



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature
et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques

Référence / 2021

MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité : Biochimie Appliquée

Présenté et soutenu par :
Yahiaui Manel Rafai rofaida

Le : samedi 3 juillet 2021

Mutation du gène suppresseur du tumeur p53 et cancer du sein chez la population Algérienne

Jury :

M.	Sara SALAH REDOUNE	MAA	Université de Biskra	Président
Mlle.	Hanane ACHOUR	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
M.	Tarek BENMEDDOUR	MAA	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2021

Remerciements

En guise de reconnaissance, je tiens à témoigner mes sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de mon stage de fin d'étude et à l'élaboration de ce modeste travail.

Mes sincères gratitude à Mme ACHOUR Hanane pour la qualité de son enseignement, ses conseils et son intérêt incontestable qu'il porte à tous les étudiants.

Dans l'impossibilité de citer tous les noms, nos sincères remerciements vont à tous ceux et celles, qui de près ou de loin, ont permis par leurs conseils et leurs compétences la réalisation de ce mémoire.

Dédicaces

A nos chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études,

A nos chères sœurs pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral,

A nos chers frères, pour leur appui et leur encouragement,

A toute nos familles pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infallible,

Merci d'être toujours là pour nous.

Rofaida et Manel

Sommaire

Liste des tableaux.....	I
Liste des figures.....	II
Liste des abréviations.....	III
Introduction.....	1

Partie bibliographique

Chapitre 1 : Glande mammaire

I. Situation de la glande mammaire.....	3
II. Structure de glandes mammaires.....	3

Chapitre 2 : Cancer du sein

I. Introduction.....	5
II. Classification des cancers du sein.....	5
II.1 Classification TNM.....	5
II.2 Classification par stade UICC.....	6
II.3 Classification histologique de cancer.....	6
III. Type de cancer du sein.....	7
IV. Les facteurs de risques.....	8

Chapitre 3 : Gène P53

I. Location du gène p53.....	9
II. Produit de gène p53.....	9
III. Fonctions cellulaires de p53.....	10
IV. Régulation de p53.....	11
V. Mutation du gène p53.....	13

Partie Pratique

Chapitre 4 : Matériels Et Méthodes

I. Matériels.....	14
II. Méthodes.....	15
II.1 Préparation des échantillons biologiques.....	15
II.1.1 Tissu mammaire conservé.....	15

II.1.2 Sang frais.....	16
II.2 Extraction de l'ADN génomique.....	16
II.2.1 Population Algérienne.....	16
II.2.2 Population marocaine.....	17
II.2.3 Population Tunisienne.....	18
II.3 Détermination de la concentration de l'ADN.....	19
II.4 Les méthodes identifications de mutation du gène p53 :.....	19
II.4.1 Population Algérienne.....	19
II.4.2 Population Marocaine	23
II.4.3 Population Tunisienne.....	24

Chapitre 5 : Résultats Et Discussion

I. Population algérienne.....	25
I.1 Analyse des produits PCR obtenus	25
II. Population Marocaine.....	29
III. Population Tunisienne.....	30
I. Discussion analytique	32
I.1 Choix d'Echantillons.....	32
I.2 Choix de protocole d'extraction.....	32
I.2.1 Méthode Phénol/Chloroforme	32
I.2.2 Méthode utilise des solvants non organiques (Salting out)	33
III. Discussion des résultats.....	34
Conclusion.....	38
Bibliographie.....	38
Les résumés	

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification par stade UICC.....	6
Tableau 2. La description de chaque grade du cancer du sein.....	7
Tableau 3. Le pléomorphisme nucléaire et degré de changement de la taille et la forme du noyau des cellules tumorales.....	7
Tableau 4. Caractéristiques des échantillons étudiés.....	16
Tableau 5. Amorces sens et antisens utilisées pour l'amplification par PCR de différentes séquences cibles de gène p53	21
Tableau 6. Programme d'amplification par PCR des séquences cibles contenant les codons étudiés.....	22
Tableau 7. Analyse mutationnelle des 4 codons "hot spots" (175, 248, 249 et 273) par les enzymes de restriction, informations générales.....	23
Tableau 8. Distribution génotypique du polymorphisme TP53 Arg72Pro chez les patientes atteintes d'un cancer du sein et les témoins sains selon les caractéristiques Clinico-pathologiques.....	31
Tableau 9. Fréquence génotypique et allélique de polymorphisme G251C p53(Arg/Pro).....	31
Tableau 10. La différence entre les trois techniques d'extraction d'ADN.....	34

Listes des figures

Figure 1. Coupe sagittale du sein et de la paroi thoracique.....	3
Figure 2. L'épithélium bicouche des glandes mammaires	4
Figure 3. Incidence standardisée du cancer du sein dans le monde en fonction de l'âge pour 100000 habitants	5
Figure 4. Carte de la région commune de délétion 17p dans les tumeurs colorectales.....	9
Figure 5. Le gène p53.....	9
Figure 6. Structure de protéine p53 – TP53(protéine tumorale p53).....	10
Figure 7. Schéma simplifié du réseau de régulation central de la voie p53.....	13
Figure 8. Analyse des produits de PCR obtenus après électrophorèse sur gel d'agarose à 3,5% et coloration au BET suivie d'une visualisation sous UV. M : marqueur de poids moléculaire (1 kb, Sigma). TN : témoin négatif.....	26
Figure 9. Profil électrophorétique des produits de PCR (105 pb de l'exon 5 du gène p53) et de leurs produits de digestion, séparés sur un gel d'agarose à 4%, après coloration au BET et visualisation sous UV. D : Digéré. ND : Non Digéré. M : Marqueur de poids moléculaire (1kb, Sigma). TN : témoin négatif.....	27
Figure 10. Profil électrophorétique du "hot spot" 248 montrant les fragments obtenus après digestion par l'enzyme MspI. M : poids moléculaire.....	28
Figure 11. Profil électrophorétique des produits de PCR (158 pb du codon 249) et de leurs produits de digestion, séparés sur un gel d'agarose à 4%, après coloration au BET et visualisation sous UV. M : Marqueur de poids moléculaire (1kb, Sigma).....	29
Figure 12. Profil RFLP du codon 273 en présence de l'enzyme BstUI. Une électrophorèse sur gel d'agarose (4%) des produits digérés par l'enzyme BstUI, après coloration au BET et visualisation sous UV. M : poids moléculaire (1Kb, Sigma).....	30

Liste des abréviations

A : Adénine

ADN : acide désoxyribonucléique

ANDases: Nucléase de l'ADN

BET:Bromure d'éthidium

[C]:Concentration

C:Cytosine

CTD : Carboxy-Terminal Domain (Domaine réglementaire Carboxy-Terminal)

PCR : Polymerase Chain Reaction

DO:Densité Optique

EDTA : Acide éthylène-diamine-tétraacétique

G:Guanine

H : Hydrogène

HCl: Acide chlorhydrique

NaCl : Chlorure de sodium

NaOH : hydroxyde de sodium

P : puretés

pb:Paires de bases

pH:Potentiel d'hydrogène

T:Thymine

SDS : dodecyl sulfate de sodium

UV : ultraviolet

TNM tumeur ganglionnaire métastases

cTNM : clinique tumeur ganglionnaire métastases

pTNM : anatomopathologique tumeur ganglionnaire métastases

M : Métastase

UICC : Union internationale contre le cancer

P53 : Protéine 53

TP53 : Protéine tumorale 53

Mdm2 : Murine double minute 2

Introduction

Le cancer du sein est la deuxième cause de décès par cancer chez les femmes. Le développement du cancer du sein est un processus en plusieurs étapes impliquant plusieurs types de cellules, et sa prévention reste un défi dans le monde. Au cours de la dernière décennie, de grands progrès ont été réalisés dans la compréhension du cancer du sein ainsi que dans le développement d'approches préventives. La pathogenèse et la résistance aux médicaments tumeurs sont révélées grâce à la découverte de cellules souches du cancer du sein, et de nombreux gènes associés au cancer du sein ont été découverts, dont le gène p53.

Le p53 est un gène suppresseur de tumeur essentiel à la prévention du développement du cancer. Ce gène est couramment muté pour causer de nombreux cancers, y compris le cancer du sein. En réponse à un oncogène ou autre stress cellulaire, p53 est activé et induit une régulation à la hausse ou à la baisse d'une variété de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la sénescence ou l'apoptose. L'activité transcriptionnelle de p53 est étroitement contrôlée et toute mutation au niveau de ce gène entraîne un défaut dans ses nombreuses fonctions. Bien qu'il y ait beaucoup de recherches et d'informations sur ce gène, la compréhension de ses fonctions, l'effet de sa mutation, et sa relation avec le cancer ou l'aide à son développement, est encore un peu mystérieuse. Et le fardeau mondial accru des tumeurs mammaires mutées par p53 a ouvert la voie à diverses thérapies ciblant p53/TP53. En étudiant ce gène et en découvrant les types de mutations à son niveau, à travers de nombreuses techniques de biologie moléculaire.

Pour achever ces objectifs, il faut d'abord répondre aux problématiques suivantes :

- Quelle est la relation entre la mutation du gène 53 et le cancer du sein ?
- Comment les mutations sont-elles identifiées au niveau des gènes ?
- Quelles sont les techniques les plus utilisées et les plus précises pour détecter les mutations ? Peut-on détecter de nouvelles mutations pour le diagnostic précoce du cancer du sein ?

Dans notre travail, nous répondrons aux problématiques présentés en deux parties :

Une partie bibliographique subdivisée en trois chapitres, le premier va consacrer à l'anatomie et histologie de la glande mammaire. Le deuxième va étudier le cancer du sein en

général, sa classification, ses types et les facteurs de risque. Le troisième va traiter le gène p53 avec tous ses aspects liés à la localisation du gène et de son produit (p 53) et sa mutation.

Une deuxième partie est la partie expérimentale, contenant deux chapitres où nous étudierons des cas de cancer du sein dans trois régions (Algérienne, Tunisienne et Marocaine), un chapitre « Matériel et méthodes » présente les cas étudiés, les protocoles à appliquer, les matériaux utilisés dans ceux-ci, les méthodes choisies pour le contrôle qualité et la quantité d'ADN obtenue. De plus, un autre chapitre « Résultats et discussion » qui va présenter les résultats obtenus dans chaque cas et les comparera pour obtenir la technique optimale

Partie bibliographique

Chapitre 1

Glande mammaire

Situation de la glande mammaire

Le sein est un organe globuleux et pair contenant la glande mammaire. Les 2 seins occupent la partie antéro-supérieure du thorax, de part et d'autre du sternum, plus ou moins symétrique, en avant des muscles pectoraux, en regard de l'espace compris entre les arcs antérieurs des 3ème et 7èmes côtes, le mamelon se projetant à la 9ème vertèbre dorsale. En position debout, le sein tombe légèrement sous l'influence de son propre poids, ce qui forme alors le sillon infra-mammaire avec la paroi thoracique.

Structure de glandes mammaires

La structure du sein est très complexe (voir figure suivante) (**Fig1**)

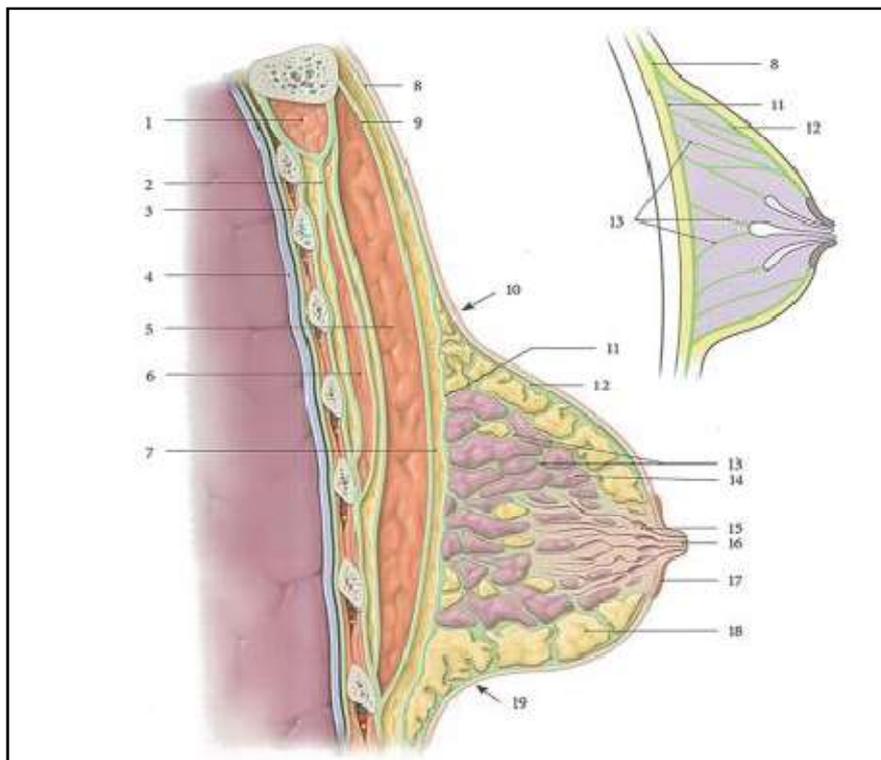


Figure 1. Coupe sagittale du sein et de la paroi thoracique (Kamina, 2011).

- | | | |
|---------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| 1. M. Subclavier | 6. M. Petit pectoral | 10. Sillon supra-mammaire |
| 2. Fascia clavi-pectoral | 7. Espace rétro-mammaire | 11. Fascia rétro-mammaire |
| 3. Fascia endo-thoracique | 8. Fascia thoracique superficiel | 12. Fascia pré-mammaire |
| 4. Plèvre pariétale | 9. Fascia pectoral | 13. ligg. suspenseurs du sein |
| 5. M. Grand pectoral | | |

14. Lobule mammaire

16. Papille

18. GraissePrémammaire

15. Sinus lactifère

17. Aréole

19. Silloninframammaire

L'épithélium des glandes mammaires est une structure se ramifiant à partir du mamelon en canaux galactophores se terminant en lobes (Figure 2A). Chacun de ces lobes est constitué de plus petites sous-unités, les lobules, eux-mêmes constitués d'alvéoles (ou *acini*), l'unité sécrétrice du lait (Figure 2B). Cet épithélium est composé d'une couche interne de cellules luminales et d'une couche externe de cellules basales (Figure 2C). L'épithélium mammaire comporte également des populations de cellules souches et de cellules progénitrices participant au maintien du tissu. L'épithélium mammaire est supporté et est nourri par le stroma (Figure 2A) (Mélanie, 2018).

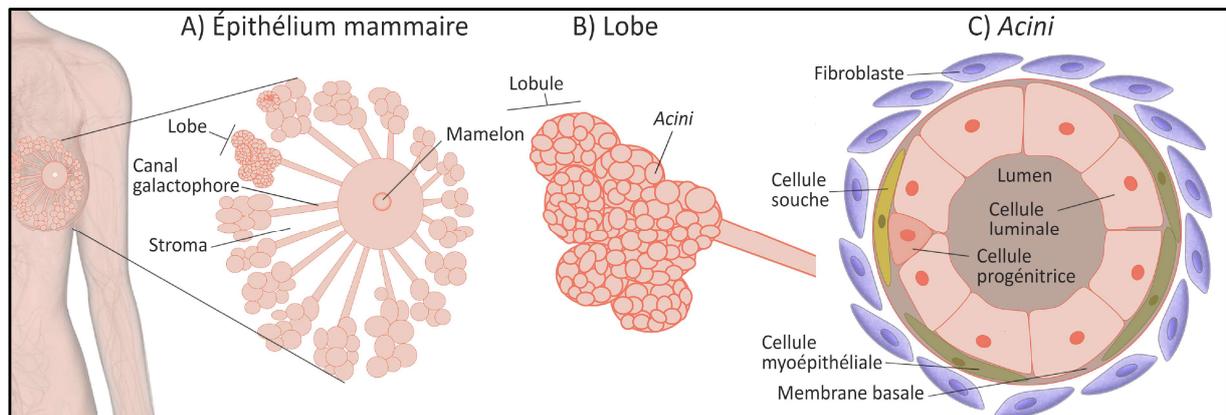


Figure 2. L'épithélium bicouche des glandes mammaires (Mélanie, 2018).

Chapitre 2

Cancer du Sein

I. Introduction

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez les femmes, comptant pour 25% des cancers féminins et affectant ainsi une femme sur huit, avec plus de 2 millions de nouveaux cas diagnostiqués dans le monde en 2018 (Bray, I, RL, LA, & A, 2018)

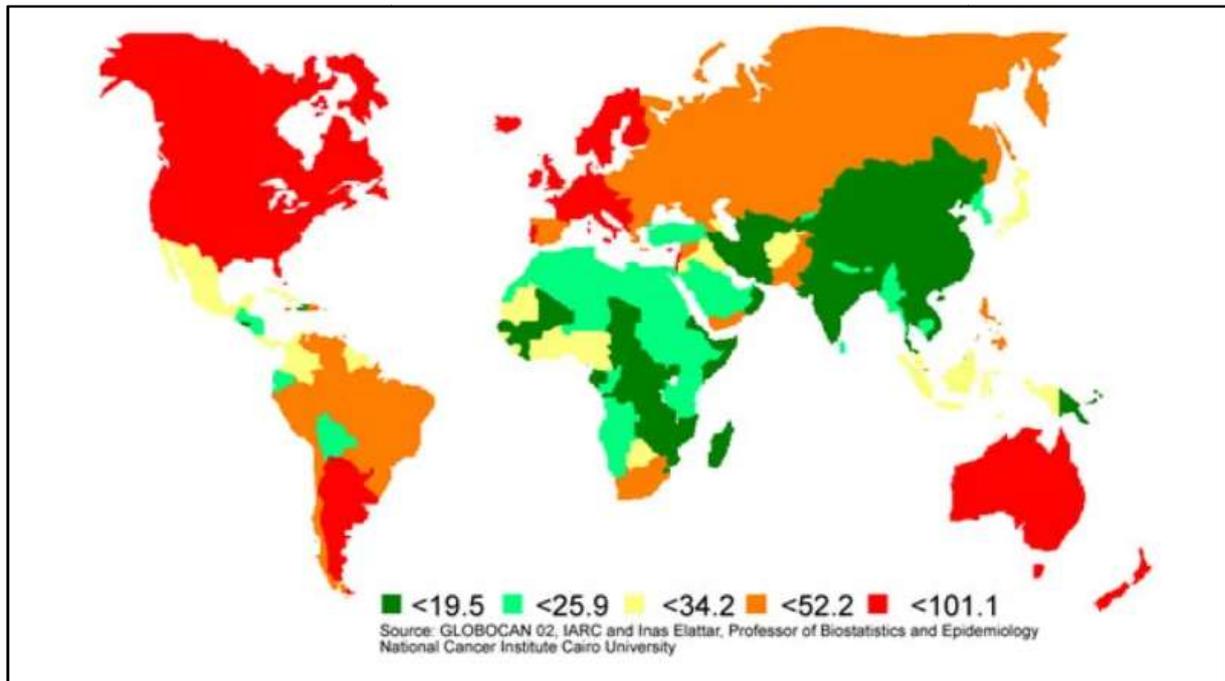


Figure 3. Incidence standardisée du cancer du sein dans le monde en fonction de l'âge pour 100000 habitants. (Mandal, 2019)

II. Classification des cancers du sein

II.1. Classification TNM :

La classification TNM est la plus fréquemment utilisée, elle repose sur 3 critères

- « **T** » pour la **taille** et l'infiltration de la tumeur, allant de Tx (tumeur non évaluable) à T4.
- « **N** » pour le degré d'envahissement des **ganglions** lymphatiques, allant de Nx (envahissement des ganglions non évaluable) à N3.
- « **M** » pour la présence ou non de **métastases** à distance ; avec Mx (renseignements insuffisants pour classer les métastases), M0 (absence de métastase) ou M1 (présence de métastases). (Penault-Llorca, et al., 2013)

Le système TNM distingue le stade clinique pré-thérapeutique noté "cTNM" et le stade anatomopathologique post chirurgical noté "pTNM". (Classification TNM du cancer du sein, 7e édition et stade UICC, 2010)

II.2. Classification par stade UICC

Tableau 1. Classification par stade UICC.

Stades UICC	Classifications TNM englobées
Stade 0	Tis N0 M0
Stade I	T1 N0 M0
Stade II A	T0 N1 M0 ; T1 N1 M0 ; T2 N0 M0
Stade II B	T2 N1 M0 ; T3 N0 M0
Stade III A	T0 N2 M0 ; T1 N2 M0 ; T2 N2 M0 ; T3 N1 M0 ; T3 N2 M0
Stade III B	T4 N0 M0 ; T4 N1 M0 ; T4 N2 M0
Stade III C	Tous T N3 M0
Stade IV	Tous T Tous N M1

II.3. Classification histologique de cancer

Le système de classification histologique le plus souvent employé pour les cancers du sein qui se sont propagés aux tissus voisins, soit des cancers infiltrants(**tab.3**), se base sur 3 caractéristiques des cellules de la tumeur qui les différencient des cellules saines

- La formation de tubules, qui indique le pourcentage des cellules tumorales qui contiennent des structures en forme de tubes appelées tubules ;
- Le pléomorphisme nucléaire, qui indique jusqu'à quel point le noyau de chaque cellule cancéreuse diffère de celui des cellules normales
- La fréquence des mitoses, qui indique le nombre de cellules qui se divisent activement dans la tumeur. (Tavassoéli F.A, 2003)

Cette classification histologique se base sur 3 caractéristiques différentes des cellules de la tumeur. Il est assigné à chacune de ces caractéristiques un score de 1 à 3. (Bresson & Lieber, 2006)

Tableau 2. La description de chaque grade du cancer du sein. (Fakia & Khaldia, 2014)

Grade	Score totale	Description
1 (bas)	3 à 5	Les cellules cancéreuses sont bien différenciées. Elles ont presque l'air de cellules normales.
2 (intermédiaire)	6 ou 7	Les cellules cancéreuses sont modérément différenciées. Elles se classent entre le grade 1 et le grade 3.
3 (haut)	8 ou 9	Les cellules cancéreuses sont peu différenciées ou indifférenciées. Leur apparence est moins normale, ou plus anormale, que celle des cellules saines

Tableau 3. Le pléomorphisme nucléaire et degré de changement de la taille et la forme du noyau des cellules tumorales. (Jean Paul Ndamba Engbang, 2015)

Grade	Description
1 (bas)	Le noyau de chaque cellule cancéreuse est de taille petite à moyenne et les noyaux de toutes les cellules cancéreuses ont la même forme. Il n'y a pas de nécrose dans l'échantillon.
2 (intermédiaire)	Le noyau de chaque cellule cancéreuse est de taille petite à moyenne et les noyaux de toutes les cellules cancéreuses ont la même forme. On observe quelques petites régions de nécrose dans l'échantillon.
3 (haut)	Le noyau de chaque cellule cancéreuse est de grande taille et les noyaux de toutes les cellules cancéreuses sont de forme inégale. On peut observer une nécrose dans l'échantillon.

III. Type de cancer du sein

Les divers types de cancers du sein évoluent de façon différente :

Cancer non invasif ou non infiltrants :

- **Carcinome canalaire *in situ*** : C'est le type le plus fréquent de cancer du sein non invasif chez la femme. Comme son nom l'indique, il se forme à l'intérieur des canaux de lactation du sein.

- **Cancers invasifs ou infiltrants :**

Ces formes de cancer envahissent les **tissus** autour des canaux de lactation, mais demeurent à l'intérieur du sein. Par contre, si la tumeur n'est pas traitée, elle peut se disséminer à d'autres parties du corps (par exemple, les os, les poumons ou le foie) en générant des métastases.

- **Carcinome canalaire, Carcinome lobulaire, Carcinome inflammatoire, et des Autres carcinomes** (médullaires, colloïdes ou mucineux, tubulaires, papillaires,) qui sont plus rares. (M Espié, 2012)

IV. Les facteurs de risques

Les quatre principaux facteurs de risque de cancer du sein sont :

- L'âge : l'incidence augmente après 30 ans avec un pic entre 50 et 74 ans ;
- Les antécédents personnels de certaines maladies cancéreuses (par exemple, cancer du sein, de l'ovaire et/ou de l'endomètre)
- Les antécédents familiaux de cancers liés (sein, ovaire, ...)
- Les prédispositions génétiques au cancer du sein. (Z. El Hanchi *, 2003)

D'autres facteurs ont également été identifiés :

- Certains traitements hormonaux de la ménopause. (Z. El Hanchi *, 2003)
- La consommation de tabac et d'alcool. (P. Merviel, 2011)
- L'obésité et le surpoids ainsi que l'activité physique limitée ou inexistante. (H. Drissi, 2016)
- Cancer du sein et ses facteurs de risque (étude cas-témoin). (H. Drissi, 2016)
- Les facteurs hormonaux endogènes : une ménarche précoce (avant 12 ans), l'anulliparité, une 1ère grossesse tardive (après 30 ans), l'absence d'allaitement, une ménopause tardive. (koulal, et al., 2020).

Chapitre 3

Gène p53

I. Location du gène p53

Le gène p53 humain est situé sur le chromosome 17q13. Il englobe 20 kb d'ADN avec 11 exons qui lors de la transcription donnent ARNm de 3,0 kb ayant un cadre de lecture ouvert de 1179 pb. Lors de la traduction, cet ARNm produit une protéine de 53 kDa (d'où le nom p53). (GEORGE, 2011)

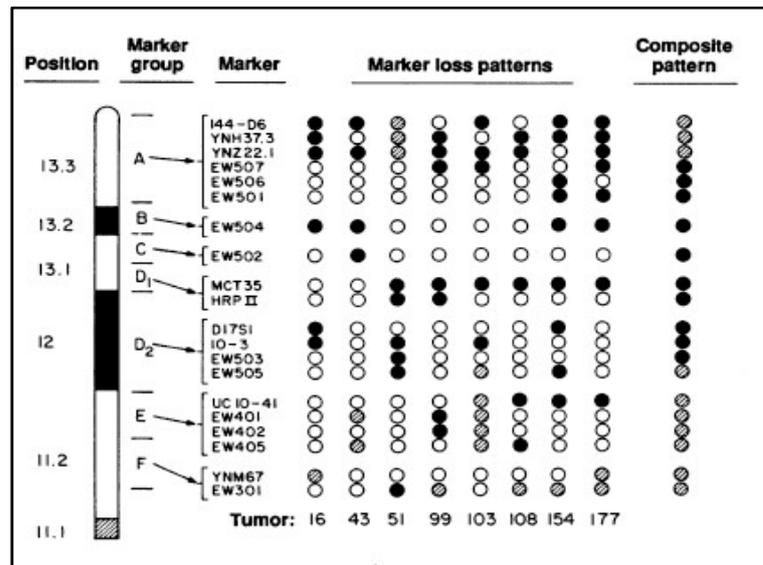


Figure 4. Carte de la région commune de délétion 17p dans les tumeurs colorectales (*Wei Zhang, 2011*)

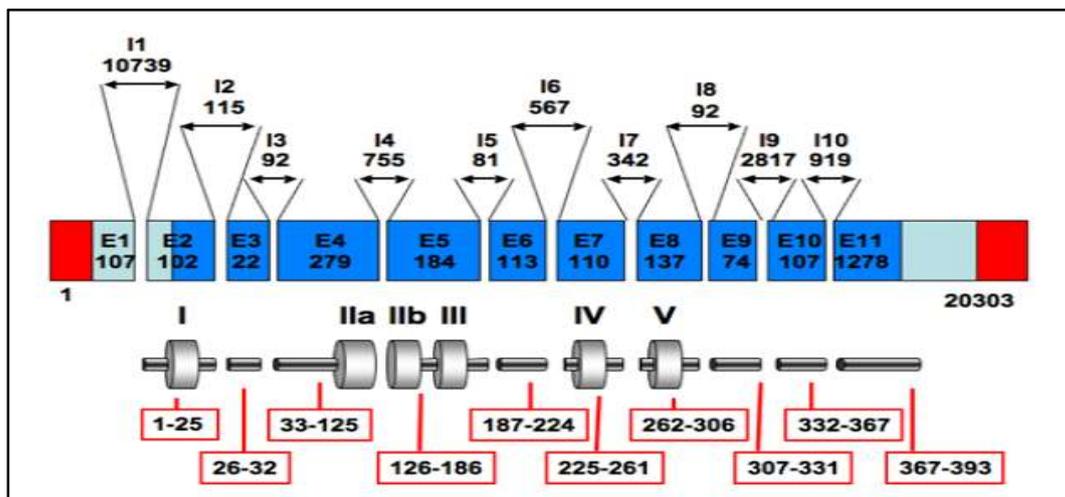


Figure 5. Le gène p53. (GEORGE, 2011)

Produit de gène p53

La protéine p53 est un polypeptide de 393 résidus et forme N-terminal à C-terminal. Il

Contient cinq domaines fonctionnels (GEORGE, 2011)

1. Domaine N-terminal (résidus 1 à 43) qui est impliqué dans l'activation transcription
2. Un domaine riche Proline (63-97) Mdm2 se lie à ces deux domaines.
3. Le grand domaine central (résidus 100 à 300) qui implique la liaison à l'ADN, et est l'emplacement de presque toutes les mutations oncogéniques p53.
4. Le domaine d'oligomérisation (résidus 320-360) contient des signaux de localisation nucléaire et il est impliqué dans la tétramérisation de p53. (Daniela Kandioler-Eckersberger, 2000)
5. Le domaine C-terminal basique (résidus 364-393) est un domaine régulateur négatif qui peut inhiber la liaison d'ADN spécifique à la séquence par le domaine central.
6. Les agents qui endommagent l'ADN induisent p53 à devenir très stable par un mécanisme post-traductionnel, permettant à sa concentration dans le noyau d'augmenter considérablement. (Noa Rivlin, 2011)

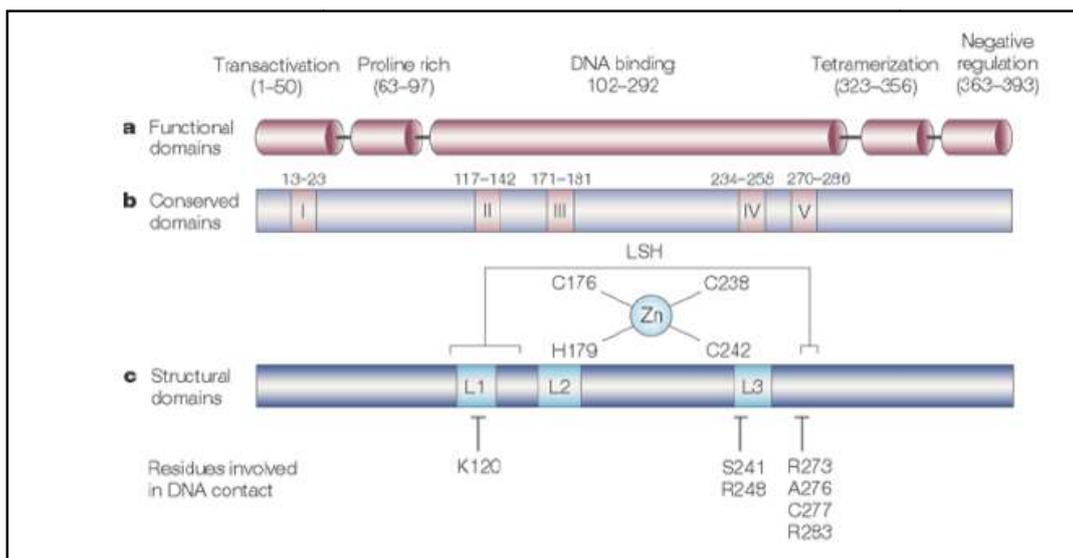


Figure 6. Structure de protéine p53 – TP53 (protéine tumorale p53). (George, 2011)

Fonctions cellulaires de p53

- Supprime la progression à travers le cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN, en permettant à la réparation de l'ADN de se produire avant de répliquer le génome ; par conséquent, p53 empêche la transmission d'informations génétiques endommagées d'une génération cellulaire à l'autre. Il le fait en se liant à un facteur de transcription appelé E2F. Cela empêche E2F de se lier aux promoteurs de proto-

oncogènes tels que c-myc et c-fos. La transcription de c-myc et c-fos est nécessaire pour que la mitose bloque le facteur de transcription nécessaire pour activer ces gènes empêche la division cellulaire. (Shunsuke Kato, 2003)

- Déclenche l'apoptose si les dommages à la cellule sont graves et agit comme un frein d'urgence sur le développement du cancer en tuant les cellules qui tentent de proliférer dans les régions carencées en oxygène des tumeurs. (Shunsuke Kato, 2003)
- Gène p53 est un puissant facteur de transcription et une fois activé, il réprime la transcription d'un ensemble de gènes (dont plusieurs sont impliqués dans la stimulation de la croissance cellulaire) tout en stimulant l'expression d'autres gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire. (Sumit Kumar, 2014)
- Parmi eux, p21 est l'un des plus importants. Le produit du gène p21 est un régulateur négatif des kinases dépendantes de la cycline, des enzymes qui sont essentielles à la progression du cycle cellulaire et finalement à la division cellulaire. En stimulant la transcription du cycle cellulaire et finalement la division cellulaire. En stimulant la transcription du gène p21, p53 empêche la prolifération cellulaire. Cet arrêt donne à la cellule la possibilité d'effectuer des réparations, si possible. Si des dommages importants à l'ADN se sont produits, cela peut aider à déclencher la mort cellulaire.(WALDEMAR LUTZ ,2002)

Régulation de p53

Une régulation stricte de la fonction de p53 est critique pour la croissance et le développement normal des cellules, et un mécanisme par lequel la fonction de p53 est contrôlée est par l'interaction avec la protéine Mdm2(JohnW. Littlefield, April 4, 1990)(Suzanne J.et al, Apr. 14, 2007).

Les niveaux endogènes de Mdm2 sont suffisants pour réguler la stabilité de p53, et une surexpression de Mdm2 peut réduire la quantité de p53 endogène. Parce que mdm2 est activé par la transcription p53, cette voie de dégradation peut contribuer au maintien de faibles concentrations de p53 dans les cellules normales (Yusuke Nakamura,etal ,January 2004)

En outre, les mécanismes régulant la dégradation induite par Mdm2 de p53 peuvent jouer un rôle dans le contrôle de l'étendue et de la durée de la réponse p53. (DR. PHILOMENA GEORGE, 2011).

Dans les cellules normales, la p53 est présente à des niveaux extrêmement bas car la protéine se dégrade très rapidement après la synthèse. La régulation de la stabilité des protéines est un mécanisme courant par lequel la fonction des protéines régulatrices de la croissance cellulaire est contrôlée et p53, comme de nombreuses autres protéines, est ciblée pour la dégradation par le protéasome après l'ubiquitination. (Yusuke Nakamura., 2003.)(Andreas C. Joerger, 2008).

Cette forme de protéolyse implique un système d'enzymes qui conjuguent plusieurs chaînes d'ubiquitine aux lysines dans la protéine ciblée. Ces protéines poly ubiquitines sont ensuite reconnues et dégradées par le protéasome. L'attachement de l'ubiquitine aux protéines destinées à la dégradation dépend de trois activités ; E1, l'enzyme d'activation de l'ubiquitine, E2, l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine et E3, l'ubiquitine-ligase. Les ubiquitine-ligases comprennent un groupe important et diversifié de protéines, fonctionnant parfois dans de grands complexes multi protéiques, et ce sont les enzymes qui sont responsables de la détermination de la spécificité du substrat de la voie de l'ubiquitine. (Andreas C. Joerger, 2008).

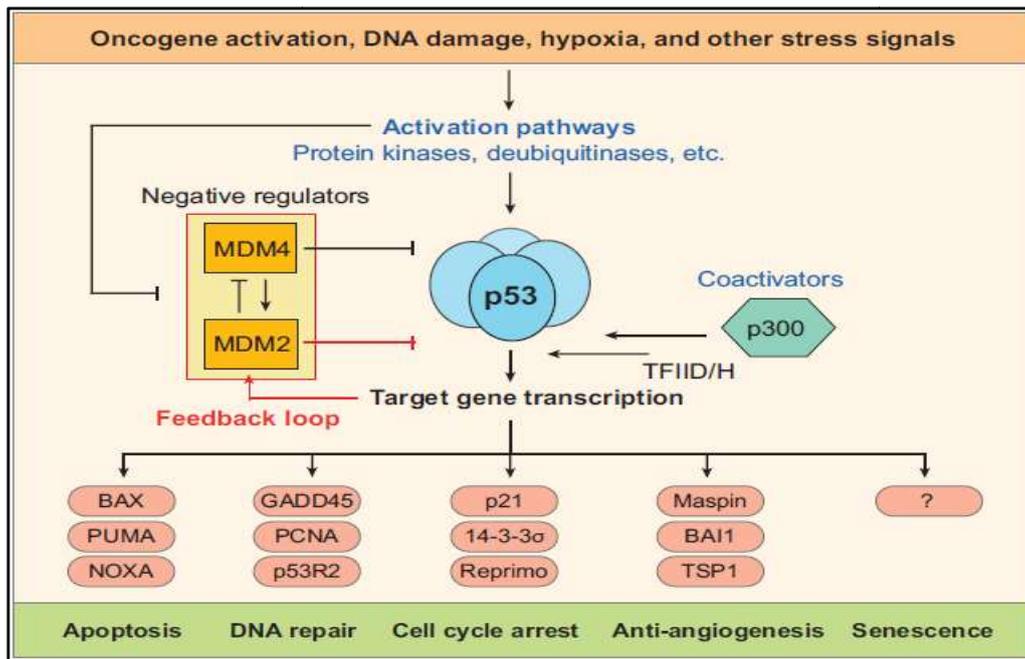


Figure 7. Schéma simplifié du réseau de régulation central de la voie p53 (Andreas C. Joerger, 2008).

Mutation du gène p53

Les mutations au sein du gène p53 sont le défaut génétique le plus fréquent (jusqu'à 50%) trouvé dans les cancers de tous types. La distribution de la mutation au sein du gène est irrégulière. Environ 300 mutations ponctuelles différentes ont été trouvées dans le gène p53, dont la majorité (98%) sont localisées dans les exons cinq à huit (codons 110 à 307). En comparant la fréquence et l'emplacement de la mutation dans le gène p53, cinq soi-disant points chauds ont été identifiés. Ils comprennent des codons : 132 à 143, 151 à 159, 172 à 179, 237 à 249 et 272 à 286. On a observé que plus de 70% de toutes les mutations du gène p53 se produisaient à ces endroits. (Andreas C. Joerger, 2008). Il a été trouvé que les mutations du gène p53 induites par les agents endogènes diffèrent de celles provoquées par les agents environnementaux. Les mutations qui se produisent aux points chauds ne sont pas tout aussi importantes pour le développement du cancer. La protéine p53 synthétisée sous le contrôle du gène p53 muté dans le codon 175 montre une activité trois à dix fois plus élevée pour la transformation du cancer que la protéine synthétisée sous le contrôle du gène p53 muté dans le codon 273 (Noa Rivlin, et al, 2011).

Partie Pratique

Chapitre 4

Matériels et Méthode

L'étude que nous avons menée est une étude analytique et comparative des résultats de recherche de mutation de gène p53 dans le cancer de sein chez trois populations différentes, la population Algérienne (ACHOUR, 2015), Tunisienne (ARFAOUI, et al., 2015) et Marocaine (Ayoubi, et al., 2018).

Dont l'étude de ACHOUR (2015) a été fait l'analyse mutationnelle de 4 hot spots de gène p53 (175, 248, 249 et 273) chez les femmes Algériennes. Alors que, les autres équipes ARFAOUI ont été recherché la mutation de codon 215 G>C de gène p53 chez la population Marocaine et la population Tunisienne.

II. Matériels

Dans l'étude de la population Algérienne, le matériel biologique été un tissu mammaire conservé dans le paraffinée fourni par le service d'anatomopathologie de CHU de Batna (Dr Khadraoui H.) alors que pour les autres études, le matériel biologique utilisé était le sang frais. Dont le prélèvement sanguin préconisé pour l'extraction de l'ADN est recueilli stérilement dans un tube en présence d'EDTA (**tab.4**).

L'étude de AYOUBI en 2018 a porté sur 251 femmes dont Le recrutement des malades a été effectué au niveau du Centre Mohammed VI de Traitement du Cancer du CHU Ibn Rochd de Casablanca Maroc.

L'équipe de ARFAOUI a fait sa recherche sur 334 femmes. Le groupe des patientes étaient recrutées dans l'Institut Salah Aziez Tunisie

Tableau 4. Caractéristiques des échantillons étudiés.

	Les cas	Moyend'âge	Les échantillons	Les références
Population Algérienne	30	46	Tissu conservé	(ACHOUR, 2015)
Population Marocaine	125	51	Sang frais	(Ayoubi, et al., 2018)

Population Tunisienne	175	47	Sang frais	(ARFAOUI, et al., 2015)
------------------------------	-----	----	------------	-------------------------

II. Méthodes

II.1 Préparation des échantillons biologiques

II.1.1 Tissu mammaire conservé

Selon ACHOUR Hanane en 2015 (ACHOUR, 2015), les tissus biopsies ou chirurgicalement excisés pour l'analyse et le diagnostic histopathologique sont souvent fixés au formol et inclus en paraffine pour le stockage à long terme. Les étapes de déparaffinage et de réhydratation sont nécessaires et indispensables, préalablement.

Le déparaffinage a été réalisé en présence du xylène et sous la hotte, comme suit (ACHOUR, 2015):

- Dans des tubes Eppendorf 1,5 ml, mettre les échantillons sous forme de pièces coupées par un microtome ;
- Ajouter 800 µl de xylène dans chaque tube ;
- Agiter par retournement pendant 15 min (grâce une plaque rotatoire) ;
- Centrifuger à la vitesse maximale (14000 tpm) pendant 2 min, éliminer le surnageant (paraffine dissous dans le xylène), sans perturber le culot cellulaire ;
- Répéter l'étape de déparaffinage par le xylène 2 fois supplémentaires pour enlever totalement la paraffine.

La réhydratation a été réalisée en trois étapes en utilisant des différentes concentrations d'alcool "éthanol" (100%, 70%, 50%) dont le volume d'alcool ajouté est proportionnel avec la quantité de culots cellulaires (ACHOUR, 2015):

- Vortexer puis centrifuger à 14000 tpm pendant 3 min ;
- Éliminer l'éthanol par pipetage ;
- Réhydrater les échantillons en ajoutant de l'éthanol à 70% puis à 50% (suivre les mêmes étapes que précédemment) ;
- Éliminer l'éthanol à 50 %. Les culots cellulaires ont été séchés en tubes renversés, à température ambiante, pendant 5 min

- Ajouter au culot cellulaire 600 µl d'éthanol 100 %.

II.1.2 Sang frais

L'équipe de (ARFAOUI, et al., 2015) a été prélevé cinq millilitres de sang veineux qui a été collecté dans un tube stérile contenant de l'EDTA et conservés à -80°C, pour une utilisation ultérieure (ARFAOUI, et al., 2015). Dont le choix de l'EDTA c'est pour inhiber l'action des enzymes nucléases et il permet ainsi de préserver l'intégrité de l'ADN (BENGUERAICHI, 2015)..

Et même l'équipe de (Ayoubi, et al., 2018) a utilisé le sang veineux pour extraire l'ADN génomique.

Avant d'extraire l'ADN génomique des leucocytes, le sang doit être initialement préparé, dont il faut éliminer les globules rouges par une lyse hypotonique. la préparation des échantillons de sang se fait selon les étapes suivantes (BENGUERAICHI, 2015).

Après décongélation au bain marie à 37°C, la lyse des globules rouges est réalisée en complétant le volume de sang avec une solution hypotonique TE 10/10 (Tris/HCl 10mM et EDTA 10mM ; pH = 8,0). Après lavage, les tubes sont mis dans la glace pendant 30 minutes (l'action conjuguée du Tris et du froid provoque un choc hypotonique conduisant à l'éclatement des globules rouges ayant une membrane fragile.) puis centrifugés à 2500 tours/min pendant 15min. La centrifugation, quant à elle permet de séparer le surnageant qui contient les débris de globules rouges des globules blancs qui sont précipités au fond du tube formant un culot. Cette opération de lavage est répétée plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'un culot blanchâtre qui correspond aux globules blancs (Ameziane, Bogard, & Lamoril, 2006).

II.2 Extraction de l'ADN génomique

L'extraction de l'ADN est une technique qui isole de l'ADN à partir d'une cellule en quantité et en qualité suffisante pour permettre son analyse. Il existe plusieurs techniques (protocoles classiques) utilisées pour l'extraction d'ADN, et même il y a des kits qui sont proposés par un certain nombre d'industriels.

II.2.1 Population Algérienne

ACHOUR Hanane (2015) a été effectué l'extraction d'ADN à partie des cellules déparaffinées et réhydratées au cours de l'étape précédente .Elle s'effectue en plusieurs étapes (selon le protocole de Pikor et *al* ; 2011) :

- Ajouter 315 µl de tampon de lyse (10 mM Tris pH = 7,5 ; 100 mM EDTA ; 50 mM NaCl) plus 5 µl de protéinase K (10mg/ml) aux culots cellulaires ;
- Incuber les tubes à 55°C pendant 1h 30 min avec vortex chaque 5 à 10min ;
- Laver par ajout de 100 µl de NaCl 6 M à chaque tube ;
- Vortexer pendant 6 min puis centrifuger à 13000 tpm pendant 10 min, à température ambiante ;
- Transférer minutieusement le surnageant contenant l'ADN, presque 250 µl/ tube dans un nouveau tube ;
- Ajouter 200µl d'isopropanol pour précipiter l'ADN ;
- Retourner et secouer les tubes afin de bien mélanger le contenu. A la fin, une pelote blanchâtre et compacte d'ADN est observée ;
- La pelote d'ADN a été culotée grâce à une centrifugation prolongée à vitesse maximale de 13000 tpm/10 min à température ambiante ;
- Enlever l'isopropanol par pipetage. Le culot d'ADN ne doit pas rester collé au fond du tube ;
- Ajouter 300 µl d'éthanol au culot d'ADN, mélanger ;
- Centrifuger quelques secondes ;
- Éliminer l'éthanol. Le culot d'ADN devra être séché à température ambiante pendant 30 min (tube renversé) ;
- Resuspendre l'ADN dans de l'eau distillée, grâce à l'ajout de 30 µl d'H₂O distillée. Une incubation à 55°C pendant 10 min ;
- L'ADN est ensuite quantifié, aliquote et conservé à -20°C jusqu'à usage ultérieur.

II.2.2 Population marocaine

L'équipe de (ACHOUR, 2015) a été réalisée l'extraction d'ADN selon la technique standard de salting-out (Technique au chlorure de sodium saturé). Cette technique permet le relargage des protéines à force ionique élevée.

La technique d'extraction d'ADN par le NaCl a été choisie en raison de sa rapidité, sa facilité ainsi que l'absence du risque d'intoxication par des produits dangereux tels que le phénol. Cette technique comporte les étapes suivantes :

❖ Lyse des globules blancs

Le culot de leucocytes est traité par 5ml de solution de lyse des globules blancs (Tris / HCl 10mM ; EDTA 0,1M et SDS 0,5% ; pH = 8,0). 100µl de protéinase K à 20 mg/ml sont additionnés pour digérer les protéines associées à l'ADN nucléaire. Après homogénéisation,

le mélange est incubé au bain-marie à 37°C pendant une nuit. L'EDTA est un chélateur d'ions bivalents inhibant l'activité des DNases et le SDS est un puissant détergent lysant les membranes cellulaires et dissociant les complexes d'acides nucléiques (Ameziane, Bogard, & Lamoril, 2006).

❖ **Précipitation de l'ADN**

La précipitation est réalisée par addition de l'éthanol moins polaire que l'eau. Il faut ajouter à un volume de solution, au moins deux volumes d'éthanol. Pour faciliter sa récupération (Aouf, 2005). Puis le précipité est séché. Le séchage est obligatoire pour éliminer l'éthanol qui pourrait empêcher la dissolution ultérieure du précipité. L'avantage de la technique est rapide, simple et non coûteuse (Suguna, Nandal, Kamble, Bharatha, & Kunkulol, 2014).

II.2.3 Population Tunisienne

Selon l'équipe de (ARFAOUI, et al., 2015) L'ADN génomique a été isolé à partir des cellules leucocytaires par la méthode conventionnelle phénol-chloroforme. Le phénol est un excellent agent dénaturant des protéines et il permet de séparer efficacement les protéines et les acides nucléiques (Lim, Song, Kim, Lee, & Nam, 2018).

❖ **L'extraction phénolique**

Elle est utilisée pour séparer les acides nucléiques des protéines dans la phase aqueuse après la centrifugation. Car le phénol est un déprotéinisant, dans lequel les acides nucléiques ne sont pas solubles (Kirby, 1957). Les protéines précipitent, elles sédimentent au fond de la phase aqueuse mais restent à l'interphase c'est-à-dire qu'elles restent à la surface de la phase phénolique qui est une phase hydrophobe. Les débris membranaires lipidiques vont aller dans la phase phénol hydrophobe (Yagi, Satonaka, Horio, Shimogaki, Tokuda, & Maeda, 1996).. Le phénol doit être très pur et saturé en tampon (pH 8 pour extraire l'ADN). L'inconvénient du phénol réside dans son caractère très corrosif, c'est donc un produit à manipuler avec précaution.

❖ **L'extraction au chloroforme**

Elle complète toujours l'extraction précédente pour éliminer toutes traces de phénol aqueux. Toute trace de phénol doit être éliminée pour permettre l'action ultérieure d'enzyme (de restriction par exemple) sur l'acide nucléique extrait. Le chloroforme est additionné

d'alcool isoamylique 3-méthyl-1-butanol = $[(CH_3)_2CHCH_2OH]$ qui est un agent déstabilisant de l'émulsion (stabilisant la séparation des phases) (Yagi, Satonaka, Horio, Shimogaki, Tokuda, & Maeda, 1996).

II.3 Détermination de la concentration de l'ADN

La concentration d'ADN extrait a été estimée par spectrophotométrie à 260 nm dans toutes les études.

On mesure donc à 260 nm et 280 nm la DO d'une dilution déterminé de la solution mère. On déduit la concentration de l'ADN grâce au calcul suivant :

$$[ADN] (\mu g / ml) = \text{Facteur de dilution} \times DO_{260 \text{ nm}} \times 50 \mu g / ml \text{ (ACHOUR, 2015).}$$

La pureté de l'ADN a été évaluée par mesure du rapport $DO_{260 \text{ nm}} / DO_{280 \text{ nm}}$ (l'ADN absorbe à 260 nm alors que les protéines absorbent à 280 nm). L'ADN est suffisamment pur lorsque le rapport $R = DO_{260}/DO_{280}$ est compris entre 1.8 et 2 ($1.8 < R \leq 2$). L'ADN est contaminé par les protéines si : $DO_{260}/DO_{280} < 1.8$. L'ADN est contaminé par les ARN si : $DO_{260}/DO_{280} > 2$.

II.4 Les méthodes identifications de mutation du gène p53 :

II.4.1 Population Algérienne

Selon l'étude de (ACHOUR, 2015) la détection des mutations de gène p53 a été fait par la méthode PCR-RFLP.

Au cours de la technique PCR, un fragment d'ADN précis autour du site de mutation est amplifié en de multiples copies par une polymérase à ADN et à l'aide de deux amorces spécifiques. Ces amorces sont complémentaires aux extrémités du fragment d'ADN à amplifier et s'hybrident chacune à un brin différent de la molécule matrice. Au moment de la réplication, la polymérase à ADN utilisera la matrice d'ADN pour synthétiser de nouvelles molécules, en ajoutant des nucléotides à partir de l'extrémité 3'-OH libre de chaque amorce. L'enzyme coupe l'ADN cible à un endroit précis appelé « site de restriction ». Cette coupure est détectée par une variation de nombres et des tailles de fragments d'ADN (fragments de restriction) obtenues après électrophorèse, visualisée sous UV en utilisant un agent intercalant de l'ADN, le bromure d'éthidium (BET).

❖ Amplification de l'ADN par PCR :

La PCR permet d'amplifier des séquences autour des sites de mutations en quantités suffisantes pour réaliser l'analyse par RFLP. Amplification des séquences cibles contenues dans les exons 5(codon175) ,7(codon248/249) et exon 8 (codon 273).

Tableau 5. Amorces sens et antisens utilisées pour l'amplification par PCR de différentes séquences cibles de gène p53.

Région de l'amplification	MT	Les amorces		Fragment Amplifié (pb)
Exon5«Codon175 »	64°C	S	5'gcacccgcgtcctcgcca3'	105
	62°C	A	5'gctcaccatcgctatctgag3'	
Exon 7 «codon248/249»	66°C	S	5'cacagcaggccagtgtgcag3'	158
	62°C	A	5'tctctaggttggtctgac3'	
Exon8«codon273 »	68°C	S	5'ggacggaacagctttgaggcg3'	188
	68°C	A	5'aagtgaatctgaggcataactgca3'	

MT : *Melting Temperature (température de fusion)*

Pour les 3 séquences étudiées, les réactions d'amplification ont été effectuées dans un mix de 20 µl contenant :

- 100 ng d'ADN génomique ;
- 1,5 µl d'amorce S ;
- 1,5 µl d'amorce AS ;
- 0,5µl de mélange NTPs ;
- 0,2 µl de *Taq* polymérase ;
- 3 µl de tampon de PCR ;
- Mg Cl₂ : codon 175(2µl), codon 248/249(2,5µl) ;
- Qsp 20 µl de H₂O bidistillée.

Les programmes d'amplification par PCR sont présentés dans le tableau suivant (pour les 3 séquences cibles) :

Tableau 6. Programme d'amplification par PCR des séquences cibles contenant les codons étudiés.

Phases du programme	Température(C°) (Codon)	Temps	Nombre de cycle (codon)
Dénaturation initiale	94	10 min	
Dénaturation	94	30sec	35 cycles (175 et 248/249) 37 cycles (273)
Hybridation	60(248/249) 66(175/273)	01min	
Extension	72	01min	
Extension finale	72	10min	

La détermination de la taille des produits de PCR se fait par une migration électrophorétique sur un gel d'agarose à 2% (ACHOUR, 2015).

❖ **Etablissement du profil de restriction RFLP :**

Les techniques PCR et RFLP sont utilisées sur une région spécifique du gène p53. L'ADN est coupé par l'enzyme de restriction à un site appelé sites de restriction, où cette enzyme est capable de reconnaître où la mutation s'est produite. La variation du nombre et de la longueur des fragments d'ADN obtenus après digestion enzymatique et séparation par électrophorèse est révélatrice de Non-coupage d'ADN (ACHOUR, 2015).

Tableau 7. Analyse mutationnelle des 4 codons "hot spots" (175, 248, 249 et 273) par les enzymes de restriction, informations générales (ACHOUR, 2015).

Mutation	Taille de Fragment Amplifié (pb)	Enzyme de restriction	Tailles des fragments de Restriction (pb)
R175H Wild-type codon:CGC Mutant codon : <u>CAC</u>	105	<i>HhaI</i> 5'... GCGC...3' 3'... <u>CGCG</u> ...5'	Allèle sauvage:64,23, 18 Allèle muté: 87,18
R248Q/R248W Wild-type codon:CGG Mutant codon : <u>CAG/CAA/TGG</u>	158	<i>MspI</i> 5'... <u>CCGG</u> ...3' 3'... GGCC...5'	Allèle sauvage:81,77 Allèle muté: 158
R249S Wild-type codon: AGG Mutant codon:AG <u>T</u>	158	<i>HaeIII</i> 5'... GGCC...3' 3'... <u>CCGG</u> ...5'	Allèle sauvage:83, 75 Allèle muté:158
R273H/R273C Wild-type codon: CGT Mutant codon : <u>CAT/TGT</u>	188	<i>BstUI</i> 5'... CGCG...3' 3'... <u>GCGC</u> ...5'	Allèle sauvage:16 7,21 Allèle muté: 188

Les conditions de fonctionnement des enzymes de restrictions ont fournies par le fournisseur (New England Biolabs, UK). La digestion a été réalisée dans un mix de 20 µl :

- 10 µl de produit de PCR;
- 6 µl de Tampon d'enzyme choisie (CutSmart™Buffer);
- 3 µl de l'enzyme de restriction choisie ;
- 1 µl d'H₂O.

La digestion a été effectuée dans des températures spécifiques pendant une nuit. Dont les trois enzymes *HhaI*, *MspI*, *HaeIII* ont même température de restriction (à 37°C). Alors que l'enzyme *Bst* *UI* est active à 60°C.

La séparation des fragments digérés a été faite par l'électrophorèse sur gel d'agarose à 4 %, en présence du tampon de migration TAE 1X. Alors que la visualisation a été réalisée sous U.V en présence du BET.

II.4.2 Population Marocaine

Le génotypage du polymorphisme p53 (Arg72Pro) a été réalisé par la PCR-RFLP. Dont les amorces utilisées pour amplifier le fragment cible sont : 5'-CCCCCTTGCCGTCCCAAGC-3' (amorce sens) et 5'-CGTGCAAGTCACAGACTTGGCTGT-3' (amorce antisens). L'amplification par PCR a été réalisée dans un volume final de 25µL contenant du tampon PCR 10×, 25 mM de MgCl₂, 5 mM de mélange de dNTP, 5 M d'amorces, 500 U Taq d'ADN polymérase et 50 à 100 ng d'ADN génomique.

Les conditions d'amplification sont comme suit :

- Une dénaturation initiale à 94°C pendant 5 min ;
- Suivie de 35 cycles de dénaturation à 94°C (30 s), d'hybridation à 57°C (30 s), et d'élongation à 72°C (90 s),
- En faune élongation finale à 72°C pendant 10 min.

Le produit PCR a été analysé par électrophorèse sur gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium 2%.

Le fragment amplifié est de taille 278 pb contenant le point chaud (p53 Arg72Pro). Cette séquence a été digérée avec 4 à 5 U de *Bst* *UI* à 60°C pendant 4 h. en absence de mutation (Arg/Arg), la digestion a donné deux fragments : allèle sauvage homozygote (GG ; 2 fragments de taille 160 et 118 pb). Alors que en présence de mutation, p53 (Pro/Pro) muté :

allèle homozygote (CC) l'enzyme ne coupe pas, donc le fragment de 278 pb n'est pas digéré et en cas de p53(Arg/Pro) : allèle hétérozygote (GC) on obtient 3 fragments de 278, 160 et 118 pb.

Le produit de digestion a été analysé par électrophorèse sur gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium à 3 % et visualisé avec des rayons UV (Ayoubi, et al., 2018).

II.4.3 Population Tunisienne

L'équipe de (ARFAOUI, et al., 2015) a appliqué la technique de RT-PCR avec la méthode TaqMan pour faire l'analyse mutationnelle de gène p53.

Cette méthode est un type de RT-PCR qui utilise une sonde d'acide nucléique complémentaire d'un segment interne de l'ADN cible. La sonde est marquée avec deux fragments fluorescents. Le spectre d'émission de l'un chevauche le spectre d'excitation de l'autre, entraînant un « quenching » du premier fluorophore par le second. La sonde est présente pendant la PCR et si le produit est fabriqué, la sonde est dégradée via l'activité 5'-nucléase de la Taq polymérase qui est spécifique de l'ADN hybridé à la matrice (Elisa Angelini, 2007). La dégradation de la sonde permet aux deux fluorophores de se séparer, ce qui réduit l'extinction et augmente l'intensité de la lumière émise. Étant donné que ce test implique des mesures de fluorescence qui peuvent être effectuées sans ouvrir le tube PCR, le risque de contamination est considérablement réduit. De plus, aucune électrophorèse n'est requise, ce qui réduit les coûts de main-d'œuvre (Marjorie A. Hoy, 2013)

Dont au premier temps, ils ont amplifié la séquence cible grâce à RT-PCR ou PCR en temps réel. L'amplification a été réalisée en utilisant un couple des amorces marquées et spécifiques à la séquence cible : amorce sens 5'-AGAATGCCAGAGGCTGCTCC-3' et antisens 5'-GCAACTGACCGTGCAAGTCA. Le profil d'amplification était un cycle de dénaturation initiale à 60 °C pendant 30s suivi de 40 cycles de dénaturation à 95 °C (15 s), d'hybridation et élongation à 60 °C pendant 1 min.

Chapitre 5

Résultats Et Discussion

I. Résultats :

I.1 Population algérienne

I.1.1 Analyse des produits PCR obtenus

L'amplification des séquences cibles du gène p53 par PCR, a été effectuée par l'utilisation des amorces spécifiques, dont le premier couple couvre le site du point chaud de la mutation correspondant au codon 175 dans l'exon 5 et génère un fragment de 105 pb. Le deuxième couple amplifie un fragment de 158 pb au niveau de l'exon 7 contenant les 2 codons "hot spots" (248 et 249) et, enfin, une troisième paire d'amorce encadrant une séquence de 188 pb au niveau de l'exon 8, où se trouve le codon 273. La vérification des fragments amplifié a été fait par électrophorèse sur un gel d'agarose à 3,5%.

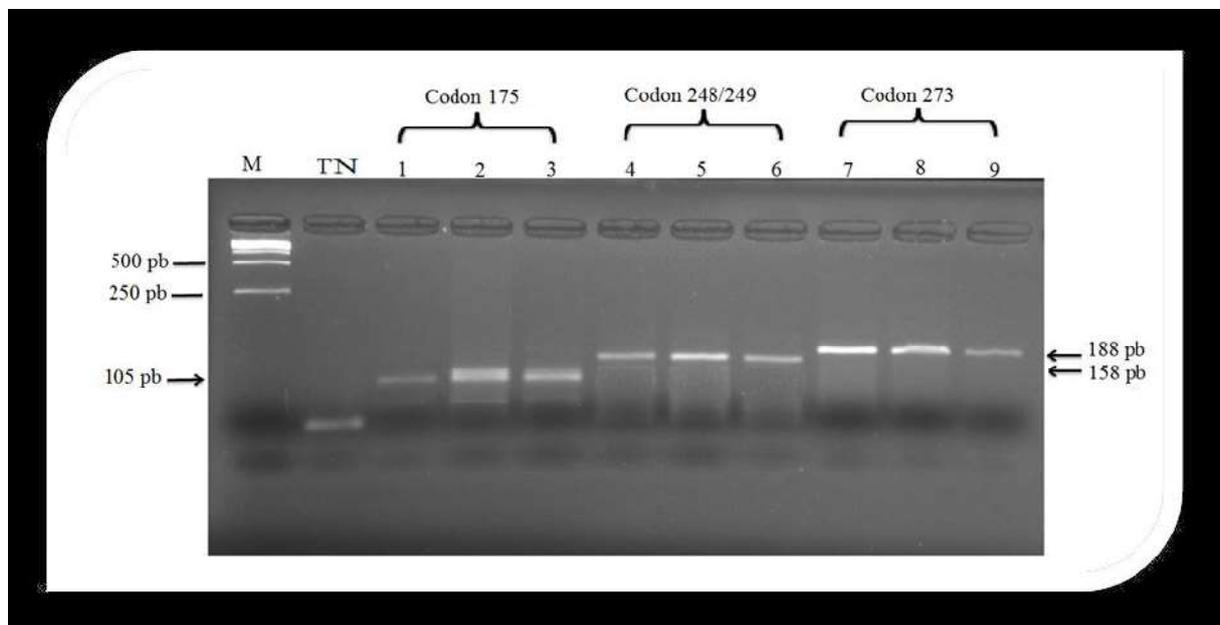


Figure 8. Analyse des produits de PCR obtenus après électrophorèse sur gel d'agarose à 3,5% et coloration au BET suivie d'une visualisation sous UV. M : marqueur de poids moléculaire (1 kb, Sigma). TN : témoin négatif. (ACHOUR, 2015).

Les puits 1, 2 et 3 : fragments de 105 pb qui portent le site du codon "hot spot" 175 ; les puits 4, 5 et 6 : fragments de 158 pb qui portent le site des codons "hot spots" 248/249 et les puits 7, 8 et 9 : fragments de 188 pb qui portent le site du point chaud 273. Profils des produits de PCR digérés par les endonucléases de restrictions appropriées

Les trois produits de PCR de chaque échantillon ont été soumis à une digestion enzymatique avec une endonucléase de restriction appropriée, puis une électrophorèse et une visualisation sous UV ont été réalisées. *HhaI* a été utilisé sur le fragment de 105 pb qui

recouvre le point chaud 175 et en l'absence de mutation sur ce site cette enzyme coupe deux points, donc le génotype G/G de type sauvage homozygote est les échantillons représentant trois bandes de taille 64 points de base, 23 points de base et 18 points de base. La disparition de l'activité enzymatique est due à la conversion en CGC CAC (R175H) et ainsi le génotype

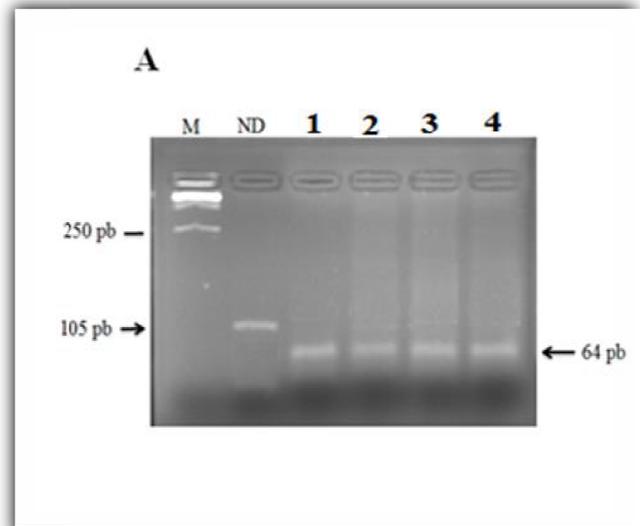


Figure 9. Profil électrophorétique des produits de PCR (105 pb de l'exon 5 du gène p53) et de leurs produits de digestion, séparés sur un gel d'agarose à 4%, après coloration au BET et visualisation sous UV. D : Digéré. ND : Non Digéré. M : Marqueur de poids moléculaire (1kb, Sigma). TN : témoin négatif. (ACHOUR, 2015).

homozygote du mutant A/A est représenté dans des échantillons représentant deux bandes de 87 pb et 18 pb. Les échantillons représentant quatre bandes sont du génotype hétérozygote G/A.

Le 2ème puits représente un fragment 105pb non digéré. Les produits de digestion des échantillons 1, 2, 3 et 4 sont des fragments de taille 64 pb et les deux autres fragments (23pb et 18 pb) sont sortis du gel suite à une migration prolongée. Les échantillons sont de type homozygote sauvage G/G.

Les fragments de 158 pb encadrant le codon 248 attendus après digestion complète par l'endonucléase *MspI* sont : 81 pb et 77 pb. La transition de CGG en CAG/CAA (R248Q) ou CGG en TGG (R248W) détruit le site de reconnaissance de l'enzyme *MspI* et désactive la digestion donc, on obtient un fragment de 158 pb.

Une électrophorèse sur gel d'agarose (4%) des produits digérés par l'enzyme *MspI*, après coloration au BET et visualisation sous UV. Le deuxième puits représente un fragment de 158 pb non digéré (ND). Les autres puits représentent le produit de digestion des échantillons 1, 2, 3 et 4, qui sont deux bandes 81 et 77 pb (cas hétérozygote sauvage).

Les fragments de 158 pb encadrant aussi le codon 249 attendus après une digestion par l'endonuclease *HaeIII* sont 83 pb, 75 pb. Le seul point de mutation Arginine \Rightarrow Sérine (AGG \Rightarrow AGT) détruit le site de reconnaissance de l'enzyme *HaeIII* et la digestion ne peut pas se dérouler au niveau du codon 249 donc, on obtient un fragment de 158 pb (figure 5.3). D'après le profil, les échantillons sont de génotype homozygote sauvage G/G.

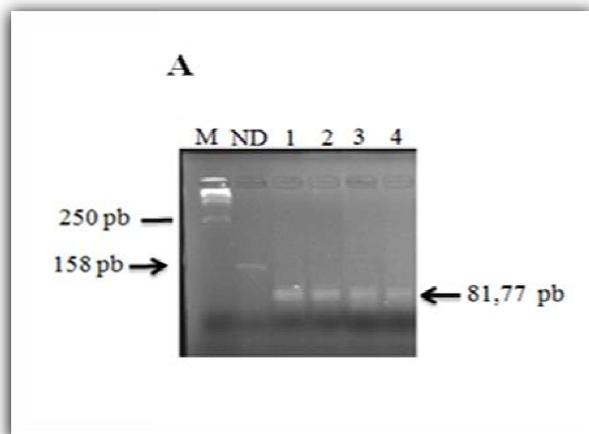


Figure 10. Profil électrophorétique du "hot spot" 248 montrant les fragments obtenus après digestion par l'enzyme *MspI*. M : poids moléculaire. (ACHOUR, 2015).

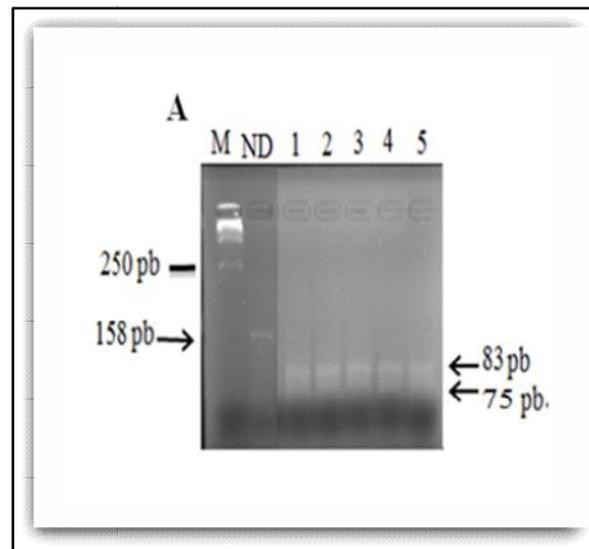


Figure 11. Profil électrophorétique des produits de PCR (158 pb du codon 249) et de leurs produits de digestion, séparés sur un gel d'agarose à 4%, après coloration au BET et visualisation sous UV. M : Marqueur de poids moléculaire (1kb, Sigma). (ACHOUR, 2015).

Les puits 1, 2, 3, 4 et 5 : les produits de digestion des fragments 158 pb, deux fragments 83pb et 75 pb. ND : Non Digéré (158 pb).

L'enzyme *Bst*UI a été utilisée pour digérer le segment de 188 paires de bases entourant le « point chaud » 273. Cette enzyme est coupée en un point en l'absence de mutation, ainsi les segments sont en deux bandes avec des tailles de 167 pb et 21 pb. La disparition du site de reconnaissance de l'enzyme est due au passage de CGT à CAT (R273H) ou au passage de CGT à TGT (R273C). De ce fait, une seule fraction de 188 pb est obtenue, le génotype hétérozygote G/G, C/C et G/A ou C/T étant les échantillons représentant trois bandes et Le génotype homozygote étant le G/G, C/C. (ACHOUR, 2015).

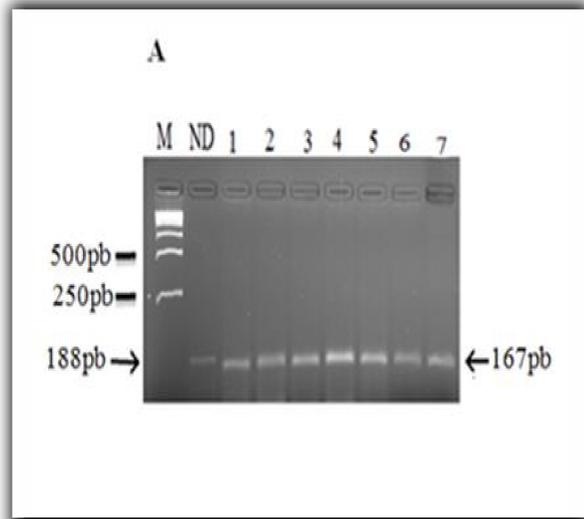


Figure 12. Profil RFLP du codon 273 en présence de l'enzyme BstUI .Une électrophorèse sur gel d'agarose (4%) des produits digérés par l'enzyme BstUI, après coloration au BET et visualisation sous UV. M : poids moléculaire (1Kb, Sigma). (ACHOUR, 2015).

Le deuxième puits est l'amplicon 188 pb non digéré (ND). **(A)**. Les autres puits représentent les produits de digestion des échantillons 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7, et on obtient un fragment détaillé 167 pb (cas d'absence de la mutation). **(B)**. Produit digéré des patientes 8, 9, 10, 11 et 12 : représentent une bande : 188pb (le cas de mutation de génotype homozygote muté G/A ou C/T).

I.2 Population Marocaine

D'après les résultats de l'équipe (ACHOUR, 2015) L'incidence du cancer du sein était plus élevée chez les patientes de plus de 40 ans (90,4 %) que chez celles de moins de 40 ans (9,6 %). Le type histologique le plus fréquent était le carcinome canalaire invasif chez la population marocaine.

Selon cette équipe Il y avait une association entre carcinome canalaire invasif et la mutation au codon 215 de p53 génotype hétérozygote muté GC (Arg/Pro) et génotype homozygote muté CC(Pro/Pro). Dont les fréquences génotypiques de polymorphisme G215C étaient les suivantes : 44 % pour l'homozygote sauvage (Arg/Arg) (génotype GG), 33,6 % pour l'hétérozygote muté (Arg/Pro) et 22,4 % pour l'homozygote muté (Pro/Pro) chez les patientes atteintes de cancer du sein. Alors que la fréquence génotypique chez les cas contrôles étaient : 51,58 % (Arg/Arg), 30,5 % (Arg/Pro) et 17,92 % (Pro/Pro).

Tableau 8. Distribution génotypique du polymorphisme TP53 Arg72Pro chez les patientes atteintes d'un cancer du sein et les témoins sains selon les caractéristiques Clinico pathologiques (Ayoubi, et al.,

Variables	n (%)	Genotypes			p value
		Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro	
Patients	125 (100)	55 (44)	42 (33.6)	28 (22.4)	0.08
Controls	126 (100)	65 (51.58)	46 (30.5)	15 (17.92)	

Nos résultats indiquent que l'allèle muté C (Pro) était plus fréquent chez les patients que les témoins (39,2 contre 30,16 %). Un risque de cancer du sein plus élevé a été observé chez les patients ayant un génotype homozygote muté CC (Pro/Pro) (**Tableau 9**).

Tableau 9. Fréquence génotypique et allélique de polymorphisme G251C p53(Arg/Pro)

Genotype	Cases (n = 125), n (%)	Controls (n = 126), n (%)
Pro/Pro	28 (22.4)	15 (17.92)
Arg/Pro	42 (33.6)	46 (30.5)
Arg/Arg	55 (44)	65 (51.58)
Pro/Pro + Arg/Pro ^a	70 (56)	61 (48.42)
Arg/Arg	55 (44)	65 (51.58)
Pro/Pro ^b	28 (22.4)	15 (17.92)
Arg/Arg + Arg/Pro	97 (77.6)	111 (82.08)
Pro ^c	98 (39.2)	76 (30.16)
Arg	152 (60.8)	176 (69.84)

Au contraire, le génotype homozygote sauvage GG (Arg/Arg) est avéré être associé à un effet protecteur contre le cancer du sein.

I.3 Population Tunisienne

L'équipe de (ARFAOUI, et al., 2015) a été portée son étude sur 334 femmes. Dont son objectif est de faire l'Association entre le polymorphisme du codon G251C p53 et le risque de cancer du sein.

Les fréquences d'Arg/Arg, Arg/Pro et Pro/Pro se sont avérées être : 11% (19/175), 35% (62/175) et 54% (94/175) dans les cas de cancer du sein et 43% (69/159), 45 % (71/159) et 12 % (19/159) chez les témoins, respectivement.

Ce résultat montre que le génotype homozygote muté CC (Pro/Pro) est le plus répandu chez les patientes atteintes d'un cancer du sein, tandis que les génotypes homozygotes sauvage GG(Arg/Arg) et hétérozygote muté GC (Arg/Pro) sont plus abondants chez les témoins normaux. En comparant le génotype Pro/Pro avec les deux autres génotypes dans les deux groupes, il y avait une différence statistiquement significative entre le groupe témoin et le groupe cancer du sein. Donc cette étude a suggéré que le Les génotypes homozygote sauvage GG (Arg/Arg) et hétérozygote muté GC (Arg/Pro) avait une association avec la protection contre le cancer du sein, alors que le génotype homozygote muté CC (Pro/Pro) était associé au cancer du sein dans la population tunisienne.

II. Discussion analytique

II.1 Choix d'Echantillons

Les trois études choisies ont utilisés deux types d'échantillons (Tissu conservé, sang). Le prélèvement (ischémie froide et chaude, méthode de décalcification et taille de l'échantillon), en passant par la fixation (formol tamponné, durée, température) jusqu'au l'inclusion et la conservation (réactifs de paraffine, durée de conservation, humidité), toutes ces facteurs peuvent affecter la qualité de l'ADN (Nechifor-Boilă, Loghin, Vacariu, Halațiu, & Borda, 2015).

Pour les autres études (ARFAOUI, et al., 2015) (Ayoubi, et al., 2018), le matériel biologique utilisé est un sang frais. Comme le traitement immédiat des échantillons n'est pas possible, les échantillons sont rapidement conservés à -80 °C , cette étape permet d'arrêter la croissance des bactéries donc d'éviter la contamination des échantillons (Vandeputte, et al., 2017) . Cependant, la congélation ne garantit toujours pas une flexibilité totale lors de l'échantillonnage et du transport. La congélation et la décongélation des cellules peuvent affecter l'intégrité de l'ADN (Chung, et al., 2017). Une diminution globale du rendement et de l'intégrité de l'ADN due à la congélation a été observée pour la majorité des échantillons (Metzler-Zebeli, Lawlor, Magowan, & Zebeli, 2016) (K.R, Ganz, Eisen, & Marks, 2018)

II.2 Choix de protocole d'extraction

Les méthodes d'extraction de l'ADN peuvent se classer en trois principales classes (Lim, Song, Kim, Lee, & Nam, 2018):

- les méthodes utilisant des solvants organiques (Principalement la méthode Phénol/Chloroforme) ;
- les méthodes utilisant des solvants non organiques (Salting out) ;
- les méthodes basées sur l'utilisation de micro colonnes de résines échangeuses d'ions.

II.2.1 Méthode Phénol/Chloroforme

Dans l'étude de A. ARFAOUI (2015) La méthode d'extraction qui a été utilisés est méthode Phénol / Chloroforme. Ce protocole est une procédure d'extraction plus fiable et

efficace même par rapport aux autres techniques qui ont été utilisées dans l'étude marocaine et algérienne. Mais cette méthode utilise des réactifs toxiques, comme le phénol, ce qui nécessite des précautions particulières de sécurité en laboratoire (hotte à flux laminaire) (Amani Abdel-Latif, 2017). En réalité, l'extraction au phénol-chloroforme reste la méthode de choix pour les échantillons ne contenant que de très faibles quantités d'ADN. Bien que cette méthode implique une interaction manuelle intensive, l'échantillon est manipulé à travers au moins trois tubes de réaction, ce qui augmentera les risques de contamination et de mauvaise manipulation des échantillons Silvano (Köchel, 2005). En outre, la récupération d'ADN du phénol par extraction au chloroforme est connue pour être relativement élevée et la quantité d'ADN obtenue est très élevée. De plus, la qualité de celui-ci est également très bonne. (ARFAOUI, et al., 2015)

II.2.2 Méthode utilise des solvants non organiques (Salting out)

Les deux équipes ACHOUR Hanane (2015) et AYOUBI (2018) ont été extrait l'ADN par la méthode Salting-out. La méthode de relargage ou "salting out" est considérée comme une alternative à la procédure d'extraction au phénol et au chloroforme. Cette méthode qui a été utilisée dans cette étude se caractérise par l'absence de produits chimiques toxiques (L. R. Weerakkody, 2017). Il est basé sur le principe que les protéines et autres contaminants cellulaires précipiteront dans une solution saline saturée contrairement à l'ADN en raison de leur hydrophobie relative, (Sergio Galindo-Rodriguez, August 2004).

Comme il n'y a qu'une seule étape de déprotéinisations par relargage, la pureté des extraits d'ADN peut ne pas être comparable à celle obtenue par extraction organique. (Samuel Asamoah Sakyi, May-June 2017)

Il a été rapporté que la technique d'extraction d'ADN par le NaCl est plus rapide et surtout les réactifs utilisés sont non toxiques.

Quelle que soit la méthode d'extraction et de purification des acides nucléiques utilisée, toutes les études ont obtenu de l'ADN en qualité et en quantité suffisantes pour réaliser des actes de biologie moléculaire. Et l'objectif principal d'étude de toutes ces méthodes est de libérer un ADN de haute qualité qui peut être stocké pendant plusieurs années dans des conditions appropriées (Md. Arifuzzaman, August 2019). Les avantages et les inconvénients des techniques précédemment décrites sont montrés dans le tableau 10.

Tableau 10. La différence entre les trois techniques d'extraction d'ADN.

Méthode	Avantages	Inconvénients
Méthode d'extraction par phénol/chloroforme)	Très utilisé, la pureté de l'ADN est meilleure (une bonne concentration en ADN pur)	Les inconvénients majeurs de cette technique c'est qu'elle est lente, peut être toxique (Nermien A. Jan 2018). Le phénol est très toxique et corrosif, c'est donc un produit qui nécessite un équipement particulier pour être manipulé (Hotte chimique, gants).
Méthode d'extraction par relargage de sel (ou salting out	Rapide, simple et non coûteuse (SAJJA SUGUNA, 2014)	Elimination des protéines et d'autres contaminants est inefficace la précipitation répétée à l'alcool sont souvent nécessaires (Samuel Asamoah Sakyi, May-June 2017)

III. Discussion des résultats

La protéine suppresseur de tumeur p53 est impliquée dans plusieurs processus cellulaires centraux, y compris la transcription, la réparation de l'ADN, la stabilité génomique, la sénescence, le contrôle du cycle cellulaire et l'apoptose. Les activités de P53 sont étroitement liées à sa structure et même à un polymorphisme subtil au niveau d'un seul nucléotide les polymorphismes peuvent exercer un effet profond sur ses performances. Deux cents SNP différents dans le p53 ont été signalés. Le polymorphisme le plus étudié est (rs1042522), une transversion G en C dans le codon 215 G > C de l'exon 4 ce qui entraîne un changement d'acide aminé de l'arginine à proline (p53 Arg72Pro). Il est situé dans une région riche en proline de la protéine, qui est connue pour être importante dans la médiation de la réponse apoptotique. Apparemment, la forme Arg72 induit davantage l'apoptose efficace que la forme Pro72 (Dumont P, 2003) (Pim D and Banks, 2004). Un grand nombre de recherches ont étudié le rôle de polymorphisme l'Arg72Pro dans la modulation du risque de cancer. La majorité des études ont rapporté l'association du risque de cancer avec allèle pro72 (Song HR, 2011).

(Koushik A, 2006) (Eren F, 2010) et quelques-uns avec l'allèle Arg72.

L'analyse mutationnelle réalisée par l'équipe (ARFAOUI, et al., 2015) a conclu que le polymorphisme G215C p53 est associé au développement de cancer du sein avec une fréquence génotypique de 11 %Arg/Arg, 35 %Arg/Pro et 54 %Pro/Pro dans le groupe des cas pathologiques par rapport à 43%Arg/Arg, 45% Arg/Pro, 12% Pro/Pro dans le groupe des cas contrôles. Ces résultats sont en accord avec d'autres études publiées (Al-Qasem A, 2012/ Dakouras A, 2008) (Al-Qasem A, 2012.) (Dakouras A, Nikiteas, 2008). qui ont rapporté une association marquée entre la forme Pro/Pro du SNP 72 et le risque de cancer du sein (ARFAOUI, et al., 2015)

Selon l'étude du groupe (Ayoubi, et al., 2018). Il a été constaté que p53(Arg72) est fortement impliqué dans l'induction de l'apoptose. L'inactivation de p53 facilite la progression tumorale. L'inactivation de p53 par des mutations se produit dans plus de 50 % des cas pathologiques. Ils ont aussi étudié l'association de polymorphisme (215G>C) (Arg72Pro) p53 avec le risque de cancer du sein dans la population marocaine. Ces résultats ont montré que le génotype homozygote CCp53 (Pro/Pro) était associé à un risque accru de cancer du sein.

En 2015 l'étude de (ACHOUR, 2015) a observé que les analyses moléculaires réalisées ont permis de cerner les différents génotypes des mutations étudiées (R175H, R248Q/ R248W, R249S, R273H/ R273). Vu que dans ces résultats ils n'ont pas détecté de mutations au niveau des trois codons chauds 175, 248 et 249, mais les analyses moléculaires réalisées ont permis de détecter des anomalies génétiques au niveau de codon chaud 273. Néanmoins, l'association entre ces anomalies et le risque du cancer du sein n'a pas été élucidée à cause du nombre restreint d'échantillons étudiés. Dans certains profils, des mutations 'douteuses' que (ACHOUR, 2015) n'avons pas voulu montrer car elles nécessitent des investigations supplémentaires et un séquençage pour confirmer leurs présences. Cependant, nous pouvons affirmer que la méthodologie suivie a montré ses capacités de détection d'anomalies génétiques et, c'est pour cette raison, qu'elle pourrait constituer un moyen précis et cliniquement utile pour détecter les mutations ponctuelles du gène p53 dans le cancer du sein grâce à la technique PCR-RFLP.

Quelle que soit la méthode d'extraction et de purification des acides nucléiques utilisée et même les méthodes d'analyser les mutations, toutes les études ont obtenu de l'ADN en

qualité et en quantité suffisantes pour réaliser des actes de biologie moléculaire et détecter la mutation

Conclusion

Conclusion :

L'objectif général de notre travail est d'étudier les méthodes d'extraction d'ADN afin d'obtenir un protocole efficace, peu coûteux et bon avec de bons résultats en termes de quantité et de pureté d'ADN extrait dans le but d'identifier les mutations anciennes et récentes au niveau du gène p53 qui causent cancer du sein.

Dans notre étude, trois méthodes d'extraction d'ADN ont été comparées pour isoler un ADN de haute qualité qui peut être efficacement amplifié par PCR dans trois régions différentes (algérienne, tunisienne et marocaine) où chaque étude a suivi une méthode particulière et les résultats étaient bien sûr différents.

L'équipe d'étude Tunisienne a suivi la méthode au phénol sur des échantillons de sang, qui était très efficace et avec des résultats satisfaisants et meilleurs que d'autres études, mais les matériaux utilisés sont toxiques et dangereux. Quant à l'étude Marocaine et Algérienne, elles ont suivi la méthode du « Salting-out », qui est considérée comme l'une des méthodes sûres, mais ses résultats manquent de précision et nécessitent une période plus longue. La deuxième équipe (Algérienne), ayant pu détecter des mutations au niveau des points chauds étudiés du gène p53 en utilisant une technique PCR-RELP qui dépend de l'amplification Une partie de l'ADN extraite des tissus pathologiques de la glande mammaire à l'aide de matières premières spécifiques puis digérée par des enzymes de restriction qui reconnaissent des sites de restriction spécifiques.

Quant à l'équipe tunisienne et marocaine, elle a pu détecter des mutations dans le codon 215 G>C du gène p53 en utilisant deux techniques différentes.

Nous proposons pour la continuité du travail expérimental :

- D'augmenter le nombre d'études, notamment dans le monde arabe, liées aux mutations au niveau du gène 53 qui causent le cancer du sein, afin de recueillir le plus d'informations possible sur ce sujet.
- De fournir les différentes techniques et matériaux utilisés pour extraire l'ADN en bonne quantité qui permet d'afficher des résultats précis
- D'autoriser le travail appliqué dans les laboratoires après avoir surmonté ces circonstances exceptionnelles dues à la propagation de l'épidémie de Covid-19

Bibliographie

Bibliographie

1. ACHOUR, H. (2015). ANALYSE MUTATIONNELLE DU GENE SUPPRESSEUR DE TUMEUR p53 DANS LE CANCER DU SEIN : A PROPOS DE CAS CLINIQUES D'UNE POPULATION ALGERIENNE. Biskra, Sciences de la Nature et de la Vie, L'algerie: Université Mohamed Khider.
2. ARFAOUI, A., DOUIK, H., KABLOUTI, G., BEN CHAABEN, A., HANDIRI, N., ZID, Z., et al. (2015). Role of p53 Codon72 SNP in Breast Cancer Risk. *ANTICANCER RESEARCH* , 1764-1765.
3. Ayoubi, S. E., Elkarroumi, M., El Khachibi, M., Hassani Idrissi, H., Ayoubi, H., Ennachit, S., et al. (2018). The 72Pro Variant of the Tumor Protein 53 Is Associated with an Increased Breast Cancer Risk in the Moroccan Population. *pathobiology* , 248-253.
4. Bray, F. F., I, S., RL, S., LA, T., & A, J. (2018). Canadian cancer statidtics Advisory committe. *Canadian cancer statidtics Advisory committe* . tornoto, canada: canadian cancer sosciety.
5. Bresson, B., & Lieber, J. (2006, Septembre). Classification pour l'aide au traitement du cancer du sein. *Septième journées de la Société Francophone de Classification - SFC'99, Loria, 1999, Nancy, France* , p. p7.
6. Chung, W., Cui, Y., Chen, C., Wei, W., Chang, R., Shu, W., et al. (2017). Freezing shortens the lifetime of DNA molecules under tension. *J Biol.Phys* .
7. Classification TNM du cancer du sein, 7e édition et stade UICC. (2010).
8. Cohen-Haguenaer, O. (2019). Prédisposition héréditaire au cancer du sein. pp. 51-138.
9. Daniela Kandioler-Eckersberger, 2. C.-W. (2000, January). TP53 Mutation and p53 Overexpression for Prediction of Response to Neoadjuvant Treatment in Breast Cancer Patients. *Departments of Surgery [D. K-E., C. L., S. K., E. J., M. G., R. J.], Pathology [M. R.], Internal Medicine [C. W., G. S.], Pharmacology [H. S-W.], and Medical Computer Sciences [M. M.], University of Vienna Medical School, A-1090 Vienna, Austria. Vol. 6* , pp. 50-56.
10. Fakia, A., & Khaldia, D. (2014). Cancer du sein. *Mémoire de fin f'étude* , p. p57 ; p131.
11. George, D. P. (2011). International Journal of Current Pharmaceutical Reaserch.
12. GEORGE, P. (2011). P53 HOW CRUCIAL IS ITS ROLE IN CANCER. *Dept .of Biotechnology, Karunya University, Coimbatore, Tamil Nadu, India. International Journal of Current Pharmaceutical Research Vol 3, Issue 2* .

13. H.Drissi, F. K. (2016, May). Revue d'Epidémiologie et de Santé Publique vol 64. pp. 144-145.
14. Jean Paul Ndamba Engbang, & H. (2015). Cancer du sein au cameroun.
15. K.R, H., Ganz, H., Eisen, J., & Marks, S. (2018). Effects of preservation method on canine (*Canis lupus familiaris*) fecal microbiota. *PeerJ* .
16. Kamina, P. (2011). Anatomie clinique. Dans P. Kamina, *Anatomie clinique* (p. 342). paris: Maloine.
17. koual, M. G., Delanoy, N., Crespel, C., Jacques, J., Douay-Hauser, N., Hélène Blons, M.-A. L.-B., et al. (2020). Syndrome héréditaire de prédisposition au cancer du sein et de l'ovaire :. p. 3.
18. Wei Zhang, Yingyan Yu , The Important Molecular Markers on Chromosome 17 and Their Clinical Impact in Breast Cancer, *Int. J. Mol. Sci.* 12(9), 5672-5683, Septembre 2011
19. M Espié, A. ., (2012). Épidémiologie et cancer du sein, Centre des maladies du sein Hôpital St Louis , Holmes M., *J Clin Oncol* 2000; 18: 3668-3676.
20. Mandal, A. (2019, Feb 26). Incidence of breast cancer around the world. *News Medical Lifes Sciences* .
21. Mélanie, B. (2018, 12 11). ÉVALUATION DU RÔLE ET DE LA RÉGULATION DE GJA1 (CONNEXINE 43) DANS. Université du Québec, CANADA.
22. Metzler-Zebeli, P., Lawlor, P., Magowan, E., & Zebeli, Q. (2016). Effect of freezing conditions on fecal bacterial composition in pigs. *Animal* .
23. Nechifor-Boilă, A., Loghin, A., Vacariu, V., Halațiu, V., & Borda, A. (2015). The storage period of the formalin-fixed paraffin-embedded tumor blocks does not influence the concentration and purity of the isolated DNA in a series of 83 renal and thyroid carcinomas. *Rom J Morphol Embryol* .
24. Noa Rivlin, R. B. (2011). Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. . *Department of Molecular Cell Biology. Genes & Cancer / vol 2 no 4* .
25. P. Merviel, O. J.-G. (2011). Existe-t-il encore des facteurs de risque de survenue d'un cancer du sein. *Gynécologies Obstétriques & Fertilité* 39 , pp. 486-490.
26. Penault-Llorca, F., Mishellany, F., Fouilhoux, G., Trechot , I., Maury, F., Robin , N., et al. (2013, Décembre). Démarche diagnostique dans le cancer du seib. *LA REVUE DU ORATICIEN VOL. 63* , p. p1389.

27. Seiler, C., Sharpe, A., Barrett, J., Harrington, E., Jones, E., & Marshall, G. (2016). Nucleic acid extraction from formalin-fixed paraffin-embedded cancer cell line samples: a trade-off between quantity and quality? *BMC Clin Pathol* , 1-13.
28. Shunsuke Kato, S.-Y. H. (2003, Mars 25). Understanding the function–structure and function– mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Department of Clinical Oncology, Institute of Development, Aging, and Cancer, Tohoku University, Sendai 980-8575, Japan Edited by Bert Vogelstein, The Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center at Johns Hopkins, Baltimore, MD* .
29. Sumit Kumar, V. W. (2014, May 1). p53 in breast cancer: mutation and countermeasures. *Frontiers in Bioscience 12* , pp. 4168-4178.
30. Tavassoéli F.A, D. P. (2003). Tumors of the breast and femal genital organs. *Pathology and genetics* .
31. Vandeputte, D., Kathageni, G., D’hoe, k., Vieira-Silva, S., -Colomerl, M., Sabino, J., et al. (2017). Quantitative microbiome profiling links gut community variation to microbial load. *Nature* .
32. Z. El Hanchi *, R. B. (2003, Janvier 30). Cancer du sein bilatéral. pp. 128-134.

33. Andreas C. Joerger and Alan R. Fersht. Structural Biology of the Tumor Suppressor p53. Medical Research Council Centre for Protein Engineering, Cambridge CB2 0QH, United Kingdom. April 14, 2008.
34. Md. Arifuzzaman- Sarmistha Mitra- Raju Das- Amir Hamza- Nurul Absar- Raju Dash, In silico analysis of nonsynonymous single-nucleotide polymorphisms (nsSNPs) of the SMPX gene, DOI: 10.1111/ahg.12350, August 2019.
35. Nermien A. Ibrahim Samir A. NassarAli M. Abd El-Gawad Mohamed F. Omar, COMPARING THE EFFICIENCY IN DNA EXTRACTION BETWEEN ORGANIC PHENOL AND MAGNETIC BEADS METHODS, Vol.(16) No. (1) Jan 2018.
36. Noa Rivlin , Ran Brosh , Moshe Oren , and Varda Rotter. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. Department of Molecular Cell Biology. *Genes & Cancer* / vol 2 no 4 2011
37. SAJJA SUGUNA, NANDAL D , SURESH KAMBLE, AMBADASU BHARATHA, RAHUL KUNKULOL, GENOMIC DNA ISOLATION FROM HUMAN WHOLE

- BLOOD SAMPLES BY NON ENZYMATIC SALTING OUT METHOD, Vol 6,
Issue 6, 2014
38. Samuel Asamoah Sakyi , Bright Kumi , Richard Dadzie Ephraim , Kwabena Owusu Danquah , Derrick Osakunor , David Baidoe-Ansah, Modified DNA Extraction Technique for Use in Resource-Limited Settings: Comparison of Salting Out Methods versus QIAamp Blood Mini Kit| Vol 7 | Issue 3, May-June 2017
 39. Sergio Galindo-Rodriguez, EricAlle'mann, Hatem Fessi, and EricDoelker, PhysicochemicalParameters Associated withNanoparticle Formation in the Salting-out, Emulsification-Diffusion, and Nanoprecipitation Methods , Vol. 21, No. 8, August 2004.
 40. Yusuke Nakamura, Isolation of p53-target genes and theirfunctionalanalysis, Cancer Sci || vol. 95 | no. 1, January 2004
 41. Amani Abdel-Latifl and Gamal Osman. Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. Plant Methods 13:1 DOI 10.1186/s13007-016-0152-4 2017.
 42. DR. PHILOMENA GEORGE. P53 HOW CRUCIAL IS ITS ROLE IN CANCER. Dept .of Biotechnology, Karunya University, Coimbatore, Tamil Nadu, India. International Journal of Current Pharmaceutical Research Vol 3, Issue 2, 2011
 43. Dumont P, Leu J, Della Pietra AC III, George DL and Murphy M: The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedlydifferentapoptoticpotential. Nature genetics 33: 357-365, 2003.
 44. Köchl, Harald Niederstätter, and Walther Parson. DNA Extraction and Quantitation of Forensic Samples Using the Phenol–Chloroform Method and Real-Time PCR. Methods in MolecularBiology, vol. 297:Forensic DNA Typing Protocols,2005
 45. L. R. Weerakkody , C. Witharana. Comparison between the classical salting-out method and a newly developed method in extracting genomic DNA from Gram negative bacteria. Faculty of Medicine, University of Colombo, Sri Lanka.2017
 46. Noa Rivlin , Ran Brosh , Moshe Oren , and Varda Rotter. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. Department of MolecularCellBiology. Genes& Cancer / vol 2 no 4 2011
 47. Samuel AsamoahSakyi , Bright Kumi , Richard DadzieEphraim , Kwabena Owusu Danquah2 , Derrick Osakunor , David Baidoe-Ansah. Modified DNA Extraction Technique for Use in Resource-Limited Settings: Comparison of Salting Out Methods

- versus QIAamp Blood Mini Kit,. *Annals of Medical and Health Sciences Research* || Vol 7 | Issue 3 ,May-June 2017
48. Shunsuke Kato, Shuang-Yin Han, Wen Liu, Kazunori Otsuka, Hiroyuki Shibata, Ryunosuke Kanamaru, and Chikashi Ishioka. Understanding the function–structure and function– mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. Japan Edited by Bert Vogelstein, The Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center at Johns Hopkins, Baltimore, MD, March 25, 2003.
 49. Song HR, Kweon SS, Kin HN, Piao JM, Yun WJ, Choi JS, Hwang JE, Yoon JY, Kim HR, Park YK, Kim SH, Choi YD and Shin MH: p53 codon 72 polymorphism in patients with gastric and colorectal cancer in Korean population. *Gastric Cancer* 14(3): 248, 2011.
 50. Sumit Kumar, Vijay Walia, Maria Ray, Randolph C. Elble. p53 in breast cancer: mutation and countermeasures. *Frontiers in Bioscience* 12, 4168-4178, May 1, 2014.
 51. Suzanne J. Baker; Eric R. Fearon; Janice M. Nigro; Stanley R. Hamilton; Ann C. Preisinger; J. Milburn Jessup; Peter VanTuinen; David H. Ledbetter; David F. Barker; Yusuke Nakamura; Ray White; Bert Vogelstein. Chromosome 17 Deletions and p53 Gene Mutations in Colorectal Carcinomas., *Science, New Series* Vol. 244, No. 4901, pp. 217-221. Apr. 14, 2007.
 52. WALDEMAR LUTZ and EWA NOWAKOWSKA-ŚWIRTA. GENE P53 MUTATIONS, PROTEIN P53, AND ANTI-P53 ANTIBODIES AS BIOMARKERS OF CANCER PROCESS. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, Vol. 15, No. 3, 209—218, 2002.
 53. Yusuke Nakamura. Isolation of p53-target genes and their functional analysis. Laboratory of Molecular Medicine, Human Genome Center, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639. November 25, 2003.
 54. Daniela Kandioler-Eckersberger,² Carmen Ludwig, Margarethe Rudas, Sonja Kappel, Elisabeth Janschek, Catharina Wenzel, Hermine Schlagbauer-Wadl, Martina Mittlboeck, Michael Gnant, Günter Steger, and Raimund Jakesz. TP53 Mutation and p53 Overexpression for Prediction of Response to Neoadjuvant Treatment in Breast Cancer Patients. *Internal Medicine* Vol. 6, 50–56, January 2000.
 55. John W. Littlefield,. Chromosome 17p deletions and p53 gene mutations associated with the formation of malignant neurofibrosarcomas in von Recklinghausen

neurofibromatosis. Molecular Neurogenetics Laboratory . Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Vol. 87, pp. 5435-5439. April 4, 1990.

56. Pim D and Banks L: p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on
cell cycle progression. Int J Cancer 108: 196- 199, 2004.

ملخص:

تتكون دورة الخلية من سلسلة من الخطوات التي يمكن تنظيمها سلباً أو تنظيمها إيجاباً بواسطة عوامل مختلفة. من بين المنظمين السلبيين البروتين p53. يمكن أن يؤدي تغيير البروتين p53 أو تعطيله عن طريق الطفرة إلى الإصابة بالسرطان. يبدو أن هذه الطفرات هي أكثر التغيرات الجينية شيوعاً في السرطانات البشرية ، وخاصة سرطان الثدي. أجرينا في عملنا مقارنة تحليلية لبعض الدراسات في مناطق مختلفة (الجزائر وتونس والمغرب). تم استخدام طرق مختلفة لاستخراج الحمض النووي ، هاتان الطريقتان هما "التمليح" و "الفينولكلوروفورم". أتاحت التحليلات الجزيئية التي أجريت على النساء الجزائريات اكتشاف الأنماط الجينية المختلفة للطفرات المدروسة (R175H ، R248Q / R248W ، R249S ، R273H / R273C). ومع ذلك ، لم يتم تأكيد الارتباط بين هذه الطفرات وخطر الإصابة بسرطان الثدي بسبب قلة عدد العينات التي تمت دراستها. الكلمات المفتاحية: سرطان الثدي ، الطفرة ، جين p53 ، تفاعل البوليميراز المتسلسل

Résumé :

Le cycle cellulaire consiste en une série d'étapes qui peuvent être régulées négativement ou positivement par divers facteurs. Parmi les régulateurs négatifs se trouve la protéine p53. L'altération ou l'inactivation de p53 par mutation peut conduire au cancer. Cette mutations semblent les changements génétiques les plus courants dans les cancers humains, en particulier le cancer du sein. Dans notre travail, nous avons fait une comparaison analytique de quelques études dans différentes régions (Algérie, Tunisie et Maroc). Différentes méthodes sont été utilisées pour extraire l'ADN, ces deux méthodes sont le « Salting-out » et le « phénolchloroforme ». Les analyses moléculaires réalisées sur les femmes algériennes ont permis de détecter les différents génotypes des mutations étudiés (R175H, R248Q/ R248W, R249S, R273H/ R273C). Néanmoins, l'association entre ces mutations et le risque du cancer du sein n'a pas été confirmée à cause du nombre restreint d'échantillons étudiés.

Mots clés : cancer du sein , mutation , gène p53, PCR

Abstract:

The cell cycle consists of a series of steps which can be down regulated or up regulated by various factors. Among the negative regulators is the protein p53. The alteration or inactivation of p53 by mutation can lead to cancer. This mutations appear to be the most common genetic changes in human cancers, especially breast cancer. In our work, we made an analytical comparison of some studies in different regions (Algeria, Tunisia and Morocco). Different methods have been used to extract DNA, these two methods are the "salting-out" and the "phenolchloroform". The molecular analyzes carried out on Algerian women made it possible to detect the different genotypes of the mutations studied (R175H, R248Q / R248W, R249S, R273H / R273C). However, the association between these mutations and breast cancer risk has not been confirmed due to the small number of samples studied.

Keywords: breast cancer, mutation, p53 gene, PCR