



Université Mohamed Kheider 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

MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité : Biochimie Appliquée
Référence / 2021

Présenté et soutenu par :
Rofaida MESSALEM Et Fatima Zahra MENACER

Le: mercredi 30 juin 2021

Mutation des gènes de réparation (RAD51) et cancer du sein à propos des cas cliniques de la population Algérienne.

Jury:

Mme. Hayat AOURAGH	MAA	Mohamed kheider	Président
Mlle. Hanane ACHOUR	MAA	Mohamed Kheider	Rapporteur
Mme. Fatima BENABDALLAH	MAA	Mohamed Kheider	Examineur

Année universitaire : 2020-2021

Remerciements

Tout d'abord, nous remercions Dieu tout puissant, qui nous a aidés à mener à bien cette

Recherche scientifique et qui nous a aidés et nous a donné la santé et le bien-être

Nous exprimons nos profonds remerciements à notre encadreur Mme. ACHOUR

Hanane, pour tous les conseils et informations précieuses qu'elle nous a fournis, qui ont

contribué à enrichir le sujet de notre étude.

Dédicace

Je dédie ce travail à mes parents les plus chers dans mon cœur, pour leur soutien moral et matériel durant tous mes années d'études, que dieu mes les gardes.

Ma mère Khadidja, et mon père Kadeur.

A mes chères frères: Hamza, Nacer eddine, Adam

A mes sœurs : Lobna, Manal, Ismahan, Hawa et ma sœur Djihad qui est je n'oublierai jamais

A ma Grande mère: Fatima

A mes tantes: Yamina, Samia, Halima, Nadjat

A mes oncles: Abed Razzaq, Maamer

A mes cousins: Khawla, Houda, Khadidja, Sabrine, Ahmed

A l'épouses de mes frères: Maroua, Rowayda

Aux petites: Arkan, Nour el houda, Nidhal, Khawther, Abed Rahman, Abed Raouf, Sabine

A tous mes collègues de promotion 2021

A toutes la famille « MESSALEM »

☆ ROFAIDA ☆

Dédicace

Je dédie ce travail

A mes très chers parents, mon père Sadek et ma mère Naziha source de vie,
d'amour et d'affection.

Mes frères : Ali abdlrouf, Fateh, Ibrahim, yahia et Haroun

Mes sœurs : Meriem, Aicha, Nour elyakine, Hiba et Asil

A ma famille, mes proches et à ceux qui me donnent de l'amour et de la vivacité

A tous mes amis qui m'ont toujours encouragé, et à qui je souhaite plus de
succès.

☆ FATIMA ☆

Sommaire

Remerciements

Dédicace

Sommaire

Liste des Tableaux	I
Liste des Figures	II
Liste des abréviations	III
Introduction	1

Première Partie:SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1. CANCER DU SEIN

1.1.La glande mammaire normale	2
1.2.Le cancer du sein	2
1.2.1.Qu'est ce qu'un cancer du sein.....	2
1.2.2.Épidémiologie de cancer de sein en Algérie	3
1.2.3.Les facteurs de risques associés au cancer du sein.....	4
1.2.4.La classification de cancer du sein	5
1.2.4.1. Classification moléculaire.....	5
1.2.4.2. Classification histologique.....	6
1.3. Déterminants génétique de cancer du sein.....	6
1.3.1. Amplification d'oncogène.....	6
1.3.2. L'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs.....	6
1.3.3. Mutation des gènes gardiens de l'intégrité du génome.....	7

Chapitre 2. GENE RAD51

2.1. Gène RAD51.....	8
2.2. Protéine RAD51 recombinaison.....	8
2.2.1. La structure	8
2.2.2. Le rôle de RAD51 dans la réparation des dommages d'ADN par recombinaison homologue	8

2.3. Les polymorphismes mononucléotidique (SNPs) de gène RAD51 et progression tumorale.....	9
--	----------

Deuxième Partie: PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 3.MATERIEL ET METHODES

3.1. Matériels biologique	11
3.1.1. La population Algérienne.....	11
3.1.2. La population Saoudienne	11
3.1.3. La population Egyptienne	11
3.1.4. La population Turque	11
3.2. Méthode de travail.....	12
3.2.1. Préparations des échantillons	12
3.2.1.1. Tissus mammaire inclus en paraffine.....	12
3.2.1.2. Sang frais.....	13
3.2.2.Extraction d'ADN	14
3.2.2.1.Selon l'équipe de BOUKHARI Dalale en 2014	14
3.2.2.2.Selon l'équipe de Mohammad AL HAMAD et <i>al</i> en 2021	15
3.2.2.3.Selon l'équipe de Tuğcan KORAK et <i>al</i> en 2017	15
3.2.2.4.Selon l'étude de Ebtsam R ZAHEH et <i>al</i> en 2017.....	16
3.2.3.Détermination de la concentration et de la pureté de l'ADN.....	16
3.2.4.Recherche du polymorphisme mononucléotidique (SNP) sur RAD51	16
3.2.4.1. Amplification du fragment d'ADN d'intéret par PCR.....	17
3.2.4.2. Recherche des mutations.....	18

Chapitre 4. RESULTATS ET DISCUSSION

4.1.Résultats	22
4.1.1.La population Algérienne.....	22
4.1.1.1.Analyse des produits PCR obtenus.....	22
4.1.1.2. Profils des produits de PCR digéré par l'endonucléase de restriction <i>BstNI</i>	22

4.1.1.3. Fréquences génotypiques et alléliques de polymorphisme G135C.....	24
4.1.2.La population Turque.....	24
4.1.3.La population Egyptienne.....	25
4.1.4.La population Saoudienne.....	26
4.2.Discussion.....	27
4.2.1.Discussion analytique.....	27
4.2.2.Discussion des résultats:.....	29
Conclusion et perspectives.....	31
Bibliographie.....	32

Annexes

Résumés

Liste des Tableaux

Table 1. les polymorphismes mononucléotidiques de gène RAD51 (Beata Smolarz, 2019)	10
Table 2. Représente les caractéristiques des femmes et des échantillons utilisés pour l'étude pour les 4 populations : Algérienne, Saoudien, Egyptien et Turque.....	12
Table 3. les méthodes utilisées pour la recherche de polymorphismes mononucléotidiques sur RAD51 pour les quatre populations.....	17
Table 4. Les amorces utilisées pour amplifier le fragment d'ADN d'intérêt	17
Table 5. Programme d'amplification par PCR de la séquence cible de gène étudié.....	18
Table 6. Analyse de polymorphisme de séquence cible de RAD51 par enzymes de restriction.	19
Table 7. la digestion enzymatique des produits de PCR pour l'échantillon égyptien et turque	20
Table 8. Distribution des génotypes de polymorphisme RAD51 G135C d'après résultat de ...	23
Table 9. Les fréquences alléliques et génotypiques de polymorphisme G135C du gène RAD51 chez les patientes atteintes d'un cancer du sein et les témoins	24
Table 10. Les fréquences alléliques et génotypiques de la variante RAD51 (G135C)	25
Table 11. Les fréquences des génotypes et des allèles de polymorphisme de gène RAD51	26
Table 12. Fréquences génotypiques de polymorphisme du gène RAD51 chez les échantillons du cancer du sein et de contrôle	27

Liste des Figures

Figure 1. L'anatomie de la glande mammaire (www.depistagesein.ca/sante-anatomie.html)... 2	2
Figure 2. Nombre de nouveau cas du cancer du sein enregistré dans certaines régions du monde (CANCER TODAY, 2020). 3	3
Figure 3. Incidence et mortalité de cancer du sein dans les pays d'Afrique du Nord (CANCER TODAY, 2020)..... 4	4
Figure 4. Classification moléculaire du cancer du sein (Gautam K Malhotra, 2010) 5	5
Figure 5. Le mécanisme de réparation des casseurs double brin de l'ADN par recombinaison homologue(RH) (Khek-Chian Tham, 2016) 9	9
Figure 6. Les étapes de préparation des tissus inclus dans la paraffine isolée à partir des patients et témoins 13	13
Figure 7. Caractérisation schématique de l'apparition ou la disparition du site de reconnaissance pour l'endonucléase de restriction <i>Bst</i> NI porté sur un fragment de 157 pb au niveau du gène RAD51 (BOUKHARI, 2014). 19	19

Liste des abréviations

ADN	: Acide désoxyribonucléique
ATM	: ataxia-telangiectasia mutated
ATP	: adenosine triphosphate
BRCA1	: Breast Cancer 1
BRCA2	: Breast Cancer 2
DSB	: Double Strand Break
Kb	: Kilo base
NHEJ	: Non homologous end joining
Pb	: paire de base
PCR	: Polymerase Chain Reaction.
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
RH	: Recombinaison Homologue
RRH	: Réparation par Recombinaison Homologue
SNP	: Simple Nucleotide Polymorphism
U.V	:Ultras-violets
XP	: Xeroderma pigment osum
XRCC2	:X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 2
XRCC3	: X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 3

Introduction

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez les femmes dans le monde, et représente la première cause de mortalité parmi les cancers gynécologiques, avec plus de 2 million de nouveaux cas sont diagnostiqué chaque années (Wild.C, 2018). La majorité des cancers du sein sont sporadiques (90-95%), probablement due à une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux, et seulement 5% à 10% des cas sont liés à une prédisposition héréditaire (Vesna Dapic, 2005).

Le génome humain subit constamment des dommages. Il a été estimé que plus de 10000 lésions sont spontanément générées dans la cellule de mammifère par jour (Lindahl, 1993), et peuvent être d'origine endogène (l'exposition aux œstrogènes, la ménarche précoce,..) ou exogène (irradiations ionisantes). Parmi ces dommages les plus préjudiciables, les casseurs de double brin d'ADN(DSB). S'il n'est pas corrigé, les DSB entraîne une perte de segments chromosomiques, menaçant la survie des cellules .d'autre part, s'il est mal réparés par la cellule, induit la déstabilisation génomique qui peut conduit finalement à la dérégulation de la transcription et à la formation des tumeurs malignes. Ils sont réparés par deux mécanismes principaux : la jonction d'extrémités d'ADN non homologue (NHEJ) et la recombinaison homologue RH (Hanna Romanowicz-Makowska, 2011).

Le gène RAD51 joue un rôle principal dans la recombinaison homologue (RH) soit dans la méiose, soit pour réparer les cassures double brin de l'ADN (DSB), où il favorise l'invasion des extrémités cassées de l'ADN endommagé dans la chromatide sœur intacte et interagit directement avec autres protéines telle que XRCC2, XRCC3, BRCA1, BRCA2, etc. Un polymorphisme mononucléotidique dans la région non codante (5'-UTR) de gène RAD51 (une substitution G à C en position 135) a été étudié de manière intensive dans le cancer du sein. De nombreux chercheurs ont significativement corrélé la variante G135C avec un risque élevé de développement du cancer du sein. Au contraire, d'autres ont suggéré que n'est pas une relation significative entre ce polymorphisme et la susceptibilité au cancer du sein (Mohamed Al Hamad, 2021).

L'objectif de notre travail est de rechercher et analyser des études qui sont travaillés sur la mutation G135C et nous allons essayer de déterminer l'effet de cette mutation et sa relation avec le risque de cancer du sein chez les femmes algériennes.

Première Partie

Synthèse Bibliographique

Chapitre 1

Cancer du sein

1.1 La glande mammaire normale

La glande mammaire est une glande exocrine hémisphère dont la fonction est la sécrétion lactée. Elle est implanté dans les tissus adipeux sous cutanée de la paroi thoracique et rattachée à la peau par ses canaux excréteur (Rozenbaum, 2003). Elle repose sur les muscles grandes pectoraux et dentelé antérieurs, auxquels elle fixée par une couche de fascia profond composée de tissus conjonctif dense irrégulier (Tortora & Grabowski Reynolds, 2001).

Chaque glande est constituée de 15 à 20 lobes, séparés par des tissus graisseux et conjonctif et subdivisée en plusieurs lobules, qui renferment les alvéoles de la glande mammaire, partie sécrétoire du lait (Tortora & Grabowski Reynolds, 2001).

Chaque lobe a un canal galactophore qui issue de l'assemblage de plusieurs tubules secondaires et s'élargisse près de mamelon pour formé le sinus lactifère, où emmagasiner une quantité de lait qui ensuite passe dans les conduits lactifères et enfin dans le mamelon (Tortora & Grabowski Reynolds, 2001)(figure1).

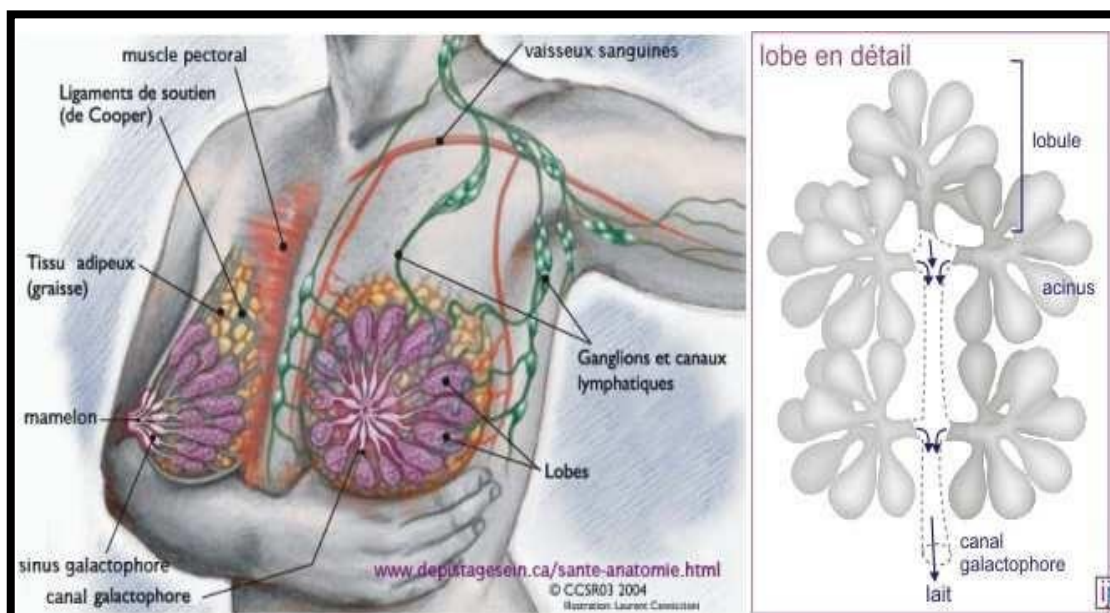


Figure 1. L'anatomie de la glande mammaire (www.depistagesein.ca/sante-anatomie.html)

1.2. Le cancer du sein

1.2.1. Qu'est ce qu'un cancer du sein

La notion de "Cancer du sein" relève d'une nomenclature générique qui fait référence à tout un ensemble de proliférations incontrôlée et indéterminé de la glande mammaire, due à l'accumulation de multiples altérations génomique (Alessandro Bombonati, 2011). Il en existe

différents types de cancer du sein qui n'évolue pas de la même manière. Certains sont « agressifs » et évoluent très rapidement, d'autres plus lentement (FRANCOIS GALLON).

Le terme de « cancer du sein » ne désigne que les tumeurs malignes, potentiellement agressives du sein tandis que le terme de « tumeur du sein » désigne à la fois les tumeurs malignes et bénignes. Le terme « carcinome » ou « épithélioma » est parfois utilisé, comme synonyme de « cancer » (Alessandro Bombonati, 2011). En réalité le carcinome est un terme spécifique de morphologie microscopique (histologique) qui désigne les types les plus fréquents de cancer du sein d'origine épithéliale (Libby M. Morimoto, 2002).

1.2.2.Épidémiologie de cancer de sein en Algérie

Globalement, le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez les femmes, tant en termes de mortalité qu'en termes d'incidence, à la fois dans les pays développés et en développements. Selon GLOBOCAN 2020 (CANCER TODAY, 2020), plus de 2,3 millions de femmes ont reçu un diagnostic de cancer du sein dans le monde et 684 996 sont décédées. Son incidence varie de 45.4 pour 100.000 femme en Asie, à 23.5 pour 100.000 femmes en Europe, et < 10pour 100.000 femme en Afrique,Océanie et l'Amérique latine et caraïbes (figure 2).

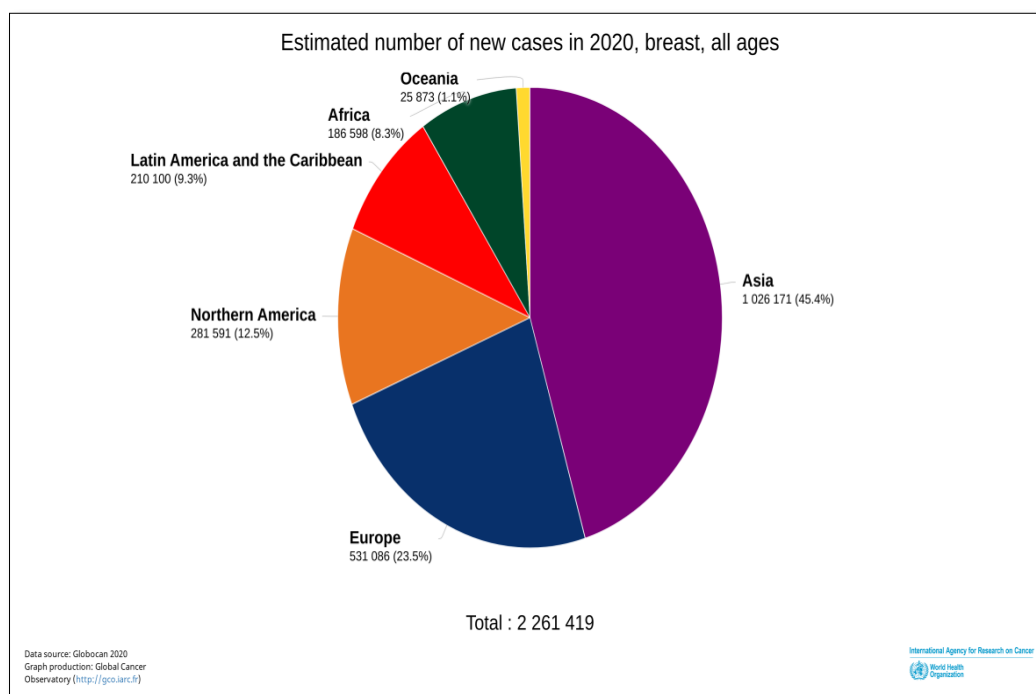


Figure 2. Nombre de nouveau cas du cancer du sein enregistré dans certaines régions du monde (CANCER TODAY, 2020).

En Afrique du Nord, l'Algérie est le deuxième pays après le Maroc en termes de nombre des cas de cancer du sein enregistré en 2020 (figure 3). Il occupe la première place Des cancers chez les femmes algériennes et devenu un problème de santé publique majeur, avec 12 536 cas diagnostique et une incidence standardisée estimée à 55.8/100000 femmes (CANCER TODAY, 2020).

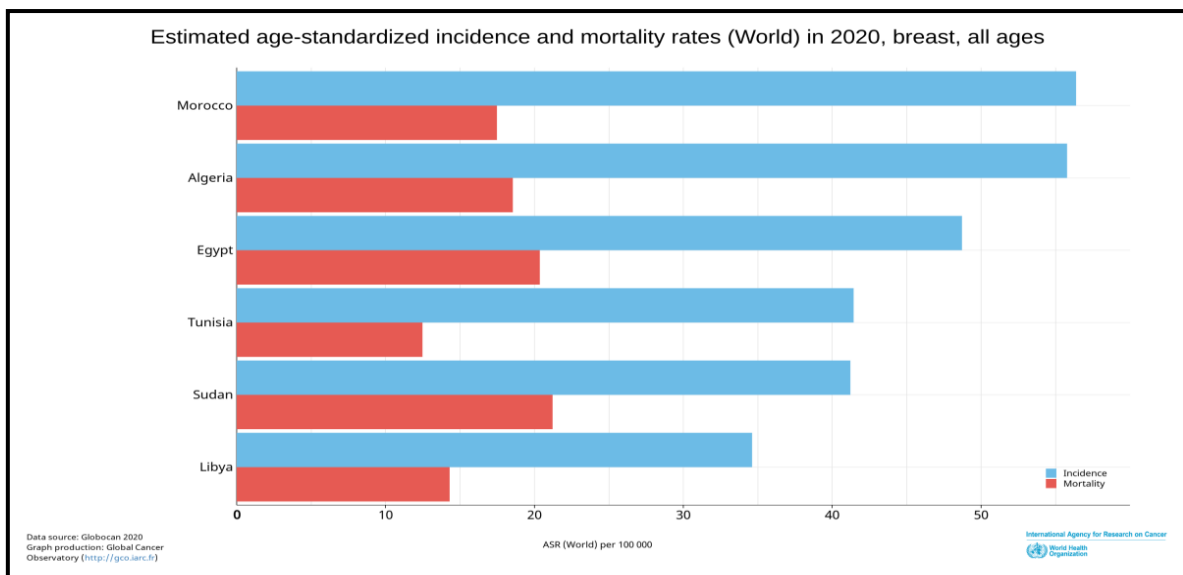


Figure 3. Incidence et mortalité de cancer du sein dans les pays d'Afrique du Nord (CANCER TODAY, 2020)

1.2.3. Les facteurs de risques associés au cancer du sein

L'âge : est le facteur de risque le plus important de cancer du sein, avec une courbe d'incidence augmentant de 30 à 70 ans. Certaines études ont montré que seulement 20% des femmes de moins de 50ans sont touchées par le cancer du sein, par contre chez la femme plus de 50ans le risque de développer cette maladie est multiplié par 4. C'est d'ailleurs, pour cette raison que les femmes sont invitées à réaliser des tests de dépistage (mammographie) tous les deux ans à partir de 50ans (J Ferlay, 2012).

Les facteurs hormonaux : le cancer du sein est une pathologie hormono-dépendante, en particulier via les œstrogènes. Des études ont montré que l'apparition des règles à un âge précoce (avant 12ans) ou alors la ménopause tardive (après 55ans) peut augmenter le risque de développer un cancer du sein, grâce à l'exposition plus long temps à l'œstrogène, on peut trouver aussi : l'absence de grossesse ou la première grossesse après 40ans, l'usage de la pilule.

Contraceptive à la hormonale entre 20 et 29 ans pendant plus de 5 ans augmente le risque de cancer du sein (Société canadienne du cancer).

Les facteurs liés aux habitudes de vie et nutrition : la consommation de viande contient de la graisse et des agents cancérigènes, ainsi le tabagisme, la consommation abusive d'alcool, l'obésité et l'inactivité physique accroît le risque de développer le cancer du sein (Amina, 2017).

L'hérédité : il s'agit de la transmission d'une mutation génétique touche essentiellement les gènes BRCA1 et BRCA2 responsable du développement du cancer d'une génération à une autre. En effet, il suffit qu'un seul des deux parents soit porteur de l'anomalie, pour que l'enfant ait le risque de 50% d'être à son tour porteur de cette anomalie. Il s'agit d'une transmission autosomique dominante (J M Hall, 1990).

1.2.4 .La classification du cancer du sein

1.2.4.1. Classification moléculaire

Perou et son équipe ont été les premières en 2000 à subdiviser les cancers du sein en sous-groupes selon leur profil d'expression génétique basé sur l'analyse de plus de 40000 gènes, il ont identifié cinq sous-types de carcinome en les comparant au tissu normal :Luminal A, Luminal B,HER2-like, basal like et normale-like .ce dernière type fut ensuite écarté car il correspondait à un biais de sélection de certaines tumeurs contaminé par du tissu mammaire normale (Charles M. Perou, 2000).

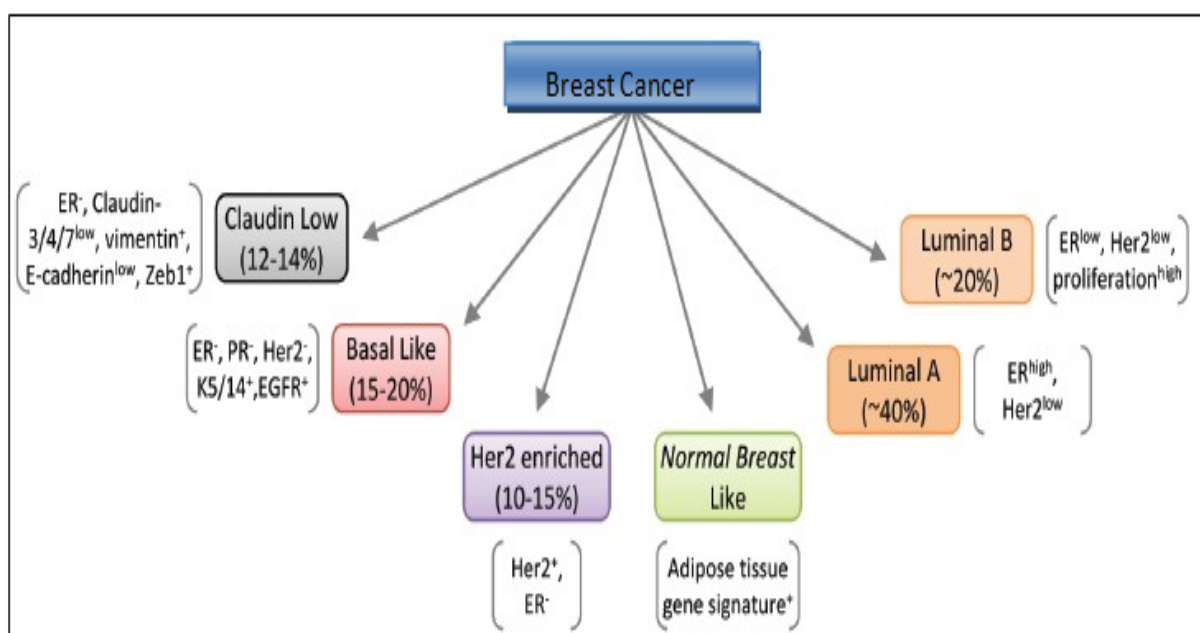


Figure 4.Classification moléculaire du cancer du sein (Gautam K Malhotra, 2010)

1.2.4. 2. Classification histologique

La plupart des tumeurs malignes du sein sont des adénocarcinomes développés soit à partir des cellules épithéliales des lobules glandulaires (carcinomes lobulaires) soit à partir des cellules épithéliales des canaux galactophores (carcinomes canalaire) et représentent environ 98% des carcinomes mammaires. Le carcinome est souvent infiltrant, donc peuvent quitter sa tissus d'origine et envahir les tissus voisines, ses formes les plus fréquentes sont le carcinome canalaire infiltrant (85%) et les moins fréquents sont le carcinome lobulaire infiltrant (5%), Mais il existe d'autres formes rares de carcinomes infiltrant, tels que les carcinomes médullaires, mucineux, tubuleux, apocrines et la maladie de Paget. Dans de rares cas, les Carcinomes mammaire restent dans leurs tissus d'origine sans infiltrer les tissus voisins, donc appelée carcinome insitu (Tavassoli FA, 2003).

1.3. Déterminants génétique de cancer du sein

La cancérogenèse mammaire est un phénomène due à des altérations génétiques qui perturbent l'équilibre entre stimulation et inhibition de la prolifération cellulaire. Elle impliquant plusieurs gènes, dans les formes héréditaires comme dans les formes sporadiques. Les modifications les plus fréquents décrits dans le cancer du sein sont des amplification d'oncogènes, et des mutations ou délétions de gènes suppresseurs de tumeurs et de gènes de réparations d'ADN.

1.3.1. Amplification d'oncogène

L'oncogène est un gène altéré impliqué dans la transformation d'une cellule normale en cellule tumorale, l'équivalente de ce gène est appelée proto-oncogène dont la produit (protéine) est intervient pendant le cycle cellulaire et régule la prolifération cellulaire. Les altérations génétiques de ces gènes peuvent concerner la partie régulatrice ou la partie codante et doit toucher 2allèles pour contribuer a la progression tumorale. Dans le cancer du sein les proto-oncogène plus fréquemment muté sont : c-erbB2, c-myc et ccdn1 (Batoul, 2016).

1.3.2. L'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (anti-oncogène)

Les gènes suppresseurs de tumeur sont impliqué dans la réparation de l'ADN, contrôlent le moment et le niveau d'expression des oncogènes et sont des régulateurs négative de la prolifération. Ces gènes ont été classés en 1997 par K.W. Kinzler et Bertolino (Vogelstein, 1997), en 3 catégories : les inhibiteurs du développement des tumeurs en contrôlant la prolifération cellulaire ou en activant l'apoptose, comme le gène p53 (gènes gatekeeper), les modulateurs du microenvironnement des cellules tumorales par la régulation

des protéines d'adhésion et facteurs de prolifération (gènes landscaper) et qui sont impliqués dans le maintien de la stabilité du matériel génétique, comme ATM, XP du, BRCA1 et BRCA2 (gènes caretaker). Il existe en effet des gènes suppresseurs de tumeurs ayant à la fois des propriétés de « gatekeeper » et de « caretaker ». (BERTOLINO, 2002).

1.3.3. Mutation des gènes gardiens de l'intégrité du génome

Ces gènes contrôlent la stabilité et l'intégrité du génome cellulaire, on les retrouve dans tous les organismes vivants, des procaryotes aux humains. Exemple : RAD51.

Chapitre 2

Gène RAD51

2.1. Gène RAD51

Le gène RAD51 est située au niveau de chromosome 15 dans la position 15.1 (15q15.1), comporte au moins 30kb et 10 exons. la transcription de cette gène induit pendant la phase S et G2 du cycle cellulaire et donne la protéine RAD51 (Hellgren, 1996).

2.2. Protéine RAD51 recombinase

RAD51, homologue eucaryote de la protéine RecA d'*E.coli*, hautement conservé de la bactérie jusqu' à l'homme. Le RAD51 humain (HsRAD51) comporte de 339 acides aminés (36,966Da), possède une activité ATPase qui est activée par sa liaison à l'ADN et est essentiel pour la prolifération et la survie des cellules des vertébrés. Joue un rôle important dans la réparation des dommages d'ADN par la recombinaison homologue, peut interagir avec d'autres protéines tel que RPA, BRCA2 et RAD52 (The human protein Atlas).

2.2.1. La structure

RAD51 possède un long domaine N-terminal, un domaine central appelée « core » et un court domaine C-terminal (Akira Shinohara, 1993), le domaine central possède deux motifs de liaisons de nucléotide, appelée Walker A et B qui lient le RAD51 à l'ADN et hydrolysent l'ATP (Masahiro Kawabata, 2005), un motif de polymérisation qui assure le contact entre les monomères de RAD51 pour former un filament se situant au niveau du linker entre le domaine N- et C-terminal et ce motif peut interagir aussi avec le motif BRC de BRCA2. deux boucles flexibles L1 et L2 au niveau de domaine central et le domaine N-terminal assure aussi l'interaction de RAD51 avec l'ADN (H Aihara, 1999).

2.2.2. Le rôle de RAD51 dans la réparation des dommages d'ADN par recombinaison homologue

Suite à l'induction des DSB par les agents endommageant l'ADN, la RH commence par le processus de résection initié par le complexe MRN/CtIP, puis les extrémités sont prises en charge par les nucléases et/ou les hélicases, pour créer des extrémités 3' sortantes d'ADN simple brin. Ces extrémités d'ADN sont d'abord stabilisées par des facteurs tels que RPA qui permet le recrutement de RAD52-BRCA2 pour faciliter la formation du filament de RAD51. La formation d'un filament de nucléoprotéine par RAD51 sur l'ADN simple brin, permet l'envahissement du brin homologue et la synthèse d'ADN. L'étape de résolution peut conduire à la formation des croisements appelés, crossing over (CO) ou à une résolution sans crossing over (NCO) (Khek-Chian Tham, 2016).

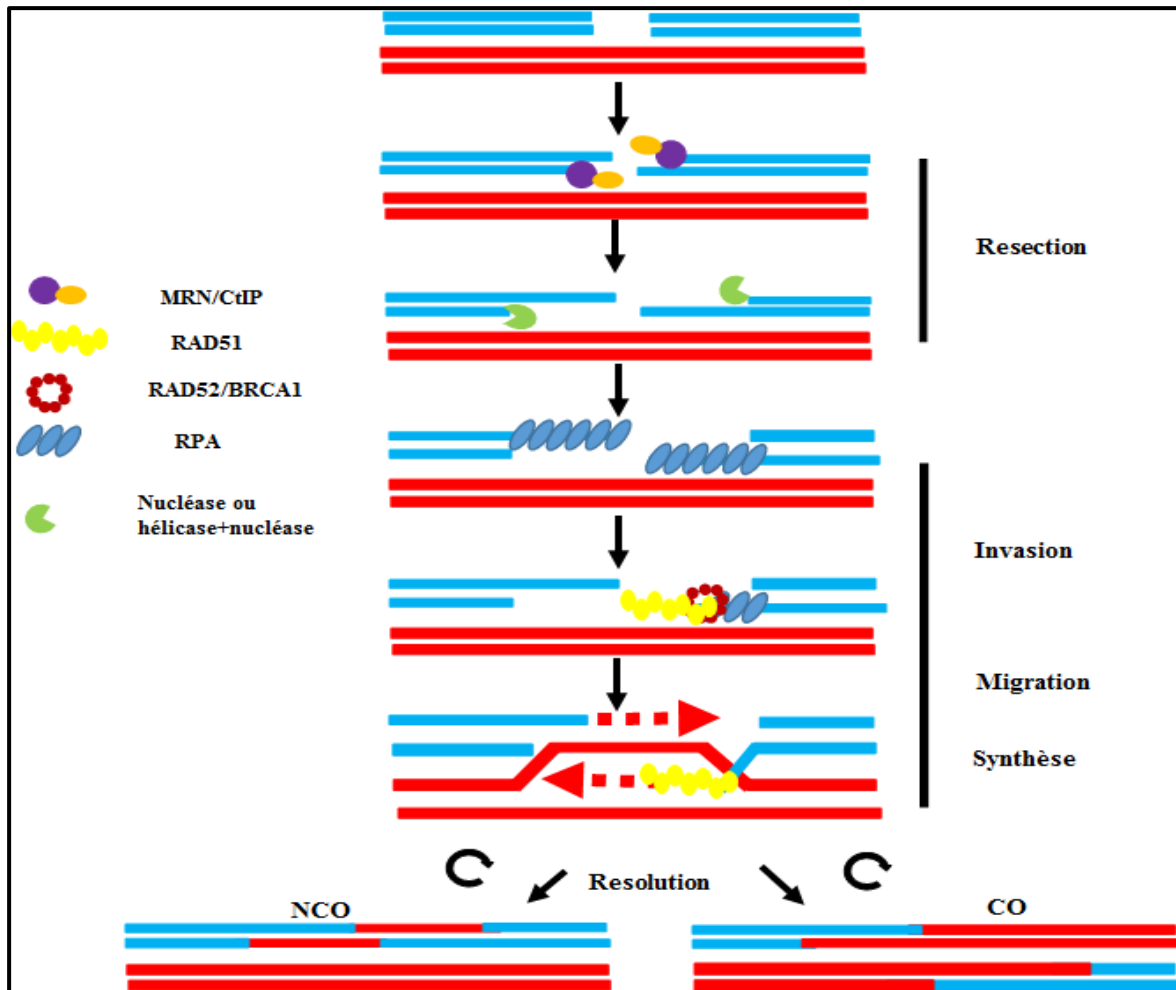


Figure 5.Le mécanisme de réparation des casseurs double brin de l'ADN par recombinaison homologue(RH) (Khek-Chian Tham, 2016)

2.3. Les polymorphismes mononucléotidique (SNPs) de gène RAD51 et progression tumorale

Polymorphisme RAD51 G135C (rs1801320) etG172T (rs1801321)

Les deux sont situées dans la région non codante 5'-UTR, ils pourraient affecter la stabilité et /ou l'efficacité de traduction de l'ARNm et entraînent une modification du niveau et de la fonction du produit polypeptidique (protéine RAD51), qui pourrait influencer l'activité du complexe protéique de la réparation d'ADN, incluant BRCA1, BRCA2 et RAD51 (Hasselbach, 2005)(Figure 1).

Table 1. les polymorphismes mononucléotidique de gène RAD51 (Beata Smolarz, 2019)

Allèle	Localisation de SNPs	Changement de nucléotidique	Changement protéique	changement de site de restriction
Allèlesauvage	5'-UTR (région non codante)	Présence d'une guanine(G) en position 135	Pas changement	Il ya un site de restriction <i>BstNI</i> sur un forgement de 157pb autour du nucléotide 135
Allèlemuté G135C		Substitution de (G) en(C)		Absence le site de restriction <i>BstNI</i>
Allèlesauvage		Présence d'une guanine(G) en position 172		Il ya un site de restriction <i>NgoMIV</i> sur un fragment de 131pb
Allèlemuté T172T		Substitution de (G) en(T)		Absence le site de restriction <i>NgoMIV</i>
Allèle sauvage	promoteur	Présence d'une adénine (A) en position -4719		/
Allèlemuté -4719A/T		Substitution de (A) en (T)		/
Allèle Sauvage		Présence d'une adénine (A) en position -4601		/
Allèle Muté -4601A/G		Substitution de (A) En (G)		/

Deuxième partie
Partie Expérimentale

Chapitre 3

Matériels et méthodes

Dans ce travail, nous avons essayé d'analyser une étude qui a été réalisé sur la population Algérienne, pour la recherche de polymorphisme nucléotidique de gène de réparation RAD51 et détermine son association avec le cancer du sein chez les femmes Algériennes. Dont le résultat de cette étude a été comparé avec les résultats des différentes populations : Egyptienne, Saoudienne et Turque. Toujours dans le but d'établir une relation entre ces différents polymorphismes et le risque d'apparition et/ou de développement de cancer du sein.

3.1. Matériels biologique

3.1.1. La population Algérienne

Dans une étude menée par BOUKHARI Dalale en 2014(BOUKHARI, 2014), 37 échantillons de tissus mammaires utilisés, dont ils ont été préalablement conservées dans des blocs de paraffine et fourni par le service d'anatomopathologie du CHU-Batna, Algérie. Sachant que, 30 cas cancéreux, leur âge moyen est de 47ans et 7 témoins atteints d'adénofibrome et leur âge moyen est de 22ans (tableau 2).

3.1.2. La population Saoudienne

L'équipe de Mohammad AL Hamad et *al* en 2021 (Mohammad Al Hamad, 2021)ont été utilisé 103 échantillons qui sont des tissus mammaires pathologiques (appartiens aux femmes diagnostiquées pour un cancer du sein) (tableau 2). Le recrutement des malades a été effectué au niveau du service d'anatomopathologie d'hôpital de l'Université King Fahd à khobar en Arabie saoudite dont les pièces ont été préalablement fixées au formol et inclus en paraffine (FFPE).

3.1.3. La population Egyptienne

L'étude de Ebtsam R Zaher et *al* en 2017 (Ebtsam R. Zaher, 2017)a inclus 480 femmes divisé en deux groupes, 248 cas cancéreux et 232 femmes témoins (tableau 2). Le recrutement des malades a été effectué au niveau de l'institut de recherche médicale, Université d'Alexandrie, Alexandrie, Egypte. Le prélèvement sanguin préconisé pour l'extraction de l'ADN est recueilli stérilement dans un tube en présence d'EDTA.

3.1.4. La population Turque

L'étude de Tuğcan Korak et *al* en 2017(Tuğcan Korak, 2017)a porté sur 908 femmes dont 548 des femmes atteintes de cancer du sein et 360 femmes témoins (Tableau2). Le

Groupe des patientes étaient recrutées dans les départements de chirurgie générale de la Faculté de médecine de Marmara et de l'Université de Kocaeli en Turquie.

Table 2. Représente les caractéristiques des femmes et des échantillons utilisés pour l'étude pour les 4 populations : Algérienne, Saoudien, Egyptien et Turquie.

population	Echantillon		Nombre d'échantillon		Diagnostique		Moyen d'âge	
	Patients	Témoins	Patients	Témoins	Patients	Témoins	Patients	Témoins
Algérienne	Tissus mammaires Pathologiques	Tissus mammaires Pathologiques	30	7	Cancer du sein	adénofibrome	46 ans	22 ans
	Tissus mammaires Pathologiques	Sang et Tissus normales	103	sang (60) tissus normales (20)	Cancer du sein sporadique	Femmes normales en Bonne santé	/	/
Saoudienne	Sang	Sang	248	232	Cancer du sein primaire sans métastase		48 ans	48 ans
Égyptienne	Sang	Sang	548	360	Cancer du sein Sporadique		50 ans	49 ans

Toutes les études ont été approuvées par le comité d'éthique et tous les sujets ont donné leur consentement éclairé pour participer à l'étude.

3.2. Méthode de travail

3.2.1. Préparations des échantillons

Avant l'extraction d'ADN génomique, il faut préparer d'abord les échantillons prélevés quel que soit le tissu ou le sang.

3.2.1.1. Tissu mammaire inclus en paraffine

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 (Larissa A. Pikor K. S., 2011). Une étape de déparaffinage puis réhydratation est indispensable pour commence l'étude (Figure 6) (BOUKHARI, 2014).

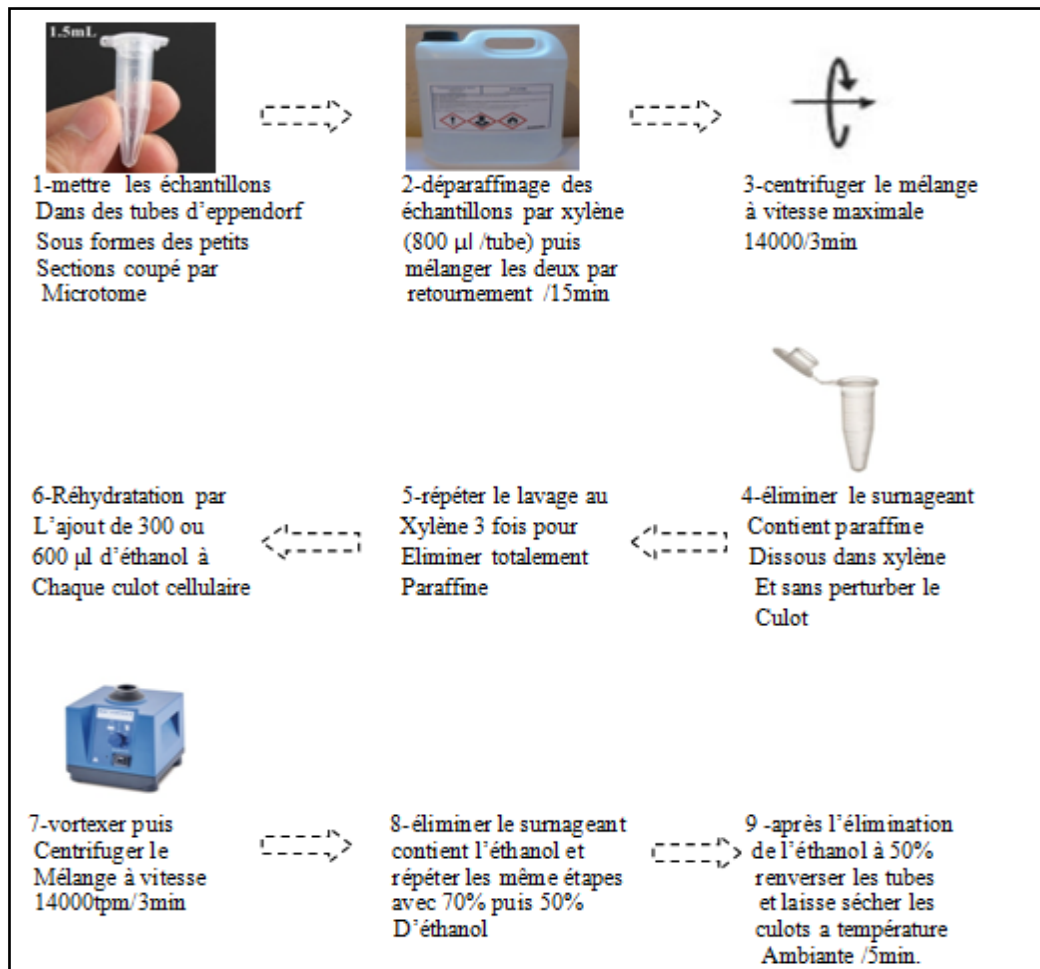


Figure 6. Les étapes de préparation des tissus inclus dans la paraffine isolée à partir des patients et témoins

3.2.1.2. Sang frais

Le prélèvement sanguin est recueilli stérilement dans un tube d'EDTA, qui est un chélateur ou un inhibiteur de l'action des enzymes nucléases, permettant ainsi de préserver l'intégrité de l'ADN (Fatiha, 2014). La préparation des échantillons de sang pour extraire l'ADN, se fait selon les étapes suivantes (Fatiha, 2014):

* La séparation des leucocytes sanguins qui représente la source d'ADN aux globules rouges par la lyse hypotonique de ces dernières (hémolyse) :

-ajouter 1 volume de solution de lyse des GR à 1 volume de sang (1 :1) et incubé les deux de 20 à 30 min à 4°C ;

- centrifuger le mélange à 1500 g pendant 15 min à 4°C ;

- éliminer le surnageant et garder le culot ;
 - ajouter 500µl de tampon de lyse des globules rouges au culot, bien agiter par vortex et incubé 20 min à 4°C ;
 - centrifuger à 1500 g pendant 15 min à 4°C ;
 - éliminer le surnageant (débris de GR) et récupérer le culot (leucocyte) ;
 - sur ce culot, la même opération est effectuée une autre fois pour éliminer totalement les GR ;
 - à la fin, laisser les tubes sécher 5 min à température ambiante.
- *Au dernier lavage, le culot des leucocytes obtenus doit être bien blanc et débarrassé de toute trace d'hémoglobine et ensuite utilisé pour l'extraction d'ADN.

Alors que l'équipe de Ebtsam R Zaher et *al* en 2017 a été utilisée la centrifugation en gradient par Ficoll-Paque Plus (Biochrom AG, Berlin, Allemagne) pour isoler la couche leucocytaire. cette méthode consiste à centrifuger le sang déposé dans un tube conique, à l'aide ficoll-paque(solution de polysaccharide) a une densité de 1,077 à 20°C .en raison de leur densité plus élevée les érythrocytes et les granulocytes traversent la solution de sucrose et forment un culot au bas du tube, tandis que les cellules mononuclées et les plaquettes en raison de densité plus faible s'accumulent au-dessus de celle-ci (LYPHBANK).

3.2.2. Extraction d'ADN

3.2.2.1. Selon l'équipe de BOUKHARI Dalale en 2014

L'extraction de l'ADN a été réalisée à partir des cellules déparaffinées et réhydratées et selon le protocole de Pikor L.A. et *al*(Larissa A. Pikor K. S., 2011)modifié par l'équipe de BOUKHARI Dalale (BOUKHARI, 2014) :

- 1-ajouter 315µl de tampon de lyse + 5 à 10 µl de protéinase k (20mg/ml) aux culots cellulaire ;
- 2-Incuber le mélange à 55°C pendant 1h 30minet vortexer les tubes chaque 5 à 10 min ;
- 3-Ajouter 100 µl NaCl 6 M pour précipiter les protéines ;
- 4-vortexer la somme pendant 6min puis centrifuger à vitesse 13000 tmp/10min ;
- 5- Transférer le surnageant (presque 250 µl/tube), contenant l'ADN, dans un nouveau tube Eppendorf 1,5 ml ;

6-pour précipiter l'ADN et séparé a les autres contenues, ajouter 200 µl isopropanol au surnageant, retourner et secouer le mélange jusqu'à l'observation d'une pelote blanchâtre d'ADN ;

7-centrifuger les tubes à vitesse 13000 tpm/10min, afin éliminé le surnageant (isopropanol) et garder le culot ;

8-ajouter 300 µl d'éthanol au culot d'ADN puis centrifuger quelques secondes, à la fin éliminer le surnageant (éthanol). Sécher les culots d'ADN à température ambiante pendant 3 à 5 min pour éliminer toutes les traces d'éthanol ;

9-Suspendre les échantillons d'ADN extraits dans l'eau distillée (30 µl d'eau distillée dans chaque tube). Incuber les échantillons à 50°C pendant 10 min.

3.2.2.2. Selon l'équipe de Mohammad AL Hamad et al(Mohammad Al Hamad, 2021)

L'ADN a été extrait à partir de tissus cancéreux et l'autre normale paraffinée (deux coupes de 5 µm pour chacune) par l'utilisation de QIAamp DNA FFPE Tissue Kit et à partir de sang de volontaires normaux par l'utilisation de QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Allemagne).Après l'ADN était purifié à l'aide d'un système entièrement automatisé (QIAcube, Qiagen) avec un volume finale de 50µlpour chaque échantillon selon les instructions du fabricant.

3.2.2.3. Selon l'équipe de Tuğcan Korak et al(Tuğcan Korak, 2017)

L'ADN génomique a été isolé à partir des cellules leucocytaires par la méthode conventionnelle salting-out (S A Miller, 1988):

-Les cellules de leucocytes obtenues à partir de sang anticoagulé (EDTA) ont été remises en suspension dans des tubes à centrifugation en polypropylène de 15 ml avec 3 ml de tampon de lyse des noyaux (10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl et 2 mM Na₂EDTA, pH 8,2).

- Les lysats cellulaires ont été digérés pendant la nuit à 37°C avec 0,2 ml de 10% SDS et 0,5 ml d'une solution de protéinase K (1 mg de protéase K dans 1% SDS et 2 mM de Na₂EDTA).

-Une fois la digestion terminée, 1 ml de NaCl saturé (environ 6 M) a été ajouté à chaque tube et agité vigoureusement pendant 15 secondes, suivi d'une centrifugation à 2500 tr/min pendant 1 minute. Le culot de protéine précipité a été laissé au fond du tube et le surnageant contenant l'ADN a été transféré dans un autre tube en polypropylène de 15 ml.

-Exactement 2 volumes d'éthanol absolu à température ambiante ont été ajoutés et les tubes ont été inversés plusieurs fois jusqu'à ce que l'ADN précipite.

-Le culot d'ADN précipité a été retiré avec une spatule ou une pipette en plastique et transférés dans un microtube de 1,5 ml contenant 100-200 ul de tampon TE (10 mM Tris-HCl, 0,2 mM Na₂EDTA).

3.2.2.4. Selon l'étude de Ebtsam R Zaher et al (Ebtsam R. Zaher, 2017) :

L'ADN génomique a été isolé des cellules leucocytaires en utilisant un kit d'extraction et de purification d'ADN génomique Wizard® SV Genomic DNA Purification System.

3.2.3. Détermination de la concentration et de la pureté de l'ADN

BOUKHARI Dalale en 2014 (BOUKHARI, 2014) a été utilisé le spectrophotomètre pour déterminer la concentration et la pureté d'ADN de tous les échantillons inclus dans l'étude. Sachant que :

$$\text{La concentration d'ADN} = \text{DO} \times \text{facteur de dilution} \times 50$$

-DO : la densité optique. Doit être mesuré à une longueur d'onde de 260 nm, où l'absorbance des acides nucléiques est maximale et proportionnelle à ses concentrations.

-le facteur de dilution est 250.

La pureté d'ADN a été évaluée par mesure du rapport DO_{260 nm} / DO_{280 nm}. Le rapport doit être compris entre 1,8 et 2 ; s'il est inférieur à 1,8, l'ADN est contaminé par les protéines et s'il est supérieur à 2, l'ADN est contaminé par les ARNs.

L'équipe de Mohammad AL Hamad et al (Mohammad Al Hamad, 2021) a été réalisée cette étape à l'aide d'Epoch-Biotech (spectrophotomètre microplaques). Est un lecteur optique qui fournit des mesures précises UV/Visible dans une unité compacte et très polyvalente, permettent la praticité d'un grand nombre de tests tels que ELISA, quantification des protéines et des acides nucléiques. Ce spectrophotomètre à microplaques robuste et nécessitant peu d'entretien est le système le plus économique disponible, et la quantification des acides nucléiques et des protéines en microplaques est simple et rapide (fisher scientific).

3.2.4. Recherche du polymorphisme mononucléotidique (SNP) sur RAD51

Table 3. les méthodes utilisées pour la recherche de polymorphisme mononucléotidique sur RAD51 pour les quatre populations.

La population	La méthode utilisée
Algérienne	PCR-RFLP
Egyptienne	
Turque	
Saoudienne	PCR +séquençage

3.2.3.1. Amplification du fragment d'ADN d'intérêt par PCR

Au cours de cette technique, un fragment d'ADN précis autour du site de polymorphisme d'intérêt est amplifié en de multiples copies par une polymérase à ADN et à l'aide de deux amorces spécifiques (Tableau 4). 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 (Joëlle Brodeu, 2007).

Table 4. Les amorces utilisées pour amplifier le fragment d'ADN d'intérêt

Population	Région de l'amplification	Amorces sens (S) et anti-sens(AS) (5'→3')		Taille de séquence
Algérienne (BOUKHARI, 2014)	5'UTR de gène RAD51	S	5'-TGGGAACTGCAACTCATCTGG -3'	157pb
		AS	5'-GCGCTCCTCTCTCCAGCA-3'	
S		5'-AGCTGGGAACTGCAACTCAT-3'		
AS		5'-CGCC TCACACACTCACCTC-3'		
Saoudienne (Mohammad Al Hamad, 2021)		S	5'-TGG GAA CTGCAA CTC ATC TGG-3'	175pb
			AS	
Egyptienne (Ebtsam R. Zaher, 2017)		S	5'-TGGGAACTGCAACTCATCTGG-3'	157pb
			AS	
Turque (Tuğcan Korak, 2017)	S	5'-TGGGAACTGCAACTCATCTGG-3'	157pb	
		AS		5'-GCGCTCCTCTCTCCAGCA-3'

Table 5. Programme d'amplification par PCR de la séquence cible de gène étudié.

		× 35 cycles				
Population	Dénaturation Initiale	Dénaturation	Hybridation	Elongation	Elongation finale	
Algérienne	94°C 5min	94°C 30s	60°C 1min	72°C 1min	72°C 5min	
saoudienne	94°C 3min	94°C 30s	54°C 30S	72°C 30s	72°C 10min	
Turquie		95°C 30s	53°C 30s			
Egyptienne	Nd	54°C 30s			Nd	

Nd : non déterminé

Les produits de PCR sont ensuite séparés par électrophorèse, selon les étapes suivantes :

-Disposé 5 µl de ces produits sur un gel d'agarose à 2% (le gel a été préparé selon le protocole présenté dans l'annexe N°1) et mélanger avec 3µl de bleu de charge (a été préparé selon le protocole présenté dans l'annexe N°2) ;

-Couvrir le gel par le tampon de migration (TAE 1x) ;

-Déposer soigneusement les mélanges dans les puits de gel ;

-Dans un des puits, déposer 3 µl de marqueur de poids moléculaire (1 kb) ;

-Lancer la migration en commençant par un courant de 40 volts pendant 10 min, puis en évolue à 100 volts durant 30 min ;

Après la migration électrophorétique, les fragments d'ADN séparé ont été observés sous UV après Coloration au BET.

3.2.3.2. Recherche des mutations

✓ **Technique PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - suivie d'une analyse du Polymorphisme de Longueurs des Fragments de Restriction)**

Les trois équipes : BOUKHARI Dalale (BOUKHARI, 2014), Ebtsam R.ZAHER et *al*(Ebtsam R. Zaher, 2017) et Tuğcan Korak et *al* (Tuğcan Korak, 2017)sont utilisés la PCR-RFLP pour rechercher le polymorphisme G135C sur gène RAD51 (figure 7).Les produits de l'amplification a été subit à une digestion enzymatique par des enzymes de restrictions,

sachant que le SNP (à analyser) appartient au site de reconnaissance de l'enzyme utilisée, par conséquence, le SNP fait son apparition ou sa disparition, conduisant à l'apparition ou la disparition de l'activité enzymatique. L'état du polymorphisme est détectable par un profil de migration des produits digérés en analysant les longueurs des fragments de restriction (Tableau 6) (figure 8) (BOUKHARI, 2014).

Table 6. Analyse de polymorphisme de séquence cible de RAD51 par enzymes de restriction

Population	Polymorphisme	Taille de fragment amplifié (pb)	Enzyme de restriction	Tailles des fragments attendus (pb)
Algérienne	RAD51 (G135C)	157pb	<i>BstNI</i>	Allèle sauvage : 86+71 Allèle muté : 157
Turque			<i>MvaI</i>	
Egyptienne		175pb		

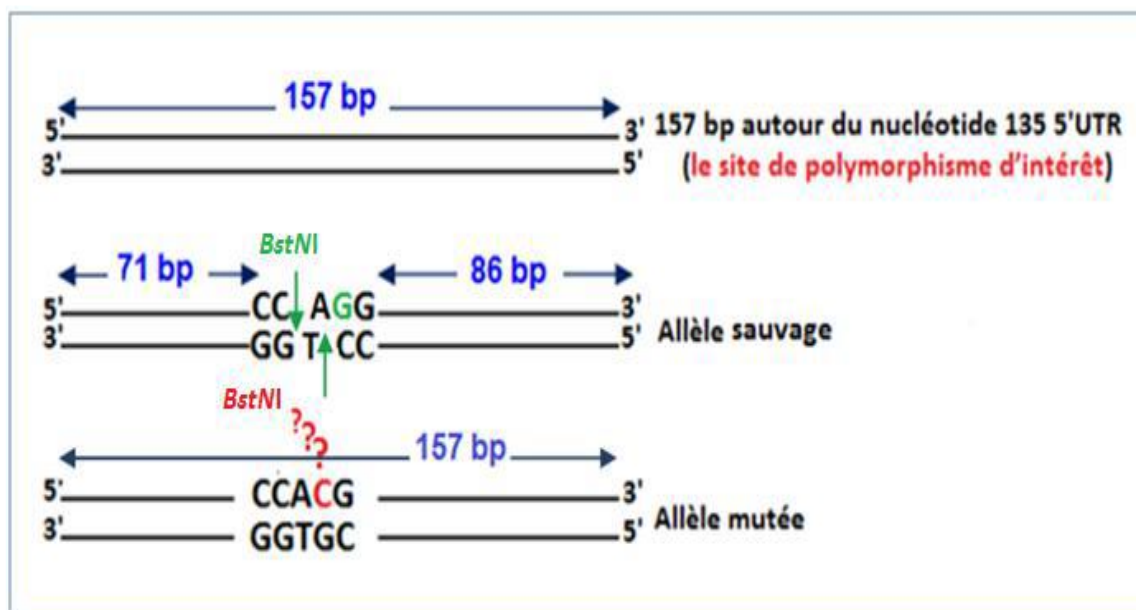


Figure 7. Caractérisation schématique de l'apparition ou de la disparition du site de reconnaissance pour l'endonucléase de restriction *BstNI* porté sur un fragment de 157 pb au niveau du gène RAD51 (BOUKHARI, 2014).

L'équipe de BOUKHARI Dalale, a été réalisée la digestion dans un volume de 20 μ l contenant :

- ✓ 10 μ l de produit de PCR ;

- ✓ 6 µl de Tampon 4 (*NEB*) ;
- ✓ 3 µl de l'enzyme de restriction choisie ;
- ✓ 1 µl d'H₂O.

-Le mélange ont été incubé dans un bain marie à température ambiante pour la restriction 60°C pendant 4 heures. Les produits de digestion ont été séparés sur un gel d'agarose à 3,5%, suite à une migration électrophorétique pendant 40 min (la migration a été réalisée à 40 V durant les premières 10 min en évolue à 100 V pendant 30 min).

Les profils de restrictions obtenus ont été analysés, après coloration au BET et visualisation sous UV.

Alors que pour l'équipe d'Ebtsam R.ZAHER et *al* et l'équipe de Tuğcan Korak et *al*, ont été choisis la même enzyme mais de programme de digestion différent (Tableau 7).

Table 7. la digestion enzymatique des produits de PCR pour l'échantillon égyptienne et turque

Population	Enzyme de digestion	Condition de digestion	Séparation de produits de digestion	Visualisation de profile de restriction
Turque (Tuğcan Korak, 2017)	<i>MvaI</i>	Incubé avec les produits de PCR pendant la nuit à 37°C	Séparé sur un gel de polyacrylamide 8%	Par une procédure de coloration à l'argent
Égyptienne (Ebtsam R. Zaher, 2017)	<i>MvaI</i>	Incubation à 37°C pendant 6h	séparés par électrophorèse en gel d'agarose 3% pendant 35 min à 20W	colorés au bromure d'éthidium et observés sous lumière UV

✓ **Technique de séquençage capillaire**

L'équipe de Mohammad Al Hamad et *al* (Mohamed Al Hamad, 2021) a été recherché les mutations dans le gène RAD51 en utilisant la technique de séquençage capillaire, qui a été réalisé de manière automatisé et a l'aide du séquenceur Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies). Le principe de la réaction de séquençage utilisée dans ce séquenceur est dérivé de celui de la méthode de Sanger, ou une polymérase à ADN qui va ajouter de manière aléatoire des désoxynucléotide (dNTPs) et didésoxynucléotidides ddATP (marqué par colorant fluorescent) à partir de l'extrémité 3'OH libre d'une amorce marqué et couplé aux fragment d'ADN à séquencer. Quand un ddATP incorporé, la synthèse d'ADN cesse à cet endroit. On obtient donc à la fin des réactions un ensemble de brins d'ADN de tailles variées, selon l'endroit où un dNTP se sera inséré (Joëlle Brodeur, 2007).

Le séquençage a été réalisé à l'aide de 3 kits : PCR & Gel Clean up Kit (Qiagen) qui permet l'extraction et purification de fragments d'ADN amplifié à partir de gel d'agarose, 2ème kit c'est le Big Dye Terminator v3.1 kit (Life Technologies, USA) qui permet la préparation de 10µl de tampon de séquençage et le 3ème kit de purification qui est le Big Dy X Terminator (Life Technologies) pour la purification d'ADN et l'amélioration de flux de séquençage. Tous les échantillons ont été séquencés dans les deux sens. La sortie de la séquence a été analysée à l'aide de logiciel Applied Biosystems Software.

Chapitre 4

Résultats et discussion

4.1.Résultats

4.1.1.La population Algérienne

L'étude de BOUKHARI Dalale porté sur 30 échantillons de patientes (81.08%) atteints de cancer du sein, 7 témoins atteints des adénofibrome (18.92%).Dont l'âge moyen des patientes et les témoins sont respectivement de 47 ans, 22 ans.

4.1.1.1 .Analyse des produits PCR obtenus

Tous les fragments d'ADN de taille 157pb issue de l'amplification par PCR ont été soumis à une migration électrophorétique sur un gel d'agarose à 2%, suivie d'une coloration en BET puis visualisation sous UV (photo 1).

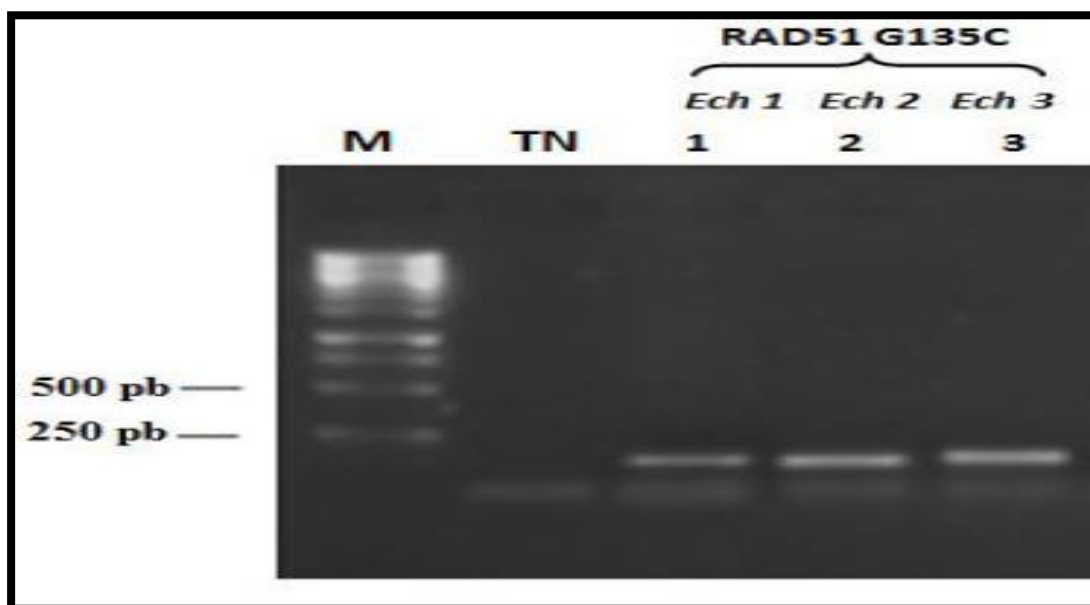


Photo1. Profil électrophorétique obtenu par PCR correspondant au fragment cible du gène RAD51 (BOUKHARI, 2014).Analyse des produits PCR obtenus sur gel d'agarose à 2% et coloration au BET suivie d'une visualisation sous UV. Les puits 1, 2 et 3 : fragments de 157 pb qui portent le site du polymorphisme RAD51 G135C. M : marqueur de poids moléculaire (1 kb, Euromedea). TN : témoin négatif

4.1.1.2.Profils des produits de PCR digérés par l'endonucléases de restriction *BstNI*

Les fragments de RAD51 attendus après digestion complète par l'enzyme *BstNI* sont de 86pb et 71pb. Une transition G135C grâce à une mutation, favorisé la disparition du site de reconnaissance de *BstNI*. Donc les échantillons qui représentant deux bandes de tailles 86pb et 71pb sont de génotype homozygote sauvage G/G. Cependant, celles représentant une seule

bande sont de type homozygote muté C/C et enfin, les échantillons représentant 3 bandes sont de génotype hétérozygote G/C (photo 2).

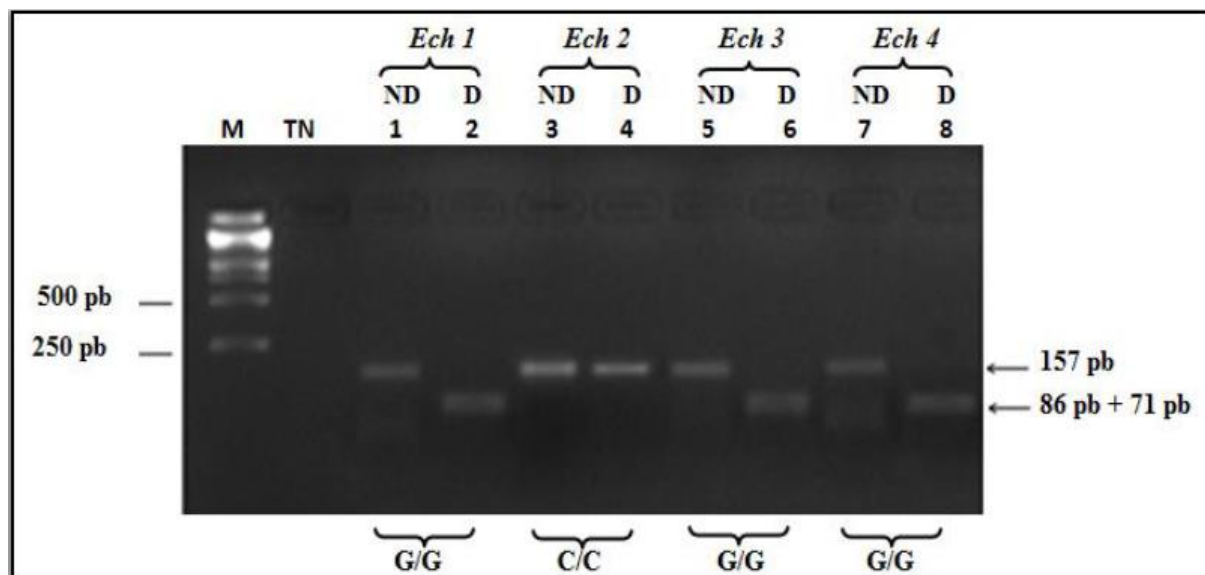


Photo 2. Profile électrophorétique montrant les fragments obtenus après la digestion par l'enzyme *BstNI* (RFLP) (BOUKHARI, 2014). Les fragments digérés sont séparés sur un gel d'agarose à 3,5%, après coloration au BET et visualisation sous UV. Les puits 1, 3, 5 et 7 : un fragment de 157 pb dans la région 5'UTR du gène RAD51 ; les puits 2, 4, 6 et 8 : produits de digestion des fragments représentés dans les puits 1, 3, 5 et 7 successivement. Les échantillons n° : 1, 3 et 4 sont de type homozygote sauvage G/G pour le polymorphisme RAD51 G135C, et l'échantillon n° : 2 est de type homozygote muté C/C. D : Digéré. ND : Non Digéré. M : Marqueur de poids moléculaire (1kb, Euromedea). TN: témoin négatif.

Table 8. Distribution des génotypes de polymorphisme RAD51 G135C d'après résultat de BOUKHARI Dalale (BOUKHARI, 2014)

Génotype	Patients (n=30)	Cas contrôles (n=7)
RAD51 G135C		
Homozygote sauvage G/G	28	7
Hétérozygote G/C	1	0
Homozygote muté C/C	1	0

4.1.1.3 Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme G135C

L'analyse moléculaire a permis de mettre en évidence la mutation G135C du gène RAD51 et les fréquences génotypiques et alléliques des différentes formes dans l'ensemble des échantillons étudiés dans la population Algérienne.

Les fréquences génotypiques de variant G135C étaient : 93.33%G/G ,3.33%G/C et 3.33%C/C chez les patientes atteintes d'un cancer du sein et 100%G/G et 0% pour génotypes C/C et G/C chez les témoins diagnostiqués pour l'adénofibrome .les fréquences d'allèle G et C chez les patientes étaient 95%G, 5%C et chez les témoins : 14%G et 0%C (Tableau 9).

Table 9. Les fréquences alléliques et génotypiques de polymorphisme G135C du gène RAD51 chez les patientes atteintes d'un cancer du sein et les témoins

		Témoins		Patients	
		N	%	N	%
Génotype	G/G	7	100%	28	93.33%
	G/C	0	0%	1	3.33%
	C/C	0	0%	1	3.33%
	Totale	7	100%	30	100%
Allèle	G	14	100%	57	95%
	C	0	0%	3	5%
	totale	14	100%	60	100%

4.1.2. La population Turque

Par des analyses statistiques, les fréquences alléliques et génotypiques du variant RAD51 ont été déterminées pour 548 patientes atteintes d'un cancer du sein et 360 sujets témoins (tableau 10).

Les fréquences génotypiques du variant RAD51 (**G135C**) étaient de 80,1 % GG, 18,8 % GC et 1,1 % CC dans les cas et 82,5 % GG, 16,7 % GC et 0,8 % CC dans le groupe témoin.

Les fréquences alléliques de l'allèle G étaient respectivement de 90,0 % et 91,0 % chez les cas et les témoins. Les fréquences alléliques de l'allèle C étaient respectivement de 10,0% et 9,0% chez les cas et les témoins.

Table 10. Les fréquences alléliques et génotypiques de la variante RAD51 (G135C)

Chez les patientes atteinte d'un cancer du sein et les sujets témoins

Gene	Patients, n (%)	Témoins, n (%)
RAD51 (G135C)	548(100.0)	360(100.0)
GG	439(80.1)	297(82.5)
GC	103(18.8)	60(16.7)
CC	6(1.1)	3(0.8)
Fréquence Allélique		
G	981(90.0)	654(91.0)
C	115(10.0)	66(9.0)

Selon le tableau précédent, aucune différence statistiquement significative n'a été trouvée dans les fréquences génotypiques des cas et des témoins, pour les cas 80,1 % GG, 18,8 % de GC et 1,1 % de CC et pour le groupe témoin 82,5 % de GG, 16,7 % de GC et 0,8 % de CC. De plus, les fréquences alléliques des cas et des témoins est presque identique. Dans les cas l'allèle G étaient de 90,0% et l'allèle C 10.0% et pour les témoins 91.0% G et 9.0% C.

4.1.3.La population Egyptienne

L'étude d'Ebtsam R Zaher et al(Ebtsam R. Zaher, 2017)a porté sur 248 cas cancéreux (51.67%) et 232 femmes témoins (48.33%).Dont l'âge moyen des patientes et les témoins sont 48 ans.

Les fréquences génotypiques et alléliques des polymorphismes de gène RAD51 étudiés pour les patientes atteintes un cancer du sein et les témoins sont présentés dans le tableau 11.

Les fréquences génotypiques du variant RAD51 (G135C) étaient de 83.1% GG, 15.3% GC et 1.6% CC dans les cas des femmes atteints de cancer du sein et 83.6 % GG, 14.7 % GC et 1.7% CC dans les témoins et les fréquences alléliques de l'allèle G étaient respectivement de

90,7 % et 91,9 % chez les cas et les témoins. Les fréquences alléliques de l'allèle C étaient respectivement de 9.3% et 9,1% chez les cas et les témoins.

Table 11. Les fréquences des génotypes et des allèles de polymorphisme de gène RAD51

Chez Les patientes atteintes d'un cancer du sein et les témoins

Polymorphisme	Génotype/allèle	Patients		Témoins	
		N	%	N	%
RAD51 5'UTR G135C	Fréquence de génotype				
	GG	206	83.1	194	83.6
	GC	38	15.3	34	14.7
	CC	4	1.6	4	1.7
	Fréquence Allélique				
	G	458	90.7	422	90.9
C	24	9.3	42	9.1	

Selon le tableau11, il n'ya pas une différence significative de fréquences alléliques et génotypiques entre les patientes atteints d'un cancer du sein et les témoins.

4.1.4.La population Saoudienne :

Selon les analyses statistiques effectuées : la fréquence génotypique de variante G135C était de 63/103 (61 %) et 11/80 (14 %) dans les cellules tumorales et le groupe témoin, respectivement. Donc, il y a une différence significative entre les patients et témoins dans les fréquences génotypiques, donc la variant G135C de RAD51 est significativement associé avec le risque de développer un cancer du sein sporadique.

Table 12. Fréquences génotypiques de polymorphisme du gène RAD51 chez les échantillons du cancer du sein et de contrôle

Echantillon	SNPs G135C	
	GG	GC+CC
Sang	51	9
Tissus normales	18	2
Tissus tumorales	40	63

4.2. Discussion

L'objectif de notre étude était la détection de polymorphisme mononucléotidique G135C située dans la région non codante 5'UTR de gène de réparation par recombinaison homologue RAD51 à partir des tissus d'archives fixées et inclus préalablement dans des blocs de paraffine. Ensuite, nous avons essayé de déterminer la relation entre cette polymorphisme et l'apparition ou/et la développement de cancer de sein chez les femmes algériennes et comparer les résultats obtenues avec celles des autres population : égyptienne, turque et saoudienne.

4.2.1. Discussion analytique

4.2.1.1- Echantillon d'étude

BOUKHARI Dalale et l'équipe de Mohammad Al Hamad, utilisèrent des tissus conservées comme une source d'ADN pour l'analyse génomique, et avec l'intérêt croissant pour la compréhension de la base génétique des maladies, la capacité d'extraire l'ADN de ces échantillons représente une source inestimable de matériel de diagnostique (Larissa A. Pikor, 2011). Malheureusement, ces tissus conservés à long temps dans la paraffine peuvent donner un ADN génomique fortement dégradé en raison de la réticulation entre les brins d'acide nucléique et les protéines, ainsi que des ruptures aléatoires de séquence, Et par conséquent, la qualité de l'ADN de ces échantillons est nettement réduite (Sabine Bauer, 2021). Pour cette raison, il préfère d'utiliser un échantillon frais que conservé.

4.2.1.2.-Extraction d'ADN

L'isolement de l'ADN génomique en quantité et qualité adéquats à partir des échantillons de sang ou des tissus, est l'étape clé dans la réalisation d'une analyse génétique. Plusieurs méthodes ont été utilisées depuis longtemps. Les deux équipes de BOUKHRI Dalale et de TuğcanKorak ont été utilisé la méthode de salting-out qui basé principalement sur la précipitation des protéines par un sel pour purifié l'ADN. L'utilisation de cette méthode en large de temps et dans plusieurs études montre qu'elle plus sûre, plus simple, plus efficace, n'utilise pas des substances toxique comme l'extraction par phénol-chloroforme et moins coûteux (M.H. Mirmomeni, 2010). Cependant elle nécessite un volume de matériaux plus important et un travail manuel plus long (Marta Kalousova K. L., 2017) et l'ADN obtenu peut être contaminé.

Mais nous avons besoin de traiter un grand nombre d'échantillons en un temps plus court, donc il préfère de remplacer cette méthode par autre plus rapide comme l'utilisation des kits commerciaux et c'est ce qu'il a fait les deux équipes Mohammad Al Hamad et de Ebtsam R.ZAER qui ont travaillé sur un nombre des échantillons plus élevée (n=183, n=480). l'équipe de Mohammad Al Hamad a été utilisé deux kits : le premier, QIA amp DNA FFPE Tissue Kit qui est spécifique pour extraction et purification de l'ADN à partir des tissus fixées au formol et inclus en paraffine. Ce kit donne un rendement d'extraction élevé et d'haute qualité d'ADN avec l'élimination complète des contaminants et des inhibiteurs (QIAGEN). Le deuxième kit est QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Germany) qui assure la purification de jusqu'à 12 µg d'ADN génomique à partir des échantillons de sang (QIAGEN). L'équipe de Ebtsam R.ZAER a été utilisé un autre kit, Wizard® SV Genomic DNA Purification System, qui peut purifier l'ADN génomique à partir de cellules cultivées en environ 20 minutes (Promega).

Malgré les avantages d'utilisation des kits commerciaux par rapport la méthode salting-out, mais ils sont trop coûteux, par exemple : le prix de kit QIAampDNA FFPE Tissue est de 35 401,323 Dinar algérien, donc il peut remplacer par autre moins chère (QIAGEN).

4.2.1.3. Les choix des amorces pour l'amplification par PCR

Il doit être vérifié la spécificité des amorces utilisées par les quatre études, est ce que elles sont spécifiques au fragment cible de gène RAD51 ? Donc, nous avons vérifié la spécificité de toutes les amorces incluses in silico en utilisant l'outil bioinformatique. Nous avons utilisé UCSC In-Silico PCR (annexe 3) qui est un programme rapide basé sur la

thermodynamique pour vérifier la spécificité des amorces par rapport aux bases de données d'ADN génomique et d'ARN messenger/séquence d'ADN complémentaire rapidement et facilement. Plusieurs caractéristiques importantes, telles que la séquence, la température de fusion et la taille de chaque amplicon, spécifique ou non spécifique, sont signalées sur la page des résultats.

Nous avons trouvé que toutes les amorces utilisés par les quatre études sont spécifique à la région 5'UTR de gène RAD51.

4.2.1.4. Technique de Recherche des Polymorphismes mononucléotidique (SNP) sur RAD51

L'équipe de BOUKHRI Dalale, de Tuğcan Korak et d'Ebtsam R. Zaher ont été utilisé le technique PCR-RFLP pour détecter le polymorphisme G135C de le gène RAD51. Cette technique est également connue sous le nom cleaved amplified polymorphic sequence, a été inventée par Botstein et al (D Botstein, 1980). Il est largement utilisé pour le génotypage des SNP dans les études de recherche fondamentale sur les maladies génétiques complexes grâce a ces avantages nombreuses. Il est simple, sensible, peu coûteuse, fiable et nécessite un investissement minimal en instrumentation (Masao Ota, 2007). Cependant, malgré ces avantages elle présente certaines limites. Par exemple, il n'y avait pas de sites d'enzymes de restriction appropriés dans les sites polymorphes, et certaines enzymes de restriction et leurs isoschizomères sont coûteux pour le criblage à grande échelle d'échantillons (Wang, 2017). Ainsi, l'exigence d'ER (enzyme de restriction) spécifique et la difficulté d'identifier la variation exacte dans le cas où plusieurs SNP sont ciblés en même temps (Al-Shuhaib, 2019), et enfin il ne peut pas détecter que les SNP connus (Kakavas, 2021).

Alors que, l'équipe de Mohammad Al Hamad a été utilisé le séquençage capillaire (séquençage de Sanger) pour détecter la variant G135C .Ce technique a des avantages par rapport le PCR-RFLP, représente par sa capacité à détecter les mutations non canoniques (y compris les polymorphismes mononucléotidique et les petites insertions ou délétions), sa précision et sa relative robustesse pour saisir la quantité et la qualité de l'ADN (Wai-Ying Fong, 2017) et aussi sa capacité de détecté les nouvelles mutations.

4.2.2. Discussion des résultats:

D'après l'étude de BOUKHARI Dalale, il a trouvé que il ya une différence dans les fréquences génotypiques des patients atteintes d'un cancer du sein et de témoins, sachant que les fréquences génotypiques pour les patientes sont 93.33%GG, 3.33%GC et 3.33C/C et pour

les témoins 100% G/G, 0% GC et C/C. Les fréquences alléliques sont aussi différentes, pour les patientes l'allèle C représente 5% et G 95%, par contre chez les témoins C 0% et G 100% (BOUKHARI, 2014). Malgré la présence de différences alléliques et génotypiques entre les patientes et les témoins, on ne peut pas confirmer l'association de variante G135C de gène RAD51 et le cancer du sein chez les femmes algérienne, c'est à cause le nombre faible des échantillons qui travaillé sur elles (patientes =30, témoins =7). Donc, il faut augmenter les nombres des échantillons analysées pour détermine la relation entre cette mutation et le risque de cancer du sein.

L'équipe de Tuğcan Korak (Tuğcan Korak, 2017) et de Ebtsam R. Zaher (Ebtsam R. Zaher, 2017) n'ont été trouvé aucun différence significative dans les fréquences allèlique et génotypique de variant G135C entre les patients atteintes de cancer du sein et les cas témoins. donc il n'a pas une association entre cette variante et le cancer du sein chez la population Turque et égyptienne d'après ces études.

L'équipe de Mohammad Al Hamad (Mohamed Al Hamad, 2021), indique dans leurs étude que il ya une différence génotypiques de polymorphisme G135C de gène RAD51 entre patientes et des témoins, donc il ya une association une cette polymorphisme et le cancer du sein chez la population saoudienne.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

L'objectif de notre travail était d'analyser une étude a été réalisé par BOUKHRI Dalale en 2014 pour la recherche de polymorphisme G135C de gène RAD51 dans les échantillons de femmes algériennes et aussi d'essayer de déterminer l'association entre cette polymorphisme et l'apparition ou /et le développement de cancer du sein. Puis nous allons comparer ce résultat avec des autres populations.

Les résultats obtenus ont permis de détecter des anomalies génétiques au codon 135 de gène RAD51. Néanmoins, leur association n'a pas été confirmée vu le nombre restreint des échantillons étudiées. Un séquençage permettrait d'identifier les substitutions obtenues (essentiellement les homozygotes mutées).

Vu l'intérêt de cette recherche, des études complémentaires du profil RFLP de variante RAD51 G135C, sur un échantillonnage étendu de la population Algérienne, sont nécessaires.

Pour la continuité de cette étude, nous suggérons de :

- Augmenter les nombres des échantillons analysées pour détermine l'association de variante G135C de gène RAD51 et le cancer du sein ;
- Utiliser la technique de séquençage afin d'identifier et de confirmer la nature des anomalies détecter ;
- Rechercher des autres mutations dans les autres paralogues de gène RAD51 : RAD51C, RAD51B, RAD51D.

Bibliographie

Bibliographie

- 1-Akira Shinohara, H. O. (1993, July 1). Cloning of human, mouse and fission yeast recombination genes homologous to RAD51 and recA. *nature genetics* , 239-243.
- 2-Alessandro Bombonati, D. C. (2011). The molecular pathology of breast cancer progression. *Pathology* , 307-317.
- 3-Al-Shuhaib, H. .. (2019). Exploring the Potential and Limitations of PCR-RFLP and PCR-SSCP for SNP Detection: A Review. *Journal of Applied Biotechnology Reports* , 137-144.
- 4-Amina, M. B. (2017, 04 20). Etude de l'hétérogénéité moléculaire des cancers du sein dans la région du nord-ouest de l'Algérie et identification de RAB25 comme cible thérapeutique potentielle du sous type luminal B. *Thèse pour l'obtention du diplôme de Doctorat 3ème cycle* . Département de biologie: Université Djillali Liabes de Sidi Bel Abbes.
- 5-Batoul, K. (2016). Etude du polymorphisme du gène adrénérgique 2A(ADRA2A) dans le cancer du sein. *Thèse en vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT troisième cycle* . DEPARTEMENT DE BIOLOGIE DES ORGANISMES.
- 6-Beata Smolarz, M. M. (2019). Polymorphism of DNA repair genes in breast cancer. *Oncotarget* , 527-535.
- 7-BERTOLINO, P. (2002, Juin 25). Etude des conséquences physiopathologiques résultant de l'invalidation du gène de prédisposition aux Néoplasies Endocrines Multiples de type 1 (NEM1). *Thèse de doctorat(69-2003)* . Université Claude Bernard Lyon 1.
- 8-BOUKHARI, D. (2014). Mémoire de Magister en Biologie. *Recherche des polymorphismes nucléotidiques des gènes de réparation par recombinaison homologue(RAD51,XRCC2 et 3) et le risque de cancer du sein chez les femmes algériennes* . Département des Sciences de la Nature et de la Vie: Université Mohamed Khider - Biskra -.
- 9-CANCER TODAY. (2020). Récupéré sur World Health Organization : <http://gco.iarc.fr/>,
- Charles M. Perou, T. S. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* , 747–752.
- 10-D Botstein, R. L. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics* , 314-331.

- 11-Ebtsam R. Zaher, M. A.-N. (2017). Impact of DNA Repair Genes Polymorphisms on Incidence and Prognosis of Breast Cancer in an Egyptian Cohort. *Journal of Cancer Research and Treatment*, 5 (4), 113-119.
- 12-Fatiha, B. (2013-2014). Analyse mutationnelle du gène JAK2 V617F et son association potentielle à latranslocation BCR-ABL dans la leucémie. *Mémoire de Magister* . Université Mohamed KHIDER Biskra.
- 13-*fisher scientific*. (s.d.). Récupéré sur BioTek™ Spectrophotomètre à microplaques Epoch™:<https://www.fishersci.fr/shop/products/biotek-epoch-microplate-spectrophotometer/10418614>
- 14-FRANCOIS GALLON. (s.d.). Récupéré sur cancer du sein: <https://www.francois-gallon.fr>
- 15-Gautam K Malhotra, X. Z. (2010). Sous-types histologiques, moléculaires et fonctionnels des cancers du sein. *Biologie et thérapie du cancer* , 955-960.
- 16-H Aihara, Y. I. (1999). The N-terminal domain of the human Rad51 protein binds DNA: structure and a DNA binding surface as revealed by NMR. *Journal of Molecular Biology* , 495-504.
- 17-Hanna Romanowicz-Makowska, B. S. (2011). Single Nucleotide Polymorphisms in the Homologous Recombination Repair Genes and Breast Cancer Risk in Polish Women. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* , 224.
- 18-Hasselbach, L. H. (2005). Characterisation of the promoter region of the human DNA-repair gene Rad51. *European journal of gynaecological oncology* , 589–598.
- 19-Hellgren, J. F. (1996). Expression of the human RAD51 gene during the cell cycle in primary human peripheral blood lymphocytes. *BBA Molecular Cell Research* , 231-236.
- 20-J Ferlay, E. S.-F.-T. (2012). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *EUROPEAN JOURNAL OF CANCER: EJC* , 1374-1403.
- 21-J M Hall, M. K. (1990). *linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21*. Récupéré sur Science (New York, N.Y.),: <https://doi.org/10.1126/science.2270482>
- 22-Joëlle Brodeu, M. T. (2007). *Biologie moléculaire:Concepts.Techniques.Applications* (Vol. 331). Canada: CENTRE COLLEGIAl DE DEVELOPPEMENT DE MATERIEL DIDACTIQUE:CCDMD.

- 23-Joëlle Brodeur, M. T. (2007). *Biologie moléculaire: Concepts.Techniques.Applications*. CANADA: CENTRE COLLEGIAl DE DEVELOPPEMENT DE MATERIEL DIDACTIQUE.
- 24-Kakavas, K. V. (2021, April 24). Sensitivity and applications of the PCR Single-Strand Conformation Polymorphism method. *Molecular Biology Reports* , 3629–3635.
- 25-Khek-Chian Tham, R. K. (2016). Mismatch repair and homeologous recombination. *DNA Repair* , 75-83.
- 26-Larissa A. Pikor, K. S. (2011). DNA Extraction from Paraffin Embedded Material for Genetic and Epigenetic. *Journal of Visualized Experiments: JOVE* , 2763.
- 27-Larissa A. Pikor, K. S. (2011). DNA Extraction from Paraffin Embedded Material for Genetic and Epigenetic Analyses. *Journal of Visualized Experiments: JoVE* .
- 28-Libby M. Morimoto, E. W. (2002). Obesity, Body Size, and Risk of Postmenopausal Breast Cancer: The Women's Health Initiative (United States). *Cancer Causes & Control* , 741-751.
- 29-Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* , 362 , pages 709-715.
- 30-LYPHBANK. (s.d.). Récupéré sur ISOLEMENT DES CELLULES MONONUCLÉÉES: LES PIÈGES À ÉVITER: <https://www.lymphobank.fr/page/isolement-des-cellules-mononucleees>
- 31-M.H. Mirmomeni, S. S. (2010). Comparison of the Three Methods for DNA Extraction from Paraffin-Embedded Tissues. *Science Alert* , 261-266.
- 32-Marta Kalousová, K. L. (2017, August 9). Comparison of DNA Isolation Using Salting-Out. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* , 703-708.
- 33-Marta Kalousová, K. L. (2017, August 9). Comparison of DNA isolation using salting-out procedure and automated isolation (MagNA system). *Preparative Biochemistry and Biotechnology* , 703-708.
- 34-Masahiro Kawabata, T. K. (2005). Role of recA/RAD51 family proteins in mammals. *Acta Med Okayama* , 1-9.
- 35-Masao Ota, H. F. (2007). Single nucleotide polymorphism detection by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *natureprotocols* , 2857–2864.

- 36-Mohamed Al Hamad, H. K. (2021, avril 1). *Des variants polymorphes dans les régions 5'-UTR du gène RAD51 sont associés à l'expression de RAD51 et au cancer du sein triple négatif (TNBC) : une étude cas-témoins*. Récupéré sur National library of Medicine : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33417321/>
- 37-Mohammad Al Hamad, H. K. (2021). Polymorphic Variants in 5'-UTR Regions of the RAD51 Gene are Associated With RAD51 Expression and Triple-Negative Breast Cancer (TNBC): A Case-Control Study. (V. Dass, Éd.) *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology:AIMM*, 29 (4), 270-276.
- 38-Promega. (s.d.). Récupéré sur Wizard® SV Genomic DNA Purification System: <https://worldwide.promega.com/products/nucleic-acid-extraction/genomic-dna/wizard-sv-genomic-dna-purification-system/>
- 39-QIAGEN. (s.d.). Récupéré sur QIAamp DNA FFPE Tissue Kit: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/qiaamp-dna-ffpe-tissue-kit/>
- 40-Rozenbaum, D. H. (2003). *Guide pratique de gynécologie*. Paris: Solar.
- 41-S A Miller, D. D. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* , 1215.
- 42-Sabine Bauer, J. P. (2021). Optimized High Quality DNA Extraction from Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Human Atherosclerotic Lesions. *Journal of visualized experiments : JoVE*
- 43-Sihua Wang, M. D. (2017). detection of the Single Nucleotide Polymorphism at Position rs2735940 in the Human Telomerase Reverse Transcriptase Gene by the Introduction of a New Restriction Enzyme Site for the PCR-RFLP Assay. *Annales des sciences cliniques et de laboratoire* , 546-550.
- 44-Société canadienne du cancer. (s.d.). Récupéré sur Facteurs de risque du cancer du sein: <https://www.cancer.ca/fr>
- 45-T. Bienvenu, C. M.-D.-F.-R. (1999). *John Libbey Eurotext (JLE)*. Récupéré sur Les techniques d'extraction de l'ADN à partir d'un échantillon sanguin: <http://genet.univ-tours.fr>
- 46-Tavassoli FA, D. P. (2003). *Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. (I. Press, Éd.) WHO Classification of Tumours.

- 47-Thehuman protein Atlas. (s.d.). Récupéré sur RAD51: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000051180-RAD51>
- 48-Tortora & Grabowski Reynolds, S. (2001). *Principes d'anatomie et de physiologie*. EDITIONS Du RENOUVEAU PEDAGOGIQUE, SAINT-LAURENT, QUE.
- 49-Tuğcan Korak, E. E. (2017, February 1). Original Article RAD51 (rs1801320) gene polymorphism and breast cancer risk in Turkish population. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* , 2181-2186.
- 50-Vesna Dapic, M. A. (2005). Breast Cancer Susceptibility and the DNA Damage Response. *Journal of the Moffitt Cancer Center* .
- 51-Vogelstein, K. W. (1997). Gatekeepers and caretakers. *nature* , 761–763.
- 52-Wai-Ying Fong, C.-C. H.-T. (2017). Comparison of Direct Sequencing, Real-Time PCR-High Resolution Melt (PCR-HRM) and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) Analysis for Genotyping of Common Thiopurine Intolerant Variant Alleles NUDT15 c.415C>T and TPMT c.719A>G (TPMT*3C). *diagnostics* , 27.
- 53-Wang, S. D. (2017). Detection of the Single Nucleotide Polymorphism at Position rs2735940 in the Human Telomerase Reverse Transcriptase Gene by the Introduction of a New Restriction Enzyme Site for the PCR-RFLP Assay. *Annals of clinical and laboratory science* , 546–550.
- 54-Wild.C. (2018). *Centre International de recherche sur le cancer (CIRC)*. Récupéré sur (Incidence et Mortalité du cancer du sein dans le monde).Globocan 2018: <http://gco.iarc.fr/>,

Annexes

Annexes

Annexe .1 Réactifs chimiques

- Xylène (SIGMA-ALDRICH, Germany)
- Éthanol à 100%, à 70% et à 50%
- Tampon de lyse (10 mM Tris pH 7,5 ; 100 mM EDTA, 50 mMNaCl)
- Protéinase K (20 mg/ml, Invitrogen, France)
- NaCl 6 M (BIOCHEM Chemopharma, Québec)
- Isopropanol (SIGMA-ALDRICH, Germany)
- Tris (Sigma, France)
- EDTA 10 mM (Sigma, France)
- Amorces sens (S) et antisenses (AS) (solution mère à 100 µM, solution fille à 10 mM) (Eurogentec, France).
- DNTPs (mM 10 µM, Fermentas, Spain)
- *Taq*polymerase 5 U/µl (New England Biolabs, UK)
- Tampon de PCR (+MgCl₂) (New EnglandBiolabs, UK)
- Tampon de PCR (-MgCl₂) (Fermentas, Spain)
- *Taq*polymérase (Fermentas, Spain)
- MgCl₂ (25 mM, Fermentas, Spain)
- H₂O distillée
- H₂O bidistillée
- Marqueur de poids moléculaire d'ADN, 1 Kb (Euromedea)
- Enzymes de restriction (*Bst*NI, *Hph*I et *Nla*III ; New EnglandBiolabs, UK)
- Tampon de restriction (tampon n°4 ; New EnglandBiolabs, UK)
- Agarose (Electron, Communauté Européenne)
- Tampon TAE 1X (Tris, Acétate, EDTA)

- BET (bromure d'éthidium) (Sigma, France)
- Bleu de bromophénol (bleu de chargement) (Sigma, France)

Annexe .2 Préparation d'un gel d'agarose

Un gel d'agarose à X% peut être préparé selon le protocole suivant :

- en utilisant un balance de précision, peser x g d'agarose ;
- mélanger l'agarose avec 100 ml de tampon TAE 1x ;
- dans une microonde, chauffer le mélange jusqu'au dissous total des cristaux d'agarose

Dans le tampon ;

- ajouter 1 µl de bromure d'éthidium (BET) au mélange ;
- couler délicatement le gel sur le portoir spécial et placer les peignés soigneusement ;
- après refroidissement, le gel est polymérisé et prêt d'être utilisé ;
- enlever les peignés, couvrir le gel avec le tampon et enfin déposer soigneusement les Échantillons dans les puits.

Annexe 3. Préparation de bleu de chargement

Le bleu de chargement peut être préparé en mélangeant les produits suivants :

- ✓ 3 µl H₂O.
- ✓ 2,4 µg bleu de bromophénol.
- ✓ 3µl glycérol.

Annexe 4. Présentation des séquences PCR prévues amplifiées par la PCR *in silico* qui ont été lancées en ligne à partir de <http://genome.ucsc.edu>.

-Le premier couple des amorces utilisé par l'équipe de BOUKHRI Dalale en 2014 (sens5'-TGGGAAGTGC AACTCATCTGG -3' et antisens5'-GCGCTCCTCTCTCCAGCA-3')

PCR in-silico UCSC

```
> chr15:40695255+40695441 187bp AGCTGGGAAGTGC AACTCAT CGCCTCACACTCACCTC
AGCTGGGAAGTGC AACTCATctgggttgctgctgcgcagaaaggctggggcaagc
gagtagagaagtggagcgttaagccagggcgcttggggccgtgctgggtcg
ggcgcgtgccacgcccgcggggtgaagtcggagcgcggggcctgctggag
agaggagcgtgctggaccGAGGTGAGGTGTGTGAGGCG
```

-Le deuxième couple des amorces utilisé par l'équipe de Mohammad Al Hamad, en 2021(5'-AGCTGGGAACTGCAACTCAT-3'et 5'-CGCC TCACACACTCACCTC-3')

```

PCR in-silico UCSC

> chr15:40695258+40695414 157bp TGGGAACTGCAACTCATCTGG GCGCTCCTCTCTCCAGCA
TGGGAACTGCAACTCATCTGGgttgtgcgcagaaggctggggcaagcgag
tagagaagtggagcgtaagccagggcgttggggggccgtgcggggtcgggc
gcgtgccacgcccgcggggtgaagtcggagcgcggggccTGCTGGAGAGA
GGAGCGC

```

-Le troisième couple des amorces utilisé par l'équipe de Ebsam R. Zaher en 2017 (5'-TGG GAA CTGCAA CTC ATC TGG-3' et 5'-GCG CTC CTC TCT CCA GCA G-3')

```

PCR in-silico UCSC

> chr15:40695258+40695414 157bp TGGGAACTGCAACTCATCTGG GCGCTCCTCTCTCCAGCAG
TGGGAACTGCAACTCATCTGGgttgtgcgcagaaggctggggcaagcgag
tagagaagtggagcgtaagccagggcgttggggggccgtgcggggtcgggc
gcgtgccacgcccgcggggtgaagtcggagcgcggggccTGCTGGAGAGA
GGAGCGC

```

-Le quatrième couple des amorces utilisé par l'équipe de Tuğcan Koraken 2016(5'-TGGGAACTGCAACTCATCTGG-3' et 5'-GCGCTCCTCTCTCCAGCA-3')

```

PCR in-silico UCSC

> chr15:40695258+40695414 157bp TGGGAACTGCAACTCATCTGG GCGCTCCTCTCTCCAGCA
TGGGAACTGCAACTCATCTGGgttgtgcgcagaaggctggggcaagcgag
tagagaagtggagcgtaagccagggcgttggggggccgtgcggggtcgggc
gcgtgccacgcccgcggggtgaagtcggagcgcggggccTGCTGGAGAGA
GGAGCGC

```

Résumés

Résumés

ملخص

سرطان الثدي هو أكثر أنواع السرطانات شيوعاً بين النساء ، بما في ذلك في الجزائر ، حيث يسجل هذا المرض أعلى معدلات الإصابة والوفيات. يلعب بروتين RAD51 دوراً مهماً في إصلاح القواطع المزدوجة للحمض النووي عن طريق إعادة التركيب المتماثل. إن تعدد شكل نكليوتيدة واحدة على مستوى الجين RAD51 قد يرتبط بخطر الإصابة بسرطان الثدي. في هذا العمل حاولنا تحليل دراسة أجريت على الجزائريين سنة 2014 بهدف البحث عن تعدد الشكل النكليوتيدي G135C على مستوى الجين RAD51 ومحاولة تحديد العلاقة بين هذا التعدد الشكلي وبداية و/أو تطور سرطان الثدي لدى النساء الجزائريات. وأخيراً مقارنة النتائج المتحصل عليها بمتيلتها الخاصة بالشعب السعودي، المصري والتركي. تم استخلاص الحمض النووي من الأنسجة المرضية المحفوظة والمثبتة والمضمنة في البارافين ، ثم تم الكشف عن التعدد الشكلي على جين RAD51 بواسطة تقنية PCR-RFLP. النتائج التي تم الحصول عليها تؤكد وجود متغير G135C في الجين المدروس بنسبة منخفضة. لم يتم تأكيد الارتباط بين تعدد الأشكال RAD51 G135C وخطر الإصابة بسرطان الثدي ذلك بسبب قلة عدد العينات التي تمت دراسته عند السكان الجزائريين.

الكلمات المفتاحية: سرطان الثدي، DSBs، تعدد الأشكال ، RAD51، PCR-RFLP.

Résumé

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez les femmes, y compris en Algérie. Où cette maladie présente les taux d'incidence et de mortalité les plus élevés. La protéine RAD51 joue un rôle important dans la réparation des casseurs doubles brins de l'ADN (DSBs) par recombinaison homologue (RH). Étant donné qu'un polymorphisme mononucléotidique (SNP) au niveau de gène RAD51 peut lier au risque de cancer du sein. Dans ce travail, nous avons essayé d'analyser une étude qui a été réalisée sur la population algérienne en 2014 pour la recherche de polymorphisme nucléotidique G135C sur RAD51 et essayer de déterminer l'association entre cette polymorphisme et l'apparition ou/et le développement de cancer du sein chez les femmes algériennes. Enfin, comparé les résultats obtenues avec celles d'autres populations : Saoudienne, Egyptienne et Turquie. L'extraction d'ADN a été réalisée partir des tissus pathologiques conservés, fixés et inclus en paraffine, puis la détection de polymorphisme sur gène RAD51 a été réalisée par le technique PCR-RFLP. Les résultats obtenus confirment la présence de variante G135C au niveau de gène étudié, avec une fréquence faible. L'association entre le polymorphisme RAD51 G135C et le risque de cancer du sein n'a pas confirmé c'est à cause le nombre restreint d'échantillons étudiés chez la population Algérienne.

Mots clés: Cancer du sein, DSBs, polymorphisme, RAD51, PCR-RFLP.

Abstract

Breast cancer is the most common cancer in women, including in Algeria, where this disease has the highest incidence and mortality rates. The RAD51 protein plays an important role in the repair of DNA double strand breakers (DSBs) by homologous recombination (HR). Since a single nucleotide polymorphism (SNP) at the RAD51 gene level may be linked to the risk of breast cancer. In this work, we tried to analyze a study that was carried out on the Algerian population in 2014 for the search for G135C nucleotide polymorphism on RAD51 and to try to determine the association between this polymorphism and the appearance or / and the development of breast cancer in Algerian women. Finally, compare the results obtained with those of other populations: Saudi, Egyptian and Turkey. DNA extraction was carried out from pathological tissues preserved, fixed and embedded in paraffin, and then the detection of polymorphism on the RAD51 gene was carried out by the PCR-RFLP technique. The results obtained confirm the presence of the G135C variant at the level of the gene studied, with a low frequency. The association between the RAD51 G135C polymorphism and risk of breast cancer has not confirmed, this is because of the small number of samples studied in the Algerian population.

Keywords: Breast cancer, DSBs, polymorphism, RAD51, PCR-RFLP

