(0,015)	0,130(0,018)
Tissus cancéreux	0,147(0,019)	

On observe une distance génétique important chez la population tumorale. Cette différence entre les séquences peut s'expliquer par le fait qu'il peut y'avoir plusieurs types de cancers du sein avec chacun des caractéristiques histologiques différents d'une patiente à une autre. La distance génétique inter-population est expliquée par la diversité au sein de la population tumorale.

Tableau VII : Facteur de différenciation génétique de Wright (Fst)

Fst	Intragroupe	Intergroupe
Tissus Témoins	0,02542	0,02224
Tissus cancéreux	0,01906	

Pvalue= 0.09189+-0.01065

Le Fst de Wright et Fisher est un indice qui quantifie l'hétérogénéité des fréquences haplotypiques entre subdivision d'une population donnée.

Chez les tissus témoins aussi bien que chez les tissus cancéreux, leurs Fst appartiennent dans l'intervalle 0**<Fst<0.15** avec une Pvalue=0,09189+/-0,01065 supérieure à 0,05**.**

Ils sont donc faiblement significatifs : il y'a une faible différenciation entre tissus témoins et tissus cancéreux.

Tableau VIII : Test AMOVA (test de la structuration génétique)

	Au sein des populations	**Intra-population**
Pourcentage de variation (AMOVA	2.22	97.78

Pvalue= 0.09189+-0.01065

L'analyse de la variance moléculaire montre un pourcentage de variation de 2.22%.

2,22% de la variabilité génétique entre ces populations est expliqué par une différenciation génétique entre les tissus témoins et les tissus cancéreux.

Avec une Pvalue de 0.09189+-0.01065 supérieure à 0,05 nous permet de garder l'hypothèse nulle qui dit qu'il n'y pas de structuration génétique, notre Fst est alors statistiquement non significatif : il n'existe pas une structuration génétique du cancer de sein en fonction des tissus témoins et tissus cancéreux.

III.1.1.7. Analyse de l'évolution démographique

III.1.1.7.1. Tests démo-génétiques

Tableau IX : Tests démo-génétiques.

Test de neutralité	**Tissus Témoins**	**Tissus cancéreux**
D de Tajima	0.25285	-0.34802
Pvalue	0.65300	0.41200
Fs de Fu	-11.44155	-11.39303
Pvalue	0.00000	0.00000

- Chez les tissus témoins, on a D de Tajima est égal à 0.25285 avec une Pvalue=0.65300 statistiquement non significatif associée avec un Fs de Fu égal -11.44155 avec une Pvalue=0.00000.
- Chez les tissus cancéreux, on a le D de Tajima est égal à -0.34802 avec une Pvalue=0.41200 statistiquement non significatif associée avec un Fs de Fu égal -11.39303 avec une Pvalue=0.00000.

Les tests de neutralité basés sur la théorie de Kimura, pour la population de tissus témoins montrent des valeurs non significativement positives pour D de Tajima et des valeurs significativement négatives pour Fs de Fu.

Chez la population de tissus cancéreux, le D de Tajima est non significatif et Fs de Fu est significatif, et tous les deux valeurs sont négatives.

Ces valeurs expriment les résultats d'un excès de mutations rares chez les tissus cancéreux et traduisent une population en expansion démographique.

III.1.1.7.2. Analyse de mismatch distribution

Tableau X : Analyse de Mismatch distribution

Population	Tissus Témoins	Tissus cancéreux
SSD	0.00360	0.00266
Pvalue	0.91000	0.98000
Rag	0.00465	0.00327
Pvalue	0.92000	0.97000

L'analyse de Mismatch distribution accompagnée de la SSD et du Rag montre des valeurs de Pvalue qui ne sont pas significatives alors il n'y a pas d'écart entre les valeurs observées et simulées, donc la population considérée est en expansion démographique.

III.2. Discussion

L'objectif général de cette étude est de contribuer à la recherche sur la prévalence des mutations du gène *cytochrome b* dans le cancer du sein chez les femmes sénégalaises. Le choix de l'ADN mitochondrial s'est porté en premier sur le *cytochrome b* en raison de nombreux travaux effectués au laboratoire qui suggère qu'il avait une variabilité relativement très élevée (Sequeira et al. 2012). Ainsi nous avons recherché les mutations et déterminer le degré d'implication de ce gène dans la survenue du cancer de sein. La variabilité, la diversité génétique de ce gène ainsi que la différenciation et la structuration génétique ont été étudiées.

Nos observations confirment les résultats des travaux de Mbaye et al, 2015 concernant la pénétrance du *cytochrome b* dans l'occurrence du cancer de sein au Sénégal. Partant de cela, plusieurs études ont également été menées dans d'autres populations et il a été démontré que le gène *cytochrome b* était impliqué dans la pathogénicité de beaucoup de maladies comme Neuropathie optique héréditaire de Leber ; les maladies psychiatriques ; le cancer du pancréas ou encore le glaucome …etc. (Brown et al, 1992 ; Sequeira et al. 2012 ; Lam et al, 2012 ; Collins et al, 2016). Ceci pourrait être expliqué par les particularités du génome mitochondrial qui présente une variabilité relativement élevée malgré qu'il s'agisse d'une séquence codante (Mbaye et al, 2015). Plusieurs mutations somatiques ont également été décrites dans les séquences de tissus témoins comme dans les séquences de tissus cancéreux témoignant ainsi de la grande variabilité du gène *cytochrome b* comme de son instabilité. On peut en déduire que les tissus non tumoraux présentent un certain degré d'altérations génétiques qui prédisposent à la transformation néoplasique (Le Roux-Goglin, Emilie, 2007). Les variants délétères retrouvés le plus fréquemment chez les tissus cancéreux sont : c.845G>A (38,46%), c.802A>G (26,92%) et c.818A>G (30,77%). Ils ne sont pas répertoriés dans la base de données des variants et sont donc considérés comme de nouveaux variants chez les femmes sénégalaises. On a répertoriés 13 variants connus chez les tissus témoins et 19 variants connus chez les tissus cancéreux. Ces variants ont été retrouvés également dans d'autres études comme (Brown et al, 1992 ; Koilkonda et al, 2011 ; Sequeira et al. 2012 ; Lam et al, 2012 ; Chen et al, 2012 ; Garcia-Alonso et al, 2014 ; Collins et al, 2016).

Une comparaison des nucléotidiques au niveau intra et interindividuel, révèle une forte variabilité du *Cytochrome b*. Une forte désorganisation est observée des tissus témoins aux tissus cancéreux.

Pour la totalité des individus, la composition nucléotidique en A+T est plus élevée que celle de C+G et ceci est valable aussi bien au sein d'un même individu qu'entre individu.

Cette forte variabilité interindividuelle observée pourrait être dû à des mutations précancéreuses d'autant plus que les prélèvements sont issus du même individu pour les tissus cancéreux que pour les tissus témoins (Ba et al, 2014).

Le polymorphisme du *cytochrome b* est marqué d'une forte diversité haplotypique (Hd) et d'une faible diversité nucléotidique (Pi) tant pour les tissus témoins que pour les tissus cancéreux. Ce qui laisse penser à une évolution rapide de la pathologie tumorale chez les patientes due à une accumulation de mutations génétiques différentes d'un individu à un autre. Ceci pourrait être expliqué par l'hétérogénéité des cancers du sein. Il existe différents types de cancers de sein en fonction du stade d'évolution, du lieu et des cellules à partir desquelles il s'est propagé. Certains pourraient donc évoluer plus rapidement que d'autres d'où les différences de taille et d'histologie. Il serait intéressant d'inclure le type de cancers du sein dans nos paramètres afin de mieux comprendre son implication dans l'évolution de la pathologie à long terme.

La distribution de la fréquence des acides aminés pour le *cytochrome b* montre une différence significative de l'histidine, de la glutamine et la proline entre les tissus témoins et les tissus cancéreux.

L'Histidine comme acide aminé essentiel, est indispensable pour la croissance et la réparation des tissus et pour le maintien des gaines de myéline qui protègent les cellules nerveuses. L'histidine est aussi utile pour la production des globules rouges et globules blancs du sang (Moro et al, 2020). Mais elle augmente aussi l'efficacité des médicaments contre le cancer.

La glutamine est souvent connue comme un acide aminé clé pour le métabolisme et la prolifération tumorale permettant la production d'énergie et de métabolites intermédiaires (DeBerardinis and Cheng 2010). Il est également connu que les cellules tumorales utilisent la glutamine comme source d'énergie et que nombre d'entre elles sont accompagnées d'un déficit en glutamine (Michalak *et al*, 2015).

La proline aide la cicatrisation du cartilage et renforce les articulations, les tendons et les muscles du cœur (Rejeb et al, 2012).

Ceci attire l'attention sur l'importance de ces acides aminés dans les cancers en général.

La variabilité génétique se traduit par une diversité d'acides aminés entre les séquences des tissus normaux et celles des tissus cancéreux.

Chaque acide aminé a sa propre place dans le maintien d'un métabolisme normal et joue un rôle important dans des fonctions biologiques spécifiques, en dehors de la synthèse des protéines.

Les cellules cancéreuses prolifèrent anormalement par rapport aux cellules normales. Il existe ainsi une compétition entre l'hôte et sa tumeur pour l'utilisation de nutriments, en particulier certains acides aminés.

Elles ont donc besoin d'une plus grande quantité d'acides aminés comme nutriments car elles sont les éléments constitutifs de la synthèse des protéines. Les protéines sont non seulement essentielles pour la croissance mais aussi pour former la base structurelle des chromosomes. Il est clairement indiqué que sans acides aminés, les cellules tumorales ne peuvent pas fonctionner parce que les protéines ne peuvent pas être synthétisées. Sur la base de ce concept, des recherches récentes ont ciblé les enzymes métaboliques des acides aminés qui dérégulent le métabolisme d'un acide aminé spécifique, essentiel à la prolifération des cellules cancéreuses. Ces enzymes coupent l'approvisionnement en acides aminés essentiels, ce qui entraîne la privation de nutriments des cellules cancéreuses et donc leur mort (Prajapati et al, 2017). Actuellement, plusieurs enzymes métaboliques d'acides aminés sont en cours d'essais cliniques qui ciblent spécifiquement les voies métaboliques des acides aminés dans les cellules tumorales mais pas dans les cellules normales.

La L-Asparaginase, la L-Glutaminase, la L-Argininase, la L-Méthioninase sont quelques exemples d'enzymes utilisées dans la thérapie du cancer qui ciblent des acides aminés spécifiques entraînant une perturbation de la prolifération des cellules cancéreuses sans affecter le métabolisme cellulaire normal (Rhoads et al, 2009).

Le concept d'enzymes thérapeutiques existe depuis au moins 50 ans. Les enzymes thérapeutiques présentent deux caractéristiques principales : premièrement, les enzymes agissent sur leur cible avec une grande spécificité et une grande affinité ; deuxièmement, elles sont catalytiques et capables de convertir un substrat en un produit souhaité (Vellard, Michel, 2003). Ces deux caractéristiques font des enzymes des médicaments spécifiques et puissants qui peuvent accomplir dans l'organisme une biochimie thérapeutique que les petites molécules ne peuvent pas accomplir. Ces caractéristiques ont conduit au développement de nombreux médicaments enzymatiques pour un large éventail de troubles.

Le test de sélection par codon a montré que le codon 74 de *cytochrome b* chez les tissus cancéreux qui code pour l'Arginine est sous sélection positive caractérisant la supériorité des mutations non-synonymes comparées aux mutations synonymes.

Autrement dit, elle est avantageuse à l'évolution tumorale. Sur le codon 74, l'Arginine est muté en Glycine correspondant au variant c.845G>A retrouvé chez 38,46% de notre population d'étude, et en Proline c.845G>C (3,85%). Les modifications subies par le codon 74 peuvent changer la fonction de la protéine synthétisée.

La distance génétique à l'intérieur des tissus témoins, est plus faible comparée à celle intra tissus cancéreux. La faiblesse des distances génétiques entre les populations, semble être expliquée par le fait que le tissu tumoral et le tissu témoin proviennent du même individu. La distance intergroupe est expliquée par celle intra tissus. Ce constat montre que la principale caractéristique de la cellule cancéreuse réside dans le fait que sa prolifération n'est plus sous contrôle des mécanismes régulateurs de l'organisme, et qu'elle évolue au contraire selon un rythme qui lui est propre. La distance génétique élevée, observée entre les tissus témoins et cancéreux pourrait être expliquée par le fait que la glande mammaire soit en évolution constante au cours de la vie de la femme. Par conséquent, le nombre de cellule en différenciation et en croissance serait plus important que dans tout autre organe. Ce qui rend la glande mammaire plus sensible aux processus de cancérisation (Brisken, 2002).

Les résultats de l'AMOVA viennent compléter ce résultat en nous révélant que la source de variabilité est intra population et non inter population. Ceci correspond bien aux résultats obtenus par Mbaye *et al* (2014) qui avaient démontré une grande hétérogénéité au niveau des individus et non au niveau des populations. En d'autres termes il n'existe pas de différenciation génétique entre les patientes mais plutôt que chaque individu est un patient unique génétiquement parlant.

CONCLUSION

L’avancée des techniques de recherche sur les pathologies tumorales a permis aux chercheurs de détecter plusieurs polymorphismes génétiques influant sur l’apparition de certaines tumeurs. C’est dans cette perspective qu’est née l’idée d’étude sur les gènes impliqués dans le métabolisme de survenue des cancers. Et c’est en suivant cette logique que notre étude a eu comme objectif général de connaitre la caractérisation génétique des mutations du *cytochrome b* dans l'occurrence du cancer du sein au Sénégal.

Aux termes de ce travail, nos résultats montrent en plus des variants connus (dbSNP), de nouveaux variants sont retrouvés tant chez les tissus témoins que chez les tissus cancéreux. Les mutations survenues sur l’Arginine du codon 74 influent sur la pathogénicité de cette maladie. Approfondir la recherche sur le codon 74 serait un bon moyen afin d’établir des biomarqueurs. Il serait aussi intéressant d'étudier ce codon pour des perspectives thérapeutiques. Il est clair que d’autres études seraient nécessaires pour déterminer les facteurs influençant le développement des cancers du sein. Pour cela, élargir la population d’étude et inclure les paramètres clinico-pathologiques seraient un bon moyen afin de mieux comprendre leur processus évolutif pour trouver un traitement autre que l’excision chirurgicale.

REFERNCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. AMAT, SOPHIE, PENAULT-LLORCA, FREDERIQUE, CURE, HERVE, *et al.* Scarff-Bloom-Richardson (SBR) grading: a pleiotropic marker of chemosensitivity in invasive ductal breast carcinomas treated by neoadjuvant chemotherapy. *International journal of oncology*, 2002, vol. 20, no 4, p. 791-796.
2. BA, Dieynaba, MBAYE, Fatimata, KA, Sidy, *et al.* MUTATIONS AND AMINO ACIDS VARIATIONS OF CYTOCHROME B IN 26 OVARIAN TUMOR TISSUES OF SENEGALESE WOMEN.
3. BARTSCH, Helmut, DALLY, Heike, POPANDA, Odilia, *et al.* Genetic risk profiles for cancer susceptibility and therapy response. In : *Cancer Prevention*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2007. p. 19-36.
4. BICAR, Ayse. Thèse d'exercice. 1992.
5. BLEIN, Sophie. *Étude de la variabilité du génome mitochondrial comme facteur de susceptibilité au cancer du sein*. 2014. Thèse de doctorat.
6. BRAY, Freddie, FERLAY, Jacques, SOERJOMATARAM, Isabelle, *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 2018, vol. 68, no 6, p. 394-424.
7. BRISKEN, Cathrin. Hormonal control of alveolar development and its implications for breast carcinogenesis. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 2002, vol. 7, no 1, p. 39-48.
8. BROWN, Michael D., VOLJAVEC, Alexander S., LOTT, M. T., *et al.* Mitochondrial DNA complex I and III mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Genetics*, 1992, vol. 130, no 1, p. 163-173.
9. CHEN, Ai, RAULE, Nicola, CHOMYN, Anne, *et al.* Decreased reactive oxygen species production in cells with mitochondrial haplogroups associated with longevity. *PloS one*, 2012, vol. 7, no 10, p. e46473.
10. CLAVEL-CHAPELON, Françoise. Cumulative number of menstrual cycles and breast cancer risk: results from the E3N cohort study of French women. *Cancer Causes & Control*, 2002, vol. 13, no 9, p. 831-838.
11. COIG, Aurélie. LibGuides: Services perturbés: Accueil. 2020.
12. COLLINS, David W., GUDISEVA, Harini V., TRACHTMAN, Benjamin, *et al.* Association of primary open-angle glaucoma with mitochondrial variants and haplogroups common in African Americans. *Molecular vision*, 2016, vol. 22, p. 454.

13. COURIVAUD, Thomas. *Caractérisation d'un nouveau mécanisme d'action de la E3 ubiquitine ligase WWP1 et régulation de son activité dans la cancérogenèse*. 2015. Thèse de doctorat. Paris 6. 2 Schéma.

14. DA FONSECA, Rute R., JOHNSON, Warren E., O'BRIEN, Stephen J., *et al.* The adaptive evolution of the mammalian mitochondrial genome. *BMC genomics*, 2008, vol. 9, no 1, p. 119.

15. DALLAGI, Tesnim. *Conception, caractérisation et évaluation de nouveaux radiotraceurs pour le diagnostic et le traitement du cancer du sein et de la prostate*. 2010. Thèse de doctorat. Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.

16. DARMAUN, D. Intestin et métabolisme de la glutamine. 1993.

17. DE LA SANTÉ, O.M., 2018. Dernières données mondiales sur le cancer, Communiqué de presse no. 263, Centre international de recherche sur le cancer.

18. DEBERARDINIS, Ralph J. et CHENG, Tzuling. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene*, 2010, vol. 29, no 3, p. 313-324.

19. DUROCHER, Francine, GURNARD, Frédéric, DESJARDINS, Sylvie, *et al.* Inherited susceptibility to breast cancer: accomplishments and challenges. In : *Molecular genetics of cancer*. 2005. p. 19-93.

20. FENG, Yixiao, SPEZIA, Mia, HUANG, Shifeng, *et al.* Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & diseases*, 2018, vol. 5, no 2, p. 77-106.

21. GARCIA-ALONSO, Luz, JIMÉNEZ-ALMAZÁN, Jorge, CARBONELL-CABALLERO, Jose, *et al.* The role of the interactome in the maintenance of deleterious variability in human populations. *Molecular systems biology*, 2014, vol. 10, no 9, p. 752.

22. GRZYBOWSKA-SZATKOWSKA, Ludmila et SLASKA, Brygida. Mitochondrial DNA and carcinogenesis. *Molecular medicine reports*, 2012, vol. 6, no 5, p. 923-930.

23. HANAHAN, Douglas et WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 2011, vol. 144, no 5, p. 646-674.

24. HEU, BODIANGDJEL BIABI et LEA, Angela Murielle. *NUTRITION ET CANCEROGENESE: PHYSIOLOGIE, FACTEURS NUTRITIONNELS ET PREVENTION DU CANCER*. 2018. Thèse de doctorat.

25. KEEN, Judith Clancy et DAVIDSON, Nancy E. The biology of breast carcinoma. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 2003, vol. 97, no S3, p. 825-833.

26. KEÎTA, Marie Mariam. Cancer du sein chez les femmes de moins de 35 ans au mali profils épidémiologiques et histopathologies. 2018.

27. KEY, Timothy J., VERKASALO, Pia K., et BANKS, Emily. Epidemiology of breast cancer. *The lancet oncology*, 2001, vol. 2, no 3, p. 133-140.

28. KOILKONDA, Rajeshwari D. et GUY, John. Leber's hereditary optic neuropathy-gene therapy: from benchtop to bedside. *Journal of ophthalmology*, 2011, vol. 2011.

29. LAM, Ernest T., BRACCI, Paige M., HOLLY, Elizabeth A., *et al.* Mitochondrial DNA sequence variation and risk of pancreatic cancer. *Cancer research*, 2012, vol. 72, no 3, p. 686-695.

30. LARSEN, Nicolai Balle, RASMUSSEN, Merete, et RASMUSSEN, Lene Juel. Nuclear and mitochondrial DNA repair: similar pathways? *Mitochondrion*, 2005, vol. 5, no 2, p. 89-108.

31. LE ROUX-GOGLIN, Emilie. *Détection des mutations de/TP53/et/CTNNB1/dans l'ADN tumoral ou plasmatique: signification comme biomarqueurs de l'hépatocancérogenèse*. 2007. Thèse de doctorat.

32. LY, M., LY, A., RODRIGUES, M., *et al.* Le cancer en Afrique, un nouveau défi sanitaire. Exemples du Mali et de l'association OncoMali. *Bulletin du cancer*, 2010, vol. 97, no 8, p. 965-968.

33. MBAYE, Fatimata, DEM, Ahmadou, FALL, Malick, *et al.* Implication of the Cytochrome B nucleotide and protein mutations in the occurrence of breast cancer in Senegal. *Int Jour of Applied Biol and Phar Tech*, 2012, vol. 3, no 2, p. 107-114.

34. MICHALAK, Krzysztof Piotr, MAĆKOWSKA-KĘDZIORA, Agnieszka, SOBOLEWSKI, Bogusław, *et al.* Key roles of glutamine pathways in reprogramming the cancer metabolism. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2015, vol. 2015.

35. MILLION WOMEN STUDY COLLABORATORS, *et al.* Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *The Lancet*, 2003, vol. 362, no 9382, p. 419-427.

36. MORO, Joanna, TOMÉ, Daniel, SCHMIDELY, Philippe, *et al.* Histidine: A Systematic Review on Metabolism and Physiological Effects in Human and Different Animal Species. *Nutrients*, 2020, vol. 12, no 5, p. 1414.

37. NKONDJOCK, André et GHADIRIAN, Parviz. Facteurs de risque du cancer du sein. *médecine/sciences*, 2005, vol. 21, no 2, p. 175-180.

38. PAYRE, Bruno. *Identification de nouvelles cibles du Tamoxifène impliquées dans son activité pharmacologique*. 2008. Thèse de doctorat. Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier.

39. PRAJAPATI, Bhumi et SUPRIYA, Naga Rathna. REVIEW ON ANTICANCER ENZYMES AND THEIR TARGETED AMINO ACIDS. 2017.

40. RAMOS, Amanda, SANTOS, Cristina, MATEIU, Ligia, *et al.* Frequency and pattern of heteroplasmy in the complete human mitochondrial genome. *PloS one*, 2013, vol. 8, no 10, p. e74636.

41. RASOLA, Andrea et BERNARDI, Paolo. Mitochondrial permeability transition in Ca2+-dependent apoptosis and necrosis. *Cell calcium*, 2011, vol. 50, no 3, p. 222-233.

42. REJEB, Ben, ABDELLY, Chedly, et SAVOURÉ, Arnould. Proline, a multifunctional amino-acid involved in plant adaptation to environmental constraints. *Biologie aujourd'hui*, 2012, vol. 206, no 4, p. 291-299.

43. RHOADS, J. Marc et WU, Guoyao. Glutamine, arginine, and leucine signaling in the intestine. *Amino acids*, 2009, vol. 37, no 1, p. 111-122.

44. RUSSO, Jose, HU, Yun-Fu, YANG, Xiaoqi, *et al.* Chapter 1: Developmental, cellular, and molecular basis of human breast cancer. *JNCI Monographs*, 2000, vol. 2000, no 27, p. 17-37.

45. RUSSO, Irma H. et RUSSO, Jose. Pregnancy-induced changes in breast cancer risk. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 2011, vol. 16, no 3, p. 221.

46. SEGAL, Neil H., PARSONS, D. Williams, PEGGS, Karl S., *et al.* Epitope landscape in breast and colorectal cancer. *Cancer research*, 2008, vol. 68, no 3, p. 889-892.

47. SEQUEIRA, Adolfo, MARTIN, Maureen, ROLLINS, Brandi, *et al.* Mitochondrial mutations and polymorphisms in psychiatric disorders. *Frontiers in genetics*, 2012, vol. 3, p. 103.

48. SEVER, Richard et BRUGGE, Joan S. Signal transduction in cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2015, vol. 5, no 4, p. a006098.

49. SONG, Shiwei, PURSELL, Zachary F., COPELAND, William C., *et al.* DNA precursor asymmetries in mammalian tissue mitochondria and possible contribution to mutagenesis through reduced replication fidelity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, vol. 102, no 14, p. 4990-4995.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

50. STINGL, John. Estrogen and progesterone in normal mammary gland development and in cancer. *Hormones and Cancer*, 2011, vol. 2, no 2, p. 85-90.

51. STOPPA-LYONNET, D., STERN, M. H., SOUFIR, N., *et al.* Prédispositions génétiques aux cancers: actualités et perspectives en 2010. *Pathologie Biologie*, 2010, vol. 58, no 5, p. 324-330.

52. STRATTON, Michael R. et RAHMAN, Nazneen. The emerging landscape of breast cancer susceptibility. *Nature genetics*, 2008, vol. 40, no 1, p. 17.

53. VAN OVEN, Mannis et KAYSER, Manfred. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Human mutation*, 2009, vol. 30, no 2, p. E386-E394.

54. VELLARD, Michel. The enzyme as drug: application of enzymes as pharmaceuticals. *Current opinion in biotechnology*, 2003, vol. 14, no 4, p. 444-450.

55. WEBSTER, Keith A. Mitochondrial membrane permeabilization and cell death during myocardial infarction: roles of calcium and reactive oxygen species. *Future cardiology*, 2012, vol. 8, no 6, p. 863-884.

56. WILLIAMS, R. Scott, WILLIAMS, Jessica S., et TAINER, John A. Mre11–Rad50–Nbs1 is a keystone complex connecting DNA repair machinery, double-strand break signaling, and the chromatin template. *Biochemistry and cell biology*, 2007, vol. 85, no 4, p. 509-520.

57. WOOSTER, Richard et WEBER, Barbara L. Breast and ovarian cancer. *New England Journal of Medicine*, 2003, vol. 348, no 23, p. 2339-2347.

58. WREN, Barry G. The origin of breast cancer. *Menopause*, 2007, vol. 14, no 6, p. 1060-1068.

ANNEXES

Tissus cancéreux	Changement de protéines	SIFT	Polyphen 2	Fréquence de la mutation	Mutations communes avec les tissus témoins
c.788A>C	p.Asn263Thr	Toléré (1)	Bénigne (0,009)	7/26	y
c.828C>G	p.Phe276Leu	Délétère (0)	Probablement dommageable (0,998)	2/26	y
c.850G>T	p.CYTB:(Val284Phe)	Délétère (0,01)	Possible dommageable (0,951)	3/26	y
c.871G>T	p.CYTB:(Val291Phe)	Délétère (0)	Probablement dommageable (1)	1/26	
c.1105A>T	p.CYTB:(Ile369Phe)	Toléré (0,7)	Benigne (0,120)	3/26	
c.907A>G	p.CYTB:(Met303Val)	Toléré (0,65)	Benigne (0,000)	5/26	y
c.909A>C	p.CYTB:(Met303Ile)	Toléré (0,54)	Benigne (0,008)	4/26	y
c.917T>C	p.CYTB:(Ile306Thr)	Toléré (0,08)	Benigne (0,000)	2/26	
c.918C>A	p.CYTB:(Ile306Met)	Toléré (0,12)	Benigne (0,004)	2/26	
c.986C>T	p.CYTB:(Ala329Val)	Toléré (1)	Benigne (0,000)	4/26	
c.1040T>G	p.CYTB:(Phe347Cys)	Délétère (0,01)	Probablement dommageable (1)	1/26	
c.1043C>T	p.CYTB:(Thr348Ile)	Toléré (1)	Benigne (0,000)	2/26	
c.1046T>C	p.CYTB:(Ile349Thr)	Toléré (0,1)	Benigne (0,000)	3/26	
c.1106T>A	p.CYTB:(Ile369Asn)	Toléré (0,31)	Benigne (0,034)	1/26	
c.835A>G	p.CYTB:(Thr279Ala)	Toléré (1)	Benigne (0,000)	8/26	y
c.850G>A	p.CYTB:(Val284Ile)	Toléré (1)	Benigne (0,007)	8/26	y
c.908T>C	p.CYTB:(Met303Thr)	Toléré (0,45)	Benigne (0,000)	4/26	y
c.916A>G	p.CYTB:(Ile306Val)	Toléré (0,42)	Benigne (0,000)	1/26	
c.926T>C	p.CYTB:(Met309Thr)	Toléré (0,99)	Benigne (0,000)	2/26	
c.988G>A	p.CYTB:(Ala330Thr)	Tolére (0,5)	Benigne (0,007)	1/26	
c.997C>T	p.CYTB:(Leu333Phe)	Toléré (0,41)	Benigne (0,002)	1/26	
c.1033T>C	p.CYTB:(Tyr345His)	Toléré (0,95)	Benigne (0,017)	3/26	y
c.1036C>T	p.CYTB:(Pro346Ser)	Délétère (0)	Probablement dommageable (1)	2/26	
c.1090A>C	p.CYTB:(Ile364Leu)	Toléré (0,43)	Benigne (0,000)	3/26	
c.1091T>C	p.CYTB:(Ile364Thr)	Toléré (0,15)	Benigne (0,026)	1/26	
c.1102A>T	p.CYTB:(Thr368Ser)	Toléré (0,25)	Benigne (0,001)	1/26	
c.895C>T	p.CYTB:(Leu299Phe)	Deletere (0,03)	Probablement dommageable (0,999)	2/26	y
c.845G>A	p.CYTB:(Arg282Gln)	Deletere (0,03)	Probablement dommageable (0,999)	10/26	y
c.802A>G	p.CYTB:(Ile268Val)	Deletere (0)	Possible dommageable (0,698)	7/26	y
c.812A>G	p.CYTB:(Glu271Gly)	Deletere (0,01)	Probablement dommageable (0,999)	1/26	y
c.832T>C	p.CYTB:(Tyr278His)	Deletere (0)	Probablement dommageable (1)	1/26	

c.848C>T	p.CYTB:(Ser283Phe)	Deletere (0,02)	Probablement dommageable (1)	2/26	
c.857A>C	p.CYTB:(Asn286Thr)	Deletere (0,03)	Probablement dommageable (0,994)	1/26	
c.858C>A	p.CYTB:(Asn286Lys)	Toléré (0,29)	Probablement dommageable (0,999)	1/26	
c.818A>G	p.CYTB:(Tyr273Cys)	Deletere (0)	Probablement dommageable (1)	8/26	
c.1088T>G	p.CYTB:(Leu363Arg)	Deletere (0,05)	Probablement dommageable (0,999)	1/26	
c.789C>G	p.CYTB:(Asn263Lys)	Toléré (0,38)	Benigne (0,156)	7/26	y
c.1103C>A	p.CYTB:(Thr368Asn)	Toléré (0,14)	Benigne (0,036)	2/26	y
c.800A>C	p.CYTB:(His267Pro)	Deletere (0,04)	Probablement dommageable (0,989)	1/26	y
c.794C>A	p.CYTB:(Pro265His)	Deletere (0,01)	Probablement dommageable (1)	3/26	y
c.803T>G	p.CYTB:(Ile268Ser)	Deletere (0)	Probablement dommageable (0,996)	1/26	
c.801C>A	p.CYTB:(His267Gln)	Deletere (0,05)	Probablement dommageable (0,972)	1/26	y
c.1096A>T	p.CYTB:(Met366Leu)	Toléré (1)	Benigne (0,008)	1/26	
c.1098A>C	p.CYTB:(Met366Ile)	Toléré (0,34)	Benigne (0,006)	1/26	
c.782C>T	p.CYTB:(Pro261Leu)	Deletere (0)	Probablement dommageable (1)	1/26	
c.812A>C	p.CYTB:(Glu271Ala)	Deletere (0,03)	Probablement dommageable (0,994)	1/26	
c.828C>A	p.CYTB:(Phe276Leu)	Deletere (0)	Probablement dommageable (0,998)	1/26	
c.841C>A	p.CYTB:(Leu281Ile)	Deletere (0,05)	Possible dommageable (0,608)	1/26	
c.842T>A	p.CYTB:(Leu281His)	Deletere (0)	Probablement dommageable (0,999)	1/26	
c.856A>C	p.CYTB:(Asn286His)	Deletere (0,03)	Probablement dommageable (0,999)	1/26	
c.868G>C	p.CYTB:(Gly290Arg)	Deletere (0,04)	Probablement dommageable (1)	1/26	
c.884T>G	p.CYTB:(Leu295Trp)	Deletere (0,01)	Probablement dommageable (0,997)	1/26	Y

TABLE DES MATIERES

DEDICACE ..... **I**
REMERCIEMENTS ..... **II**
LISTE DES TABLEAUX ..... **IV**
LISTE DES FIGURES ..... **IV**
INTRODUCTION GENERALE **1**
CHAPITRE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE **4**
I.1. Rappels : Le sein 5
I.1.1. Histoire naturelle des cancers 5
I.1.2. Anatomie du sein 5
I.1.3. Physiologie du sein 7
I.2. Exemple du cancer du sein 7
I.2.1. Définition 7
I.2.2. Typologie des cancers du sein 8
I.2.3. Classification des tumeurs malignes 9
I.3. Facteurs de risque 9
I.4. Mutations et Cancer 11
I.5. ADN Mitochondrial et Cancérogenèse 12
CHAPITRE II. MATERIELS ET METHODES **14**
II.1. Population d'étude 15
II.2. Etude génétique 15
II.2.1. Extraction d'ADN des tissus 15
II.2.2. Choix du gène cytochrome b et Polymérase Chain Reaction (PCR) 16
II.2.2.1. Choix du gène cytochrome b 16
II.2.2.2. Amplification du gène cytochrome b 17
II.2.3. Séquençage 18
II.3. Analyse génétique 18
II.3.1. Recherche de mutations 18
II.3.2. Analyses moléculaires 19
II.3.2.1. Alignement des séquences 19
II.3.2.2. Variabilité génétique 19
II.3.2.3. Différenciation et structuration génétique 20
II.3.2.4. Tests démo-génétiques 21

CHAPITRE III. RESULATS ET DISCUSSION 22
III.1. Résultats 23
III.1.1. Nature et position des variantes 23
III.1.1.1. Variant connus du gène cytochrome b chez les tissus témoins 23
III.1.1.2. Variants connus du gène cytochrome b chez les tissus cancéreux 24
III.1.1.3. Variabilité et diversité génétique 25
III.1.1.4. Fréquence en acides amines 26
III.1.1.5. Test de sélection 27
III.1.1.6. Paramètres de différenciation et structuration génétique 27
III.1.1.7. Analyse de l'évolution démographique 28
III.1.1.7.1. Tests démo-génétiques 28
III.1.1.7.2. Analyse de mismatch distribution 29
III.2. DISCUSSION 30
CONCLUSION 34
REFERNCES BIBLIOGRAPHIQUES 36
ANNEXES

Caractérisation génétique des mutations du *cytochrome b* dans l'occurrence du cancer du sein au Sénégal.

RESUME

Le cancer du sein est la tumeur du sein la plus fréquente chez les femmes. Cette étude visait à contribuer à la recherche sur la prévalence des mutations du gène *cytochrome b* dans le cancer du sein chez les femmes sénégalaises. Le logiciel Alamut-visual, au sein duquel est incorporé les logiciels de prédiction de la pathogénicité SIFT, Polyphen2 et MutationTaster, a été utilisé pour la recherche des mutations. Les logiciels DnaSP version 5.10.01, MEGA version 7.0.14 et Arlequin version 3.5.1.3 ont été utilisés pour déterminer les paramètres phylogénétiques incluant les indices de variabilité et de diversité génétique et les paramètres de différenciation et structuration génétique. Les variants délétères retrouvés le plus fréquemment chez les tissus cancéreux sont : c.845G>A (38,46%), c.802A>G (26,92%) et c.818A>G (30,77%). Ils ont la probabilité de causer l'apparition du cancer du sein selon les deux logiciels de prédiction de la pathogénicité à savoir SIFT et Polyphen2. La distribution de la fréquence des acides aminés entre tissus témoins et tissus cancéreux montre une différence statistiquement significative de l'histidine, de la glutamine et la proline entre les témoins et les tissus. Le codon 74 étant sous sélection positive pourrait être utilisé comme un biomarqueur dans les cancers du sein.

Mots clés: Mutations, Cytochrome B, Variabilité, Cancer, Sein, Sénégal.

ABSTRACT

Breast cancer is the most common breast tumor in women. This study aimed to contribute to research on the prevalence of *cytochrome b* gene mutations in breast cancer in Senegalese women. The Alamut-visual software, which incorporates the pathogenicity prediction software SIFT, Polyphen2 and MutationTaster, was used to search for the mutations. DnaSP version 5.10.01, MEGA version 7.0.14 and Arlequin version 3.5.1.3 software were used to determine phylogenetic parameters including indices of genetic variability and diversity and genetic differentiation and structuring parameters. The deleterious variants most frequently found in cancerous tissues are: c.845G>A (38.46%), c.802A>G (26.92%) and c.818A>G (30.77%). They have the probability of causing the appearance of breast cancer according to the two pathogenicity prediction softwares namely SIFT and Polyphen2. The amino acid frequency distribution between control and cancerous tissues shows a statistically significant difference in histidine, glutamine and proline between controls and tissues. Codon 74 being under positive selection could be used as a biomarker in breast cancer.

Key words: Mutations, Cytochrome B, Variability, Cancer, Breast, Senegal.